

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTE DES SCIENCES

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE, SANTE  
ET ENVIRONNEMENT

\*\*\*\*\*

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE

\*\*\*\*\*



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace-Work-Fatherland

\*\*\*\*\*

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTY OF SCIENCE

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING IN  
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND  
ENVIRONMENTAL SCIENCE

\*\*\*\*\*

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCE

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

# Inhibition de la croissance des moisissures ochratoxinogènes par les bactéries lactiques au cours de la fermentation des fèves de cacao

“THESE”

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/ Ph D en  
MICROBIOLOGIE

Option : Microbiologie Alimentaire et Industrielle

Par :

**YOUTE FANCHE Sandrine Aimée**

Matricule : 05R343

Master en Biochimie

Devant le jury composé de :

**Président :** ETOA François-Xavier, Professeur, Université de Yaoundé 1

**Rapporteur :** ESSIA NGANG Jean Justin, Professeur, Université de Yaoundé 1

**Membres :** FOKOU Elie, Professeur, Université de Yaoundé 1

KANSKI Germain, Professeur, Université de Yaoundé 1

TATSADJIEU NGOUNE Léopold, Professeur, Université de Ngaoundéré

Année 2022



UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I  
FACULTE DES SCIENCES  
Département de Microbiologie  
BP 812 - Yaoundé  
Tél./fax (237) 222 23 44 96



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
Department of Microbiology  
P.O. Box 812 Yaoundé  
Tel./fax (237) 222 23 44 96

### ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, membres du Jury de la soutenance de Thèse de Doctorat/ Ph. D de Microbiologie (Option Microbiologie Alimentaire et Industrielle) de Madame **YOUTE FANCHE Sandrine Aimée**, Matricule **05R343**, soutenance autorisée par la correspondance N° **223404/UY1/VREPDTIC/DAAC/SSPE/CB-nsr** du 23 Novembre 2022. et défendue le 13 Décembre 2022 à 14 heures dans la salle S01/S02 de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I sous le Thème : <<**Inhibition de la croissance des moisissures ochratoxinogènes par les bactéries lactiques au cours de la fermentation des fèves de cacao**>>, attestons que les corrections exigées à la candidate lors de cette évaluation ont été effectuées et que le dit document peut être déposé sous sa forme actuelle.

En foi de quoi la présente attestation lui est établie pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **16 JAN 2023**

Examineurs

Président du Jury

*Tatou Nguine Léopold*  
Professeur  
*Pr. Elie Fokou*  
Dr d'Etat en Biochimie  
Nutrition et Sciences Alimentaires  
*Dr KANSSE*

*ETOA François Xavier*  
Professeur

Chef de Département de Microbiologie

*Jean Justin Essia Ngang*  
Professeur



REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix-Travail-Patrie  
\*\*\*\*\*  
UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*  
FACULTE DES SCIENCES  
\*\*\*\*\*  
CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE, SANTE  
ET ENVIRONNEMENT  
\*\*\*\*\*  
UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE  
\*\*\*\*\*



REPUBLIC OF CAMEROUN  
Peace-Work-Fatherland  
\*\*\*\*\*  
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*  
FACULTY OF SCIENCE  
\*\*\*\*\*  
CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING IN  
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND  
ENVIRONMENTAL SCIENCE  
\*\*\*\*\*  
RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCE  
\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE  
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

### DECLARATION SUR L'HONNEUR

Je soussigné, YOUTE FANCHE Sandrine Aimée, Matricule O5R343, atteste que la présente thèse intitulée : « Inhibition de la croissance des moisissures ochratoxinogènes par les bactéries lactiques au cours de la fermentation des fèves de cacao » est le fruit de mes propres travaux de recherche effectués sous la direction de ESSIA NGANG Jean Justin, Professeur (Université de Yaoundé I).

Cette thèse est authentique et n'a pas été présentée pour l'acquisition de tout autre diplôme ou grade universitaire.

Date, 16 JAN 2023

Noms et Signature de l'étudiante

YOUTE FANCHE Sandrine Aimée

Noms et Signature du Directeur de Thèse

ESSIA NGANG Jean Justin  
Professeur

# LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I

ANNEE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 31 OCTOBRE 2022

## ADMINISTRATION

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,  
*Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** :  
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

<b>1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)</b>			
<b>N°</b>	<b>NOMS ET PRÉNOMS</b>	<b>GRADE</b>	<b>OBSERVATIONS</b>
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	BOUDJEKO Thaddée	Professeur	En poste
3	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4	FOKOU Elie	Professeur	En poste
5	KANSCI Germain	Professeur	En poste
6	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
7	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE Gabin Boris	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
15	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
16	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS/UDs</i>
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste

22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargé de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
26	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
27	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
28	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargé de Cours	En poste
34	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Chargé de Cours	En poste
38	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (51)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UYY</i>
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINS ANTE</i>
14	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
15	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
16	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste

17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
19	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	NGUEMBOK	Maître de Conférences	En poste
24	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
25	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
28	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
29	DONFACK Mireille	Chargé de Cours	En poste
30	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
31	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
32	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
33	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
34	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
35	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
36	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
37	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
38	METCHI DONFACK Mireille Flaure Epe GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
39	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargé de Cours	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
41	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
42	NJUA Clarisse Yafi	Chargé de Cours	<i>Chef Division Uté Bamenda</i>
43	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargé de Cours	En poste
44	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
45	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
46	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48	AMBADA NDZENGUE Georgia Elna	Assistante	En poste
49	FOKAM Alvine Christelle Epe KEGNE	Assistante	En poste
50	MAPON NSANGO Indou	Assistant	En poste
51	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste
<b>3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)</b>			
1	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef Division/UYII</i>
2	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste

3	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
10	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC/UDla</i>
11	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
12	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
13	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT/MINRESI</i>
14	ONANA Jean Michel	Maître de Conférences	En poste
15	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargé de Cours	En poste
19	GONMADGE CHRISTELLE	Chargé de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	NSOM ZAMBO EPSE PIAL Annie Claude	Chargé de Cours	<i>En Détachement / UNESCO MALI</i>
26	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
27	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
28	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
32	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
33	MANGA NDJAGA Jude	Assistant	En poste

#### **4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (31)**

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
3	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>

4	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
5	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
6	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
7	NENWA Justin	Professeur	En poste
8	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS Univ. Ngaoundéré</i>
9	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
10	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
11	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KENNE DEDZO Gustave	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>CT/ MINPROFF</i>
19	NJOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
20	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
21	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
22	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
23	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
24	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
25	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
26	KOUOTOU DAOUA	Chargé de Cours	En poste
27	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
30	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
31	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste

#### **5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (38)**

1	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UYYI</i>
2	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>

6	WANDJI Jean	Professeur	En poste
7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
15	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK Carine	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de cellule MINRESI</i>
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
26	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargé de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargé de Cours	En poste
30	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
35	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
36	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
37	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste

#### **6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)**

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
6	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7	DJAM Xaviera YOUH – KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
15	OLE OLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur adjoint ENSET Ebolowa</i>
16	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
19	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
20	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
21	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
22	NZEKON NZEKO'O Armel Jacques	Assistant	En poste

### **7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (31)**

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes &amp; Diplômes/FS/UYI</i>
8	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
11	AGHOUEKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	BOGSO ANTOINE MARIE	Chargé de Cours	En poste
13	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste

15	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargé de Cours	En poste
21	OGADOA AMASSAYOGA	Chargé de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
26	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
27	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
30	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
31	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

#### **8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (22)**

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste
4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
8	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
10	BODA Maurice	Chargé de Cours	En position d'absence irrégulière
11	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
12	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
13	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
14	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
15	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargé de Cours	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
17	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste

18	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
19	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
20	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
21	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
22	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
<b>9. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE(PHY) (43)</b>			
1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
7	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
9	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
10	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
11	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/ IRGM/MINRESI</i>
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FS Univ/Bda</i>
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
23	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
26	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
27	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
28	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
29	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
30	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
31	EDONGUE Hervais	Chargé de Cours	En poste

32	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
33	MELI'I Joelle Larissa	Chargé de Cours	En poste
34	MVOGO Alain	Chargé de Cours	En poste
35	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	<i>Absente depuis Janvier 2022</i>
36	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
37	DJOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargé de Cours	En poste
38	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	En poste
39	TEYOU NGOUPOU Ariel	Chargé de Cours	En poste
40	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Assistant	En poste
41	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
42	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste
<b>10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)</b>			
1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / Uds</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
12	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
13	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef Département/Uté Maroua</i>
14	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
15	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
17	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste

19	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du Matériel/UYII</i>
20	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
21	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
22	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
23	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
24	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
25	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
26	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
27	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
28	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle	Chargé de Cours	En poste
31	MBESSE CECILE OLIVE	Chargé de Cours	En poste
32	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
33	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
34	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uté Maroua</i>
35	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
41	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
42	NGO'O ZE Arnaud	Assistant	En poste

### Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	08 (00)	14 (10)	15 (05)	02 (01)	<b>39 (16)</b>
BPA	14 (01)	11 (07)	22 (07)	04 (04)	<b>51 (17)</b>
BPV	06 (01)	10 (01)	16 (09)	01 (00)	<b>33 (11)</b>
CI	09 (01)	14 (04)	08 (01)	00 (00)	<b>31 (06)</b>
CO	06 (01)	20 (04)	08 (03)	04 (01)	<b>38 (09)</b>
IN	02 (00)	02 (00)	12 (01)	06 (00)	<b>22 (01)</b>
MAT	02 (00)	08 (00)	14 (01)	07 (01)	<b>31 (02)</b>
MIB	03 (01)	06 (02)	10 (03)	03 (02)	<b>22 (08)</b>
PHY	15 (01)	13 (02)	11 (03)	04 (00)	<b>43 (06)</b>
ST	07 (01)	16 (03)	18 (04)	01 (00)	<b>42 (08)</b>
<b>Total</b>	<b>72 (07)</b>	<b>114 (33)</b>	<b>134 (37)</b>	<b>32(07)</b>	<b>352 (84)</b>

Soit un total de **352 (84)** dont :

- Professeurs **72 (07)**
- Maîtres de Conférences **114 (33)**
- Chargés de Cours **134 (37)**
- Assistants **32 (07)**

( ) = Nombre de Femmes **84**

## **DEDICACE**

*A ma très grande Famille*

*“Celui qui aime la correction aime la science” Proverbes 12 :1*

## REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements vont à l'endroit...

Du **Pr ESSIA NGANG Jean Justin**, Chef du Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I, pour avoir accepté d'encadrer ce travail. Au regard de ce document, veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de ma très haute considération pour votre charisme, votre attention et votre dévouement ;

Du **Pr SADO KAMDEM Sylvain Leroy** et du **Dr TCHIKOUA Roger** pour la grande attention et la disponibilité accordées à ce travail ;

Du **corps enseignant** du Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I pour les enseignements reçus, l'encadrement, les conseils, le dynamisme et les encouragements tout au long de l'accomplissement de ce travail ;

Du **Pr MATEI Florentina**, du **Pr DIGUTA Camelia**, ainsi que de leur équipe de recherche pour avoir accepté de m'accueillir et mis tout en œuvre pour l'atteinte des objectifs relatifs à mon séjour de recherche au sein de la Faculté de Biotechnologies de l'Université des Sciences Agronomiques et de Médecine vétérinaire de Bucarest en Roumanie ;

Du **Pr SOL Vincent**, du **Pr LETOURNEAU Francois**, du **Pr OUK Tan-Sothea** et du **Pr SAAD Naïma** ainsi que leur équipe de recherche pour avoir accepté de m'accueillir et mis à ma disposition le nécessaire pour l'atteinte des objectifs relatifs à mon séjour de recherche au sein du Laboratoire PEIRENE, Antenne IUT de l'Université de Limoges en France ;

De l'**Agence Universitaire de la Francophonie Europe Centrale** en partenariat avec le **Gouvernement Roumain** au travers du programme « **Eugen Ionescu** » éditions **2017** et **2018**, pour avoir financé mon séjour de recherche en Roumanie ;

De l'**Agence Universitaire de la Francophonie Afrique Centrale et Grands Lacs** au travers de la **Première cohorte du Collège Doctoral Régional MATHINBIO 2018-2020**, ainsi que tout le **Comité de pilotage** de ce collège, pour le soutien à nous apporté pour la finalisation de ce travail et le financement de notre séjour de recherche en France ;

De la **Fondation International pour la Science / International Fondation for Science (IFS)** pour le financement lié à la réalisation d'une partie de ces travaux ;

De la **Fédération Evangélique Internationale des Amis du Cameroun (FEIAC)** pour le soutien financier qu'elle nous a accordé en 2020 et en 2021 ;

De M. **PAJIP Séraphin**, **AYEMELONG Jean**, de la famille **ABOUNA NANGA Philippe**, la Famille **NGOSSO BELINGA Faustin** et de la famille **MOUATOUNA NGODZO Jean Pierre**, Cacaoculteurs qui m'ont soutenu par l'approvisionnement en matière végétale ;

De M. **WOUAPI Antoine** et M. **BEBINE Didier** pour avoir participé à la réalisation de ce travail par leurs travaux de Master ; de M. **ETOUNDI Wilfried** et avec eux les membres du laboratoire de Microbiologie des promotions 2016 à 2022 pour leur soutien moral et d'assistance sur la paillasse ;

Du **Dr MESSI Nicolas** du Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé 1, **Dr BEDINE Marie Ampère** du Département de Biochimie et **FONKOU Delor** respectivement pour certaines analyses chimiques et pour l'élaboration de l'arbre phylogénétique ;

De mes aînés et ami(e)s du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I : **Dr TCHUENCHIEU Alex Dimitri**, **Dr NKOUDOU ZE Nardis**, **Dr NGOLONG NGEA Guillaume Legrand**, **Dr KEMEGNE Gislaine**, **Dr NKOUE Abraham**, **Dr EZO'O Fabrice**, **M. BONNY Patrice**, **Mlle MOBOU Estelle** , pour leur aide, leurs conseils, leur assistance et leur participation qui ont favorisé le bon déroulement de ce travail dans la sérénité et la convivialité ;

De mes ami(e)s : **M. WONKAM Guy Bertrand**, **M. MIBE Jules Osée**, **M. MOTCHEHE LEWE Jules**, **Mme FOMOU Olga Epouse FOKOU**, **Dr NGNAMEKO Corinne**, **Dr METSOPKENG Claire Epouse DONFAGSITELI**, **Mme FOKOU MAFO Adèle** , **Mlle NDAMASON Loveline**, et **Mlle ETIMBIL AMUGWA Lauraine** pour leurs encouragements et leurs soutiens multiformes.

Des grandes familles **FANCHE**, **KEMDJEU** et **SIMEU**, de la grande famille du **Culte d'enfants** en général et de la paroisse de Melen en particulier, du **CAMOTA**, pour le soutien financier, moral et spirituel.

Que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de cet ouvrage trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

# SOMMAIRE

<b>LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I.....</b>	<b>I</b>
<b>DEDICACE .....</b>	<b>XIII</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>XVI</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>XX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXI</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS.....</b>	<b>XXII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XXIV</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XXVI</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>XXVIII</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURES.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1. LE CACAO .....</b>	<b>4</b>
<b>I.1.1. Généralités sur le Cacao .....</b>	<b>4</b>
I.1.1.1 Origine et description du cacao.....	4
I.1.1.2. Culture et diversité du cacao.....	6
I.1.1.3. Production et importation mondiale du cacao .....	8
I.1.1.4. Le cacao et son utilisation.....	9
<b>I.1.2. De la cabosse au cacao marchand .....</b>	<b>12</b>
I.1.2.1. Récolte des cabosses .....	12
I.1.2.2. Ecabossage et extraction des fèves .....	13
I.1.2.3. Fermentation des fèves .....	13
I.1.2.4. Séchage des fèves fermentées.....	14
I.1.2.5. Stockage des fèves séchées.....	14
<b>I.2. LA FERMENTATION DES FEVES : UN PROCESSUS COMPLEXE.....</b>	<b>15</b>
<b>I.2.1. Importance de la fermentation des fèves.....</b>	<b>15</b>
<b>I.2.2. Méthodes de fermentation .....</b>	<b>16</b>
I.2.2.1. Fermentation en tas .....	16
I.2.2.2. Fermentation en caisse.....	16
I.2.2.3. Fermentation en sac .....	17
I.2.2.4. Fermentation en panier .....	17

<b>I.2.3. Mécanismes et microorganismes de la fermentation des fèves de cacao.....</b>	<b>17</b>
I.2.3.1. Mécanisme de la fermentation .....	17
I.2.3.2. Microorganismes de la fermentation .....	18
<b>I.3. CRITERES DE QUALITE DES FEVES DE CACAO ET RISQUES</b>	
<b>MICROBIOLOGIQUES ASSOCIES .....</b>	<b>23</b>
<b>I.3.1. Attributs et critères de qualité d’une fève de cacao .....</b>	<b>23</b>
I.3.1.1. Les attributs technologiques.....	23
I.3.1.2. Les attributs organoleptiques .....	23
I.3.1.3. Les attributs sanitaires.....	23
<b>I.3.2. Normes sur la qualité des fèves .....</b>	<b>25</b>
<b>I.3.3. Altération des fèves .....</b>	<b>26</b>
I.3.3.1. Facteurs favorisant la mycotoxinogénèse .....	27
I.3.3.2. Effet des mycotoxines sur la santé.....	29
I.3.3.3. Contamination des fèves et législation .....	32
<b>I.4. MOYENS DE LUTTE CONTRE L’ALTERATION FONGIQUE DES ALIMENTS</b>	
<b>.....</b>	<b>32</b>
<b>I.4.1. Moyens de lutte physique.....</b>	<b>33</b>
I.4.1.1 Avant la récolte .....	33
I.4.1.2. Après la récolte .....	33
<b>I.4.2. Moyens de lutte chimique .....</b>	<b>34</b>
<b>I.4.3. Moyens de lutte biologique .....</b>	<b>34</b>
I.4.3.1. Inhibition par les levures.....	35
I.4.3.2. Inhibition par les bactéries lactiques.....	36
I.4.3.3. Inhibition par d’autres microorganismes .....	38
<b>I.4.4. Principes actifs à l’origine de l’activité antimicrobienne.....</b>	<b>38</b>
I.4.4.1. Acides organiques.....	41
I.4.4.2. Acides gras.....	42
I.4.4.3. Composés protéiques .....	42
I.4.4.4. Reuterine .....	43
I.4.4.5. Diacetyl .....	43
I.4.4.6. Peroxyde d’hydrogène .....	43
I.4.4.7. Autres composés .....	44
<b>I.4.5. Facteurs influençant l’activité antimicrobienne dans la lutte biologique .....</b>	<b>44</b>
I.4.5.1. Facteurs intrinsèques.....	45

I.4.5.2. Facteurs extrinsèques .....	45
<b>I.5. Utilisation des starters comme moyen de stabilisation de la qualité des aliments .....</b>	<b>46</b>
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>48</b>
<b>II.1. MATERIEL.....</b>	<b>48</b>
<b>II.1.1. Souches microbiennes.....</b>	<b>48</b>
<b>II.1.2. Echantillons de cacao.....</b>	<b>49</b>
<b>II.2. METHODES .....</b>	<b>49</b>
<b>II.2.1. Criblage et identification des souches d'intérêt .....</b>	<b>50</b>
II.2.1.1. Criblage des bactéries lactiques à activité antifongique .....	51
II.2.1.2. Identification des souches des bactéries lactiques les plus actives.....	52
II.2.1.3. Criblage des levures à fort potentiel de production d'alcool.....	56
II.2.1.4. Identification des levures à fort potentiel de production d'alcool .....	57
<b>II.2.2. Recherche des familles de composés impliqués dans l'inhibition des moisissures et Influence des conditions de culture des BL sur l'inhibition.....</b>	<b>59</b>
II.2.2.1. Recherche des familles de molécules responsables de l'inhibition des moisissures par les BL .....	59
II.2.2.2. Impact des conditions de culture des BL sur l'inhibition des moisissures par leurs surnageants .....	64
<b>II.2.3. Mise au point d'un starter de fermentation des fèves de cacao.....</b>	<b>66</b>
II.2.3.1. Détermination des concentrations des microorganismes du starter.....	66
II.2.3.2. Essais d'application du starter durant la fermentation des fèves à différentes échelles de grandeurs .....	70
<b>II.2.4. Analyses statistiques .....</b>	<b>75</b>
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>76</b>
<b>III.1. RESULTATS .....</b>	<b>76</b>
<b>III.1.1. Isolats d'intérêt de la fermentation des fèves.....</b>	<b>76</b>
III.1.1.1. Bactéries lactiques isolées du milieu de fermentation des fèves de cacao.....	76
III.1.1.2. Activité antifongique des Bactéries Lactiques isolées .....	76
III.1.1.3. Identité des bactéries lactiques à meilleure activité antifongique .....	80
III.1.1.4. Levures à fort potentiel de production d'alcool .....	86
III.1.1.5. Identité des levures à meilleure production d'alcool .....	88
<b>III.1.2. Familles de composés impliqués dans l'inhibition de la croissance des moisissures et paramètres du milieu influençant l'activité inhibitrice .....</b>	<b>89</b>
III.1.2.1. Familles de composés antifongiques des moisissures.....	89

III.1.2.2. Effet des paramètres de culture des BL sur l'inhibition de <i>A. carbonarius</i> .....	95
<b>III.1.3. Impact d'un starter mixte levure-bactéries sur la qualité des fèves.....</b>	<b>101</b>
III.1.3.1. Concentrations des microorganismes du starter .....	101
III.1.3.2. Qualité des fèves fermentées à différentes échelles par le starter .....	110
<b>III.2. DISCUSSION .....</b>	<b>121</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>130</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>150</b>
<b>Liste des publications issues de la thèse .....</b>	<b>168</b>

## RESUME

La présence des moisissures et la mauvaise fermentation sont des paramètres qui influencent la qualité marchande et sanitaire des fèves de cacao. De la fermentation au stockage, les moisissures peuvent se développer sur les fèves, altérant ainsi leur qualité. Par ailleurs la durée de fermentation relativement longue conduit les cacaoculteurs à ne pas la respecter modifiant ainsi les qualités organoleptiques. Face à cette double préoccupation, l'exploitation des microorganismes intervenant dans la production des fèves de cacao a été explorée dans le cadre d'une lutte biologique. La recherche de bactéries lactiques (BL) inhibant la croissance des moisissures et celle des levures capables de réduire la durée de fermentation a été entreprise dans le but de mettre au point un starter. Pour cela, 28 BL isolées des fermentations de cacao ont été testées pour leurs activités antifongiques vis-à-vis de 10 moisissures du genre *Aspergillus* et *Penicillium*, principaux contaminants des fèves de cacao. Par ailleurs, 29 isolats de levures provenant du même milieu ont également été testés pour leur vitesse de production d'éthanol. Les isolats de BL et de levures présentant les meilleures activités ont été identifiés sur le plan génomique et les familles de molécules produites par les bactéries lactiques inhibant la croissance des moisissures ont été recherchées. Un isolat de chacun des genres microbiens les plus actifs a été retenu pour la mise au point d'un starter et cette coculture testée durant la fermentation des fèves de cacao. Des 28 isolats de BL dont l'activité antifongique variait entre 6,82% et 100%, 8 présentant des pourcentages d'inhibition moyens supérieurs à 40% ont été identifiés. Il s'agissait de *Weissella cibaria* (isolats A19, Ped2 et Lab10), *Enterococcus faecium* (isolats Ped3 et Lab11.2), *Pediococcus pentosaceus* (isolat Lab9), *Lactobacillus brevis* (isolat A21) et *Lactobacillus farciminis* (isolat Lab11.1) ; ce dernier isolat ayant la meilleure activité antifongique. Quant aux levures, 2 isolats ont produit les meilleures teneurs en alcool après 40 heures et ont été identifiés à *Saccharomyces cerevisiae* (isolat E24) et *Candida parapsilosis* (isolat E21). La recherche des composés bioactifs a montré que les acides organiques, les peptides et les protéines thermostables sont responsables de l'activité antifongique observée et que leur production a essentiellement été affectée par la teneur en sucre du milieu. Les essais d'utilisation des isolats de *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24) comme starter ont montré que la concentration de 6Log UFC/ g de chacune des souches permettait d'obtenir des taux d'inhibition de la croissance d'*A. carbonarius* NRRL 368 sur les fèves compris entre 84,58 et 95,58%; de réduire de 5 à 3 jours la durée de fermentation et d'obtenir des fèves de 1<sup>er</sup> grade dépourvues d'Ochratoxine A après 60 jours de conservation.

**Mots clés:** cacao, fermentation, moisissures, bactéries lactiques, levures, starter, lutte biologique, substances antifongiques, qualité.

## ABSTRACT

The presence of moulds and poor fermentation are parameters that influence the marketability and sanitary quality of cocoa beans. From fermentation to storage, moulds can develop on the beans, thus altering their quality. In addition, the relatively long fermentation time leads cocoa farmers to disregard it, thus altering the organoleptic qualities. Faced with this twofold concern, the exploitation of microorganisms involved in the production of cocoa beans was explored within the framework of biological control. The search for lactic acid bacteria (LAB) inhibiting the growth of moulds and yeasts capable of reducing the duration of fermentation was undertaken with the aim of developing a starter. For this purpose, 28 LAB colonies isolated from cocoa fermentations were tested for their antifungal activities against 10 moulds of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*, the main contaminants of cocoa beans. And 29 yeast isolates from the same medium were also tested for their ethanol production rate. The LAB and yeast isolates with the best activities were genomically identified and lactic acid bacteria molecules inhibiting the growth of moulds were searched for. One isolate from each of these most active microbial genera was selected for starter development and this co-culture was tested during cocoa bean fermentation. Of the 28 LAB isolates with activity ranging from 6.82% to 100%, 8 with average inhibition percentages above 40% were identified. These were *Weissella cibaria* (isolates A19, Ped2 and Lab10), *Enterococcus faecium* (isolates Ped3 and Lab11.2), *Pediococcus pentosaceus* (isolate Lab9), *Lactobacillus brevis* (isolate A21) and *Lactobacillus farciminis* (isolate Lab11.1); the latter isolate having the best antifungal activity. As for the yeasts, 2 isolates produced the best alcohol content after 40 hours and were identified as *Saccharomyces cerevisiae* (isolate E24) and *Candida parapsilosis* (isolate E21). The search for bioactive compounds showed that organic acids, peptides and heat-stable proteins were responsible for the observed antifungal activity and that their production was mainly affected by the sugar content of the medium. Trials using isolates *L. farciminis* (Lab11.1) and *S. cerevisiae* (E24) as starter showed that the concentration of 6Log UFC/ g of each strain allowed to obtain growth inhibition rates of *A. carbonarius* NRRL 368 on beans between 84.58 and 95.58%; to reduce the fermentation time from 5 to 3 days and to obtain 1<sup>st</sup> grade beans free of Ochratoxin A after 60 days of storage.

**Keys words:** cocoa, fermentation, moulds, lactic acid bacteria, yeasts, starter, biological control, antifungals substances, quality.

## LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP :</b>	Adénosine diphosphate
<b>AFSSA :</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>ARN<sub>t</sub> :</b>	Acide Ribonucléique de transfert
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate
<b>Aw :</b>	Activité de l'eau
<b>ATCC :</b>	<i>American Type Culture Collection</i> (Collection des cultures Type américaine)
<b>BL :</b>	Bactéries Lactiques
<b>BPA :</b>	Bonnes Pratiques Agricoles
<b>BSA:</b>	<i>Bovin serum Albumin</i> (Albumine de sérum bovin)
<b>°C :</b>	degré <i>Celsius</i>
<b>CE :</b>	Commission Européenne
<b>CIRAD:</b>	Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
<b>CAOBISCO :</b>	<i>Chocolate, Biscuit and Confectionery of Europe</i>
<b>CNUCED :</b>	Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement
<b>DNS:</b>	Dinitrosalicylique
<b>dNTP:</b>	Desoxyribonucléotide triphosphate
<b>DO:</b>	Densité optique
<b>ECA :</b>	<i>European Cocoa Association</i> (Association européenne du cacao)
<b>FAO :</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organisation de l'alimentation et de l'Agriculture)
<b>FCC :</b>	Federation of Cacao Commerce (Fédération du commerce du cacao)
<b>HPLC :</b>	<i>High performance liquid chromatography</i> (Chromatographie Liquide haute performance)
<b>IARC :</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agence Internationale pour la recherche sur le cancer)
<b>ICCO:</b>	<i>International cocoa organization</i> (Organisation International du Cacao)
<b>ISO :</b>	<i>International Standardisation Organism</i> (Organisme international de normalisation)
<b>K:</b>	Potassium
<b>Kgpc/jr:</b>	Kilogramme de poids corporel par jour
<b>Lev :</b>	Levure
<b>Log :</b>	Logarithme décimal
<b>MC :</b>	Milieu de culture
<b>MRS:</b>	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
<b>Na:</b>	Sodium
<b>NAD+:</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
<b>NADH :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
<b>NC:</b>	Normes camerounaises
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONCC :</b>	Office National du cacao et du café
<b>OTA :</b>	Ochratoxine A

<b>PCR:</b>	Polymérisation par chaîne de réaction
<b>PIB:</b>	produit intérieur brut
<b>PBS :</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampon Phosphate salin)
<b>PDA, PDB :</b>	<i>Potatoes Dextrose Agar, Potatoes Dextrose Broth</i>
<b>pH :</b>	Potentiel d'Hydrogène
<b>ppb:</b>	part per billion (partie par million)
<b>Réd. :</b>	Réducteur
<b>R<sup>2</sup> :</b>	Coefficient de détermination
<b>rpm :</b>	Rotation par minute
<b>SE :</b>	Standard Error (Erreur standard)
<b><i>Spp</i> :</b>	Sous espèce
<b>TMB :</b>	3, 3', 5, 5' - tétraméthylbenzidine
<b>UFC :</b>	Unité Formant Colonie
<b>UV:</b>	Ultraviolet
<b>%</b>	Pourcentage

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Production mondiale des fèves de cacao en milliers.....	8
Tableau II: Dix premiers importateurs de fèves de cacao.....	9
Tableau III: Composition moyenne des fèves sèches .....	10
Tableau IV: Activité biologique de quelques polyphénols rencontrés dans le cacao.....	11
Tableau V: Normes sur la classification du cacao marchand.....	25
Tableau VI: Teneurs maximales en ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg.....	32
Tableau VII: Liste de quelques souches bactériennes ayant le potentiel d'inhiber la croissance des moisissures toxigène.....	37
Tableau VIII : Quelques BL et leurs composés antifongiques .....	40
Tableau IX : Phases décrites pour l'amplification PCR par le couple d'amorces LacF/LacR des BL.....	55
Tableau X: Etapes décrites par le programme d'amplification de l'ADN des levures.....	58
Tableau XI: Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	62
Tableau XII: Plan expérimental contenant les valeurs réelles des niveaux testés.....	65
Tableau XIII: Plan expérimental contenant les valeurs réelles des niveaux testés des concentrations de levures et BL.....	67
Tableau XIV: Condition de réalisation de la droite d'étalonnage des sucres réducteurs.....	68
Tableau XV: Conditions des fermentations à différentes échelles.....	70
Tableau XVI: Conditions de réalisation de la droite d'étalonnage des sucres totaux... ..	72
Tableau XVII: Conditions de réalisation de la droite d'étalonnage des polyphénols totaux.....	73
Tableau XVIII: Pourcentage d'inhibition des moisissures par les bactéries lactiques.....	77
Tableau XIX: Caractéristiques microscopiques et biochimiques des BL sélectionnées.....	81
Tableau XX: Identité moléculaire des bactéries lactiques sélectionnées.....	84
Tableau XXI: Récapitulatif de la capacité de production d'alcool par les isolats de levures. ....	87
Tableau XXII: Profil de différenciation des isolats de levures en fonction des tailles des produits de digestion enzymatique.....	88
Tableau XXIII: Teneurs en acides organiques des surnageants des BL à meilleure activité antifongique.....	90
Tableau XXIV: Impact du lactate sur l'inhibition des moisissures.....	91

Tableau XXV: Teneur en protéines totales et révélation de la CCM des surnageants bruts de BL. ....	91
Tableau XXVI: Teneurs en protéines totales et activité des fractions des surnageants lyophilisés des BL.....	92
Tableau XXVII: Activité antifongique des surnageants des BL après traitement thermiques et enzymatiques.....	94
Tableau XXVIII: Concentrations cellulaires des BL (Log UFC/ ml) obtenues dans les conditions expérimentales.....	95
Tableau XXIX: Effet des différentes variables du milieu sur la croissance des BL.....	96
Tableau XXX: Pourcentage d'inhibition d' <i>A. carbonarius</i> par les surnageants issus des cultures des BL.....	99
Tableau XXXI: Effet des différentes variables testées sur le pourcentage d'inhibition d' <i>A. carbonarius</i> par les surnageants des BL.....	99
Tableau XXXII: Taux d'inhibition d' <i>A. carbonarius</i> en fonction des différentes concentrations en levures et BL.....	102
Tableau XXXIII: Concentration en sucres réducteurs du mucilage.....	103
Tableau XXXIV: Grade des fèves de cacao obtenues dans les conditions expérimentales.. ..	104
Tableau XXXV: Variation de la croissance des levures et des BL au cours de la fermentation à différentes échelles.....	112
Tableau XXXVI : Variation de la croissance des moisissures au cours de la fermentation à différentes échelles. ....	113
Tableau XXXVII: Taux d'inhibition obtenu avec la condition LLM des fermentations à différentes échelles.....	114
Tableau XXXVIII : Variation du pH et de la teneur en sucres du mucilage au cours des différentes fermentations.....	115
Tableau XXXIX: Variation de profil de température pendant les fermentations.....	116
Tableau XXXX: Variation du pH, de l'indice de fermentation et de la teneur en Polyphénols des fèves au cours de la fermentation à différentes échelles.....	117
Tableau XXXXI : Caractéristiques des fèves de cacao obtenues du test à la coupe.....	118
Tableau XXXXII : Quantité d'OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fèves fermentés et séchées) dans les différentes conditions.....	119

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Un cacaoyer portant des cabosses. ....	5
Figure 2. Des cabosses de cacao (A), et leur aspect interne (B).....	6
Figure 3. Variétés de cacao avec de gauche à droite : Criollo (A), Forastero (B) et Trinitario (C).....	6
Figure 4. Aspect des fèves : (A) structure interne, (B) après écabossage, (C) après séchage. 10	
Figure 5. Stockage des fèves de cacao : dans des sacs en jute (A), stockage hermétique expérimental pour le cacao- Cocoons™ (B), stockage hermétique expérimental pour le cacao-SuperGrainbag™ (C).....	15
Figure 6. Fermentation des fèves de cacao : tas (A), caisse (B) et sac (C).....	16
Figure 7. Activités microbiennes à l'extérieure des fèves durant la fermentation du cacao. ..	17
Figure 8. Réaction biochimiques à l'intérieur des fèves durant la fermentation du cacao .....	18
Figure 9. Formation de 2 molécules l'éthanol, de 2 molécules de CO2 ou du glycérol et à partir de la dégradation d'une molécule de glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas par les levures). ....	19
Figure 10. Les principales voies fermentaires des hexoses chez les bactéries lactiques (a- Voie homofermentaire, b-Voie hétérofermentaire). ....	21
Figure 11. Fèves contaminées par les moisissures.....	26
Figure 12. Structure de l'ochratoxine A .....	30
Figure 13. Mécanisme d'action à l'origine de l'activité antifongique de certains microorganismes .....	39
Figure 14. Aspect des cabosses de cacao hybrides <i>forastero-trinitario</i> (A) et leurs fèves fraîches (B) .....	49
Figure 15. Diagramme synoptique de réalisation du travail .....	50
Figure 16. Inhibition des moisissures par les bactéries lactiques en boîte de Petri .....	79
Figure 17. Fragments amplifiés des bactéries lactiques par les amorces LacF and LacR (340 bp)). ....	82
Figure 18. Arbre phylogénétique des séquences du gène cible de l'ARNr 16S des bactéries lactiques. ....	85
Figure 19. Arbre phylogénétique des séquences du gène cible de l'ARNr 16S des bactéries lactiques. ( <i>bootstrap</i> ) .....	86

Figure 20. Produits PCR des levures Cp, E21 et E24 amplifiés avec les amorces ITS1 et ITS4 et Produits de digestion enzymatique des levures codées Cp, E21 et E24 par les enzymes de restriction <i>HhaI</i> , <i>HinfI</i> , <i>HaeIII</i> et <i>DdeI</i> , M- Marqueur de taille.....	88
Figure 21. Migration des composées protéiques produites par les bactéries lactiques sur CCM après révélation à la Ninhydrine .....	92
Figure 22. Activité antifongiques des fractions obtenues à partir des surnageants des BL sur <i>P. citrinum</i> M8 et <i>A. carbonarius</i> NRRL368.. .....	93
Figure 23. Activité antifongique des surnageants de <i>L. farciminis</i> (Lab11.1) et <i>W. cibaria</i> (A19) exprimée par des auréoles d'inhibition au niveau des puits: .....	94
Figure 24. Variation de la charge des bactéries lactiques en fonction du pH et de la température : (A) <i>L. farciminis</i> (Lab11.1), (B) <i>W.cibaria</i> (A19).....	97
Figure 25. Inhibition d' <i>A. carbonarius</i> NRRL 368 par les surnageants de culture de <i>L. farciminis</i> (Lab 11.1) . .....	98
Figure 26. Variation du pourcentage d'inhibition d' <i>A. carbonarius</i> NRRL368 en fonction de la teneur en sucre et de la température du milieu de croissance de <i>L. farciminis</i> (Lab11.1) (A), <i>W. cibaria</i> (A19)(B). .....	100
Figure 27. Variation des moisissures durant la fermentation des fèves.....	102
Figure 28. Variation de l'acidité de la pulpe en fonction du temps de fermentation.....	104
Figure 29. Aspect visuel des fèves de cacao obtenues des différentes combinaisons de starters .....	106
Figure 30. Aspect des fermentations des fèves dans la condition LL (levure à 6Log, BL à 6Log) en comparaison au témoin naturel aux différents jours de fermentation. ....	108
Figure 31. Aspect des fermentations des fèves dans la condition LLM1 (levure à 6Log, BL à 6Log et Moisissure à 6Log) en comparaison à la conditionensemencée de moisissure (M). .....	110
Figure 32. Aspect des boîtes de Petri présentant les moisissures pendant la fermentation..	113

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1: Quelques matériels utilisés .....	150
Annexe 2: Moisissures cibles utilisées dans les tests d'antagonisme. ....	156
Annexe 3: Protocole d'extraction des ADN et Protocoles des mélanges réactionnels PCR .	157
Annexe 4: Courbes d'étalonnages. ....	160
Annexe 5: Cinétique fermentaire des isolats de levures .....	163
Annexe 6: Quelques étapes de la fermentation des fèves de cacao (10Kg).....	164
Annexe 7: Fermentation avec les starters en tas de 25Kg en milieu rural: .....	166



# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Le cacao est la troisième denrée la plus commercialisée dans le monde après le sucre et le café. Il occupe une place importante dans l'économie de nombreux pays et en particulier ceux d'Afrique. La production africaine de cacao représente environ 77 % de la production mondiale (**ICCO, 2021**). Cette production provient à 95% de petits exploitants qui cultivent en moyenne 2 à 5 hectares de plantations cacaoyères. On estime entre 5 et 6 millions le nombre de paysans qui travaillent dans les plantations de cacao et assurent la subsistance de leurs familles élargies soit environ 50 millions de personnes dans le monde qui dépendent de la filière cacao (**Hutz-Adams et al., 2017**). Quatrième producteur mondial après la Côte d'Ivoire, le Ghana et l'Indonésie, le Cameroun produit 280000 tonnes qui représentent les 5,5% de la production mondiale (**ICCO, 2021**). Les exportations de cacao représentent près de 3% du produit intérieur brut (PIB) national et 15% du PIB du secteur primaire (**WCF, 2010**).

Le cacao camerounais est très recherché sur le marché mondial, pour ses propriétés organoleptiques notamment sa couleur rouge brique très appréciée dans l'un de ses produits dérivés qu'est la poudre de cacao. Malgré cet atout, une importante quantité de la production de cacao camerounais est dépréciée pour sa contamination par les moisissures, la présence de leurs mycotoxines, le faible niveau de fermentation des fèves, qui diminuent la valeur économique et sanitaire des fèves, réduisant par conséquent les revenus des agriculteurs (**Xinhua, 2011 ; Hutz-Adams et al., 2017**).

La mauvaise qualité des fèves demeure la préoccupation principale des producteurs de cacao en Afrique en général et au Cameroun en particulier. Celle-ci est attribuée aux mauvaises pratiques post-récolte qui conduisent à l'altération de la qualité des fèves (**Hutz-Adams et al., 2017**). Ce d'autant plus que les cacaoculteurs camerounais obtiennent généralement des fèves de Grade 2 au cours de certaines récoltes en raison des conditions climatiques défavorables. En effet, la fermentation des fèves de cacao est une opération principalement conduite par les levures qui produisent l'éthanol, les bactéries lactiques et acétiques qui produisent les acides lactiques et acétiques qui migrent dans la fèves et contribuent à leur bonne qualité.

Pour améliorer cette qualité, des équipes de recherche se sont intéressées au développement de starters microbiens composés d'une à trois souches microbiennes de levures, de bactéries lactiques et ou de bactéries acétiques (**Lefeber et al., 2012 ; Cempaka et al., 2014 ; Kresnowati et Febriami, 2015 ; Visintin et al., 2017**), et sur l'exploitation des métabolites de fermentation tels que les acides lactique et acétique (**Eyamo et al., 2016**) comme moyen de maîtrise et de stabilisation de la qualité des fèves de cacao. Ces travaux se sont essentiellement

orientés vers la biosynthèse des molécules aromatiques recherchées par les producteurs du chocolat. Mais très peu se sont intéressés à la lutte contre le développement des moisissures, qui constitue une autre source de dépréciation des fèves, en association avec la réduction de la durée de fermentation. En effet, la présence des moisissures sur les fèves de cacao est très préoccupante pour toute la chaîne de valeur du cacao. Ces microorganismes dont le développement débute durant la fermentation principalement lorsque celle-ci est longue altèrent non seulement la qualité marchande mais constituent également un danger potentiel pour la santé de l'Homme et des animaux de par la synthèse des mycotoxines dont les effets cancérogènes, tératogènes, néphrotoxiques et immunotoxiques sont établis (**Jiang et al., 2014**). Ce danger est d'autant plus important que ces molécules sont thermostables et peuvent se retrouver à tous les stades de la chaîne de transformation. La principale mycotoxine recherchée dans les fèves de cacao demeure l'Ochratoxine A produite par certaines moisissures du genre *Aspergillus* et *Penicilium*.

L'utilisation des pesticides et des fongicides ne pouvant être acceptée dans le traitement des fèves de cacao, l'approche de la lutte biologique qui se veut soucieuse de l'environnement et des exigences du marché devient une voie à explorer pour réduire la contamination des fèves par les moisissures.

A cet effet, des études ont montré d'une part que les bactéries lactiques isolées de différents milieux dotées de propriétés antimicrobiennes peuvent être utilisées pour la conservation de certains aliments (**Ström et al., 2005 ; Salas et al., 2017**). Et d'autre part que, la qualité des fèves de cacao dépend de l'activité des levures et des bactéries au cours de la fermentation (**Ouattara et al., 2008 ; Ho et al., 2014 ; De Vuyst et Weckx., 2016**).

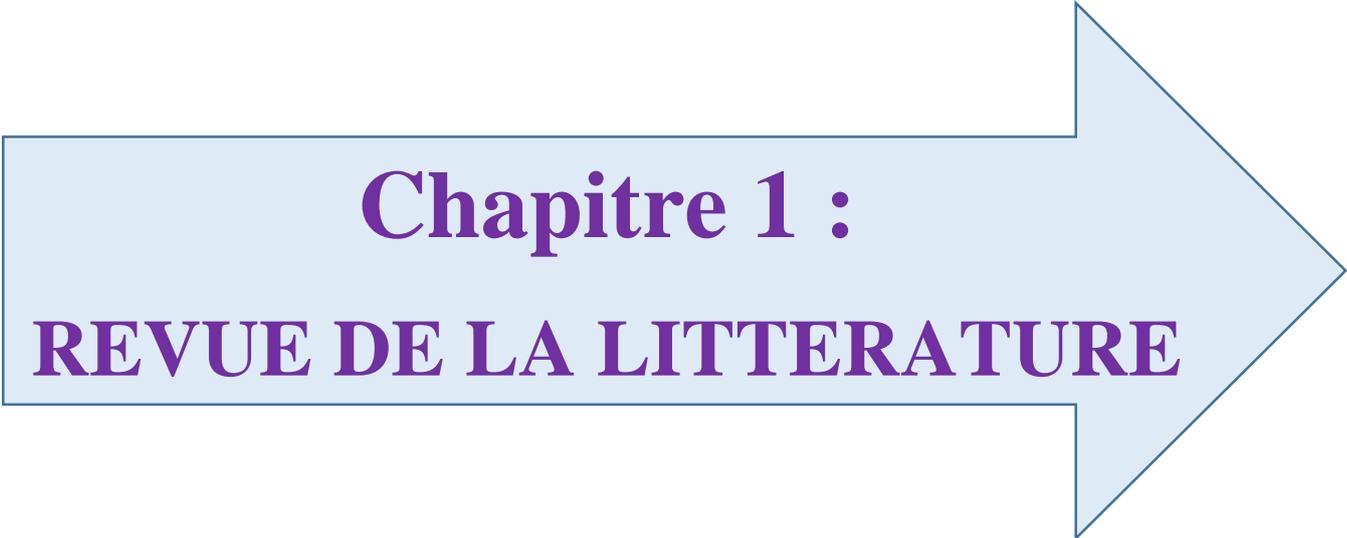
De ce qui précède, les questions suivantes peuvent être posées : Les microorganismes impliqués dans la fermentation des fèves de cacao peuvent-ils réduire la croissance des moisissures et la durée de fermentation? si tel est le cas, ceux-ci peuvent-ils être exploités pour améliorer la qualité des fèves ? Pour apporter des éléments de réponses à ces questions, les hypothèses suivantes ont été formulées :

- La flore microbienne de fermentation des fèves de cacao regorge des bactéries lactiques aux propriétés antifongiques et des levures à fort potentiel de production d'alcool ;
- Les paramètres du milieu de fermentation des fèves de cacao influencent l'activité antifongique des bactéries lactiques ;

- L'utilisation des bactéries lactiques aux propriétés antifongiques et des levures à forte production d'alcool améliorent la fermentation des fèves de cacao et par conséquent leur qualité.

Cette étude a donc été entreprise pour vérifier ces hypothèses, avec pour objectif général d'inhiber la croissance des moisissures ochratoxinogènes par les bactéries lactiques aux propriétés antifongiques et la durée de fermentation par des levures à forte production d'alcool. De façon spécifique, il a été question de (d'):

- Cribler les souches d'intérêt de la fermentation des fèves de cacao à savoir les bactéries lactiques à forte activité antifongique et les levures à fort potentiel de production d'alcool ;
- Rechercher les familles de composés impliqués dans l'inhibition des moisissures et l'influence des facteurs du milieu de culture sur l'activité antifongique ;
- Evaluer la qualité des fèves fermentées par un starter mixte de levure à fort potentiel production d'alcool et de bactérie lactique à forte activité antifongique.



**Chapitre 1 :**  
**REVUE DE LA LITTERATURE**

# CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

## I.1. LE CACAO

### I.1.1. Généralités sur le Cacao

#### I.1.1.1 Origine et description du cacao

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* Linnaeus) est un arbre cultivé dans les zones à climat chaud et humide. Il est originaire des régions tropicales d'Amérique centrale et du Sud. C'est la plus importante plante des vingt-deux espèces de la famille des Malvacées et la seule à être cultivée pour la valeur économique de ses fèves (Kongor *et al.*, 2016).

Au XVI<sup>ème</sup> siècle, les fèves de cacao étaient traditionnellement utilisées par les indigènes Aztèques et Mayas du Mexique et d'Amérique centrale. Ainsi, les nobles indiens Mayas les consommaient dans une boisson appelée « *Xocoatl* » et principalement lors des cérémonies religieuses (Harwich, 2008 ; Louis *et al.*, 2009). Les Aztèques, qui ne la consommaient pas dans un cadre rituel, diffusèrent la fève dans d'autres régions du Mexique (Harwich, 2008). Ces deux peuples l'utilisaient également comme élément de troc ou monnaie d'échange. Les espagnols, qui découvrirent le cacao pour la première fois dans les Caraïbes en 1494 l'appelèrent « *Theobroma cacao* » ce qui signifie « nourriture des dieux ». Ils ne fixèrent leur attention sur la fève qu'à partir de la conquête du Mexique et adaptèrent la recette de la boisson à leur goût, ce qui eut un immense succès au sein de l'élite coloniale. Après cette colonisation, le cacao fut exporté en Europe où il y est consommé sous forme de breuvage et de confiseries (Méndez et Agueda, 1998).

La classification systématique phylogénétique du Cacaoyer est la suivante :

Domaine : *Eukaryote*  
Règne : *Plantae*  
Embranchement : *Spermatophyte*  
Sous-phylum : *Angiospermae*  
Classe : *Dicotylédones*  
Ordre : *Malvales*  
Famille : *Malvacées*  
Genre : *Theobroma* L.  
Espèce : *Theobroma cacao* L.

Le cacaoyer (Figure 1) présente des exigences écologiques particulières. Il est une espèce typiquement tropicale car il a besoin d'un optimum de température compris entre 25 à 30°C et une humidité d'environ 85% (CNUCED, 2016). Cette plante s'adapte à une diversité

de sols avec un optimum de croissance et de production sur des sols argilo-limoneux, des pH acides autant que basiques mais, ne supporte pas l'engorgement (**Prakash *et al.*, 2011**).

A l'âge adulte, le cacaoyer mesure entre 5 et 10 mètres. Il entre en production et reste généralement productif pendant vingt ans. Il porte simultanément des fleurs, des chérelles (petites cabosses en développement), des fruits sur le tronc et les branches principales (**Figure 1**). Les fleurs pollinisées se développent sur une période de cinq à six mois pour donner des cabosses (**Moujouenpou, 2008 ; Kongor *et al.*, 2016**). Il vit en moyenne entre 30 et 40 ans (**CNUCED, 2016**).

Les fleurs sont de couleur rose et/ou blanche en fonction de la variété et les gousses poussent directement à partir du tronc et des branches principales. Comme la plupart des plantes tropicales, les fleurs sont présentes toute l'année mais apparaissent en abondance avant le début de la saison pluvieuse. La plupart des fleurs avortent et seule une petite proportion d'entre elles se développent en fruits sur une période d'environ cinq mois.



**Figure 1.** Un cacaoyer portant des cabosses.

Le fruit du cacaoyer est une baie, qui est appelée chérelle au début de son développement, puis cabosse à maturité (**Figure 2**). Les fruits matures (cabosses) en forme de melon, sont durs, mesurent entre 15 et 20 cm de long, et pèsent entre 380 g et 450 g. Ils contiennent 30 - 40 graines (fèves) équivalents à 100 g, entourées d'un mucilage sucré, acidulé et fixées sur un rachis central. La graine comporte deux cotylédons et une radicule entourée par la testa (**Schwan, 1996 ; Kongor *et al.*, 2016 ; CNUCED, 2016**).

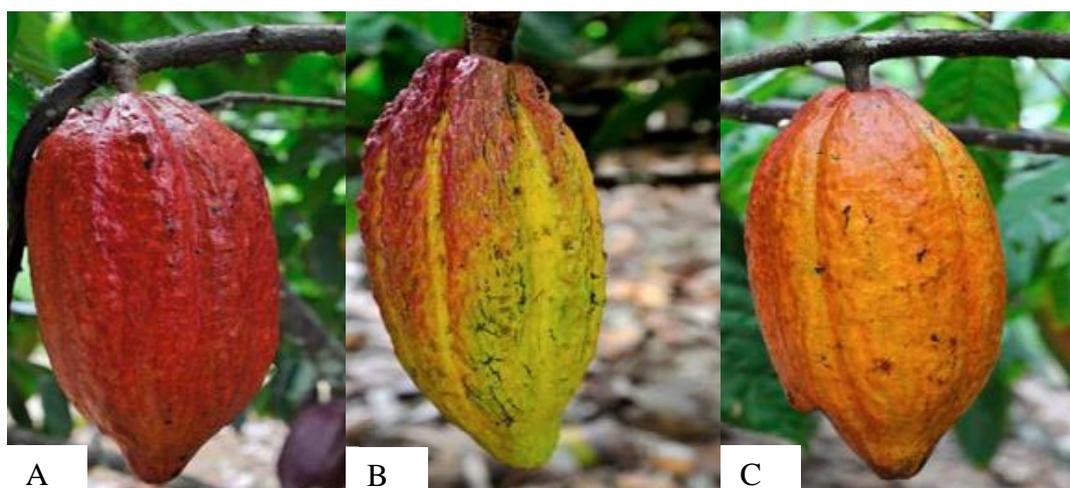


**Figure 2.** Des cabosses de cacao (A), et leur aspect interne (B) (Youté, 2017)

### I.1.1.2. Culture et diversité du cacao

Aujourd'hui, la zone de culture du cacao s'est étendue aux Caraïbes, en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Le cacao est cultivé sur plus de 70 000 km<sup>2</sup>. Il pousse du niveau de la mer jusqu'à une altitude de 700 mètres et prospère bien sous des températures comprises entre 21 et 23°C, et doit être à l'abri du soleil et du vent, en particulier aux premiers stades de sa croissance (Kongor *et al.*, 2016).

Comme de nombreuses espèces répandues en Amazonie, le cacaoyer présente une très grande diversité. Cette diversité repose sur les caractéristiques morphologiques des cabosses ou des graines. Seules les fleurs sont morphologiquement peu variables. On distingue trois grandes variétés de *Theobroma cacao* L. : le *criollo*, le *forastero* et le *trinitario*. Ces variétés sont illustrées par les fruits de la **Figure 3**.



**Figure 3.** Variétés de cacao avec de gauche à droite : Criollo (A), Forastero (B) et Trinitario (C) (Berbiye, 2014).

➤ **Le criollo**

Cette espèce est cultivée dans la zone méso-américaine (Mexique, Nicaragua, Guatemala, Colombie, Venezuela), dans l'Arc antillais, à Madagascar, au Sri Lanka, en Indonésie et aux îles Samoa. Il ne représente que 1 à 5% de la production mondiale, à cause de sa sensibilité aux maladies et au stress liés aux conditions écologiques (Nestlé, 1999 ; Prabhakaran, 2010). C'est un cacao de très bonne qualité. Les cabosses mûres sont rouges ou jaunes, fortement ridées, visiblement pointues, avec un péricarpe verruqueux et mince. Les graines sont larges, dodues et le plus souvent rondes avec des cotylédons blancs ou violets pâles, de goût légèrement amer, et donne un chocolat aux arômes fins (Prabhakaran, 2010). Sa durée de fermentation va de 2 à 3 jours.

➤ **Le forastero**

Il est originaire de la haute Amazonie (Pérou, Equateur, Colombie). Mais, il est aujourd'hui très cultivé dans les pays producteurs et représente plus de 80 % de la production mondiale de cacao (CNUCED, 2016). Il donne un rendement élevé et est résistant au stress écologique. Il est rencontré dans le bassin amazonien (Brésil) et en Afrique de l'Ouest (Mounjouenpou, 2008). Les cabosses mûres sont jaunes, ni pointues ni verruqueuses, avec une surface lisse, des extrémités arrondies et un péricarpe épais. Les graines sont aplaties et constituées de cotylédons noirs violets fortement pigmentés, avec un goût amer (Prabhakaran, 2010 ; Sahoré *et al.*, 2013 ; Kongor *et al.*, 2016 ; Tankou, 2016). Sa durée de fermentation va de 5 à 10 jours.

➤ **Le trinitario**

C'est un hybride biologique issu du croisement génétique naturel entre *Criollo* et *Forastero*. Il représente 10 à 15 % de la production mondiale (CNUCED, 2016). Cette variété est recherchée pour la fabrication des poudres et est cultivée aujourd'hui dans tous les pays où furent autrefois cultivés le *criollo* (Mexique et Amérique Centrale, Trinidad, Venezuela, Colombie). Également présent en Afrique, le Cameroun est le premier pays où les *trinitario* ont été introduits massivement (Mounjouenpou, 2008). Les cabosses sont de formes diverses, de couleur intermédiaire entre le rouge et le jaune à maturité. Les cotylédons des fèves sont plus ou moins violets (Prabhakaran, 2010). Sa durée de fermentation est de 3 à 5 jours.

De ces grands groupes sont nés par croisement des hybrides fertiles qui constituent la majorité des cultivars utilisés en plantation au Cameroun et ailleurs (Moujouenpou, 2008).

### I.1.1.3. Production et importation mondiale du cacao

L'économie de nombreux pays dépend de leur production cacaoyère. Le cacao occupe la 3<sup>ème</sup> place après le sucre et le café dans le marché mondial des matières premières. La majorité du cacao produit (près de 90%) provient de petites exploitations familiales estimées à près de 6,5 millions de fermes dont la superficie est généralement comprise entre 2 à 5 hectares (CNUCED, 2016). Aujourd'hui, la production mondiale de cacao est estimée à environ 4,5 millions de tonnes (**Tableau I**), dont 77% proviennent d'Afrique, 17% d'Amérique centrale et du Sud, 5 % d'Asie. Les principaux producteurs mondiaux de fèves de cacao sont la Côte d'Ivoire, le Ghana, l'Indonésie, l'Équateur, le Cameroun et le Nigeria. Le Cameroun contribue à environ 5,5% de la production mondiale (CNUCED, 2016 ; ICCO, 2018).

**Tableau I:** Production mondiale des fèves de cacao en milliers (ICCO, 2018 ; ICCO, 2021)

	2015/2016		2016/2017		2017/2018		2018/2019		2019/2020		2020/2021	
<b>Afrique</b>	2911	73,4 %	3365	73,9 %	3504	75,9 %	3642	76,2 %	3566	75,4 %	3871	77,1 %
Cameroun	211		246		250		280		280		290	
Cote d'Ivoire	1581		2020		1964		2154		2105		2225	
Ghana	778		969		905		812		800		850	
Nigeria	200		245		255		270		250		270	
Autres	141		135		130		126		131		136	
<b>Amerique</b>	657	16,6 %	766	16,8 %	789	17,1 %	846	17,7 %	890	18,8 %	875	17,4 %
Brésil	140		174		204		176		201		180	
Equateur	232		290		285		322		328		340	
Autres	285		306		300		349		360		355	
<b>Asie et Océanie</b>	397	10,0 %	421	9,2%	325	7%	293	6,1%	272	5,8 %	278	5,5%
Indonesie	320		270		240		220		200		200	
Papouasie	36		38		40		30		30		35	
Nouvelle Guinée												
Autres	41		50		45		43		42		43	
<b>Production Mondiale totale</b>	3965	100 %	4552	100 %	4618	100 %	4781	100 %	4728	100 %	5024	100 %

Le cacao arrive en Afrique continentale à partir des îles de Sao Tomé, au Ghana en 1879, au Cameroun en 1887, au Nigeria en 1890 et en Côte d'Ivoire en 1895. Au Cameroun, il est introduit par l'administration allemande. La croissance de la production est régulière mais lente : de 5 000 tonnes avant la première guerre mondiale, la production a augmenté jusqu'à 131 000 tonnes en 2000 et 250 000 tonnes à nos jours (Assoumou, 2011).

L'agriculture joue un rôle important et stratégique dans la relance de l'économie nationale camerounaise et le cacao y reste une culture d'exportation majeure. On estime que 90% de la population rurale est engagée dans l'agriculture à petite échelle. Ainsi, le secteur cacao et café du Cameroun représente 3% du produit intérieur brut (PIB) national et 15% du PIB du secteur primaire. Par ailleurs, le cacao représente 30% des exportations non pétrolières du Cameroun. La

ceinture cacaoyère camerounaise représente environ 37% du sol total cultivé du pays et est en expansion rapide avec l'intérêt croissant de nombreux jeunes pour cette culture commerciale. Environ 50% des fèves de cacao du Cameroun proviennent du Sud-Ouest, 35% du Centre et 15% des Régions du Sud-Est (**Hutz-Adams et al., 2017**).

Le cacao produit dans les différents bassins de production mondiaux est majoritairement destiné à une transformation après importation par les grands pays producteurs de produits dérivés qui sont rassemblés dans le **Tableau II**. Cependant de très faibles quantités sont transformées au niveau local.

**Tableau II:** Dix premiers importateurs de fèves de cacao (**Statista, 2021**)

Pays	Valeurs des importations en millions de Dollars américains 2020	Valeurs des importations en millions de FCFA 2020
Pays –bas	2 375,92	133 679 404
Etats-Unis	1 026,93	57 779 466
Allemagne	776,86	43 709 460
France	458,72	25 809 545
Royaume-Uni	312,79	17 598 901
Italie	302,29	17 008 126
Espagne	261,96	14 738 988
Canada	259,33	14 591 013
Belgique	223,43	12 571 125
Suisse	139,81	7 866 307

#### **I.1.1.4. Le cacao et son utilisation**

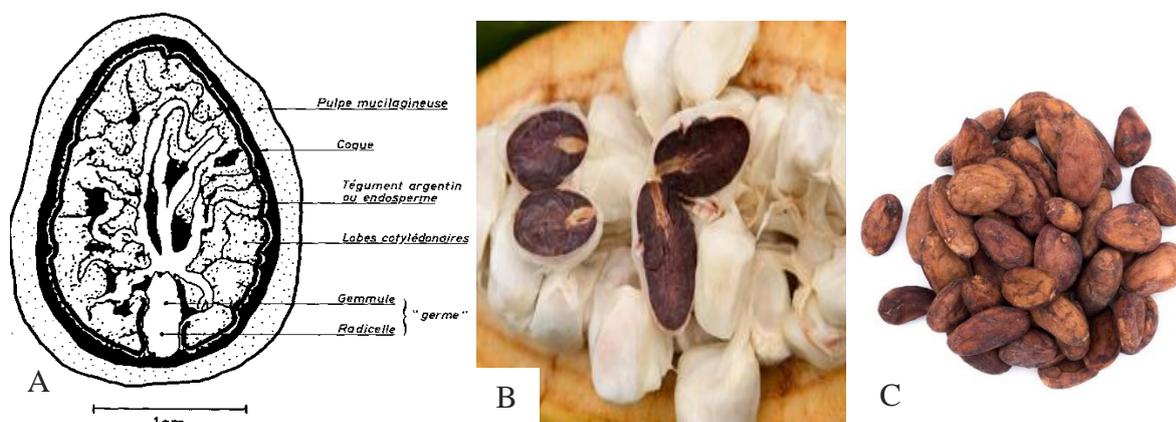
Le cacao est une culture économique hautement compétitive et lucrative en termes de génération de revenus parmi les autres activités agricoles sur les marchés mondiaux (**CNUCED, 2016**). Il est cultivé principalement pour ses fruits (cabosses) dont le mucilage et principalement les graines sont exploitées à diverses fins. En effet, l'intérieur de la cabosse comprend : la pulpe et les fèves.

##### **❖ La pulpe**

Les graines sont entourées de la pulpe blanche constituée d'un mucilage riche en eau (80 %), glucides (environ 5% de fructose, 5% de saccharose, 5% de glucose), acide citrique (0,2%), pectine (1,5%), protéines (1,5%), pour un pH compris entre 3 et 5. A partir de la pulpe, on peut préparer des boissons rafraichissantes aromatisées, de la confiture, des gelées, du vin ou du vinaigre, et du jus frais (**Kone, 2000**).

## ❖ Les fèves

Les fèves sont les graines présentes dans les cabosses de cacao (**Figure 4**). Elles sont recouvertes d'un mucilage blanc à la sortie de celles-ci et prennent une couleur maron après fermentation.



**Figure 4.** Aspect des fèves : (A) structure interne, (B) après écabossage, (C) après séchage.

Ces fèves sèches, dont la composition est résumée dans le **Tableau III**, sont principalement faites de matières grasses, de glucides, de protéines et de composés phénoliques.

**Tableau III:** Composition moyenne des fèves sèches (ICCO, 2001)

Elements	Amandes de fèves de cacao sèches (%)
Eau	5-8 %
Matières grasses	45- 56 %
Matières protéiques	12-18 %
Matières glucidiques	13-15 %
Théobromine	1 - 3 %
Cendres	2 - 5 %
Caffeine	0,5-0,8 %
Composés phénoliques	5-10 %

Les fèves fermentées et séchées sont transformées et commercialisées soit sous forme de produits bruts (fèves), soit sous forme de produits dérivés (liqueur, pâte, beurre, tourteaux et poudre) ; lesquels seront transformés en produits finaux, majoritairement le chocolat et les confiseries, mais aussi en produits cosmétiques et pharmaceutiques (CNUCED, 2016 ; Kone, 2000).

➤ **En Industrie alimentaire**

Le chocolat est le produit final qui consomme plus de 90% de cacao marchand. Il est suivi de la poudre de cacao utilisée comme arôme dans les produits tels que : biscuits, crèmes glacées, les boissons lactées et les diverses pâtisseries (Kone, 2000).

➤ **En Industrie pharmaceutique**

La forte teneur en flavonoïdes, surtout en catéchine et épicatechine, confère au cacao des propriétés antioxydantes qui permettent de réduire les risques de maladies cardiovasculaires et les maladies coronariennes en facilitant l'élasticité des vaisseaux sanguins (Hii *et al.*, 2009 ; Zainal *et al.*, 2016). Il a sensiblement les mêmes effets antiplaquettaires que l'aspirine. Le beurre de cacao est utilisé pour la fabrication des suppositoires et des crèmes médicamenteuses grâce aux propriétés biologiques des polyphénols qu'il renferme (Tableau IV).

**Tableau IV:** Activité biologique de quelques polyphénols rencontrés dans le cacao (Gresele *et al.*, 2011).

Composés phénoliques	Activité biologique
Acides phénoliques	Antifongique, antibactérienne et antioxydante
Tannins	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, effet antidiarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur
Flavonoïdes	Antitumorale, anti-carcinogène, anti-inflammatoire, antioxydante, anti-allergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur et diurétique
Coumarines	Anticoagulante, antioxydante, protectrice vasculaire, et antiœdémateuse
Anthocyanes	Protectrice capillaro-veineux, antioxydante
Proanthocyanidines	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydante, anti tumorale antifongique et anti-inflammatoire
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydant
Lignanes	Anti-inflammatoire, analgésique

➤ **En Industrie cosmétique**

Le beurre de cacao est utilisé en cosmétique pour la fabrication des rouges à lèvres, des crèmes pour les mains, des lotions pour la peau, et des savons, grâce à sa richesse en acide gras, en phospholipides (qui structure l'épiderme, hydrate et consolide la barrière cutanée), en polyphénols (qui freine le vieillissement de la peau), et en tanins (ce qui lui confère la propriété de serrer les muqueuses et raffermir la peau). Sa forte teneur en composés phénoliques est un

atout exploité dans la fabrication des produits luttant contre la production des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau (**Kebbab, 2014**).

#### ❖ **Valorisation des cabosses vides**

Après retrait des fèves des cabosses, ces dernières sont généralement jetées dans les plantations entre les pieds de cacaoyers où elles pourrissent sans qu'elles ne touchent les pieds pour éviter leur contamination par les moisissures à l'exemple de *Phytophthora* qui détruisent les arbres. Cependant, des technologies sont mises en place pour valoriser ces déchets à travers la production de la potasse, des aliments destinés à l'alimentation animale, la production des biocarburants, de papier et la fabrication des engrais organiques (compost) (**Adabe et Ngo-Samnack, 2014**).

### **I.1.2. De la cabosse au cacao marchand**

Le cacao marchand, communément appelé « cacao » ou « fèves de cacao », est obtenu après récolte des cabosses, suivie des opérations unitaires que sont l'écabossage et l'extraction des fèves humides, le transport (des cabosses ou des fèves humides), la fermentation, le séchage des fèves fermentées, et leur stockage.

#### **I.1.2.1. Récolte des cabosses**

Elle a lieu à maturité des fruits afin d'assurer un maximum de flaveur. Une récolte tardive entraîne des risques de pourriture et de germination des fèves tandis qu'une récolte précoce diminue le rendement par production excessive de fèves violettes ou ardoisées. En général, la récolte au Cameroun se fait en deux périodes :

- La récolte principale (grande récolte) où les fèves sont plus grosses et plus abondantes (Septembre à Décembre) ;
- La récolte intermédiaire, encore appelée "petite récolte" qui s'étend sur le reste de l'année (**CNUCED, 2016**).

Durant ces périodes, les cabosses sont cueillies à intervalles de temps réguliers de 10 à 15 jours, pendant environ 3 semaines. La cueillette se fait par section franche du pédoncule à l'aide d'un couteau ou d'une machette bien affûtée pour les cabosses accessibles. Pour les cabosses hautes, un émondoir (outil spécial, aux bords très tranchants) monté à l'extrémité d'une longue perche est utilisé (**Moujouenpou, 2008 ; Adabe et Ngo-Samnack, 2014**). Elle doit être faite de sorte à ne blesser ni la cabosse, ni la branche qui porte la cabosse pour éviter une attaque précoce par les moisissures.

### **I.1.2.2. Ecabossage et extraction des fèves**

L'écabossage est une opération manuelle qui consiste à fendre la cabosse à l'aide d'une machette ou d'un gourdin pour retirer les fèves sans les blesser et doit avoir lieu moins d'une semaine après la récolte. Il se fait généralement en groupes de plusieurs personnes souvent organisés en coopérative. Avant l'écabossage, les cabosses doivent subir un tri afin d'éliminer les cabosses physiquement contaminées. Malheureusement, ce n'est pas toujours le cas. En général, il a toujours lieu dans la plantation ou en bordure de celle-ci. Mais, elle peut également se faire à la maison en raison des multiples coups de vol en champ. A l'écabossage, l'humidité des fèves varie entre 65 % et 80 % pour un poids de 900 kg/m<sup>3</sup> (**Amani, 2014**). Le gourdin est l'outil le plus conseillé car la machette peut endommager les fèves. L'usage d'outil tranchant (machette), bien que très répandu dans tout les bassins de productions, est à proscrire afin de ne pas détériorer les graines en les blessant et facilitant ainsi l'infiltration des moisissures (**Moujouenpou, 2008**).

### **I.1.2.3. Fermentation des fèves**

Le goût amer et l'astringence des fèves de cacao font que celles-ci ne peuvent pas directement être consommées après l'écabossage. De ce fait, elles sont soumises au processus de fermentation. La fermentation est l'étape primordiale du traitement post-récolte du cacao. Elle débute naturellement 24 heures au plus tard après l'écabossage. Elle est la conséquence du métabolisme de plusieurs microorganismes provenant des insectes, des mains des travailleurs ou du matériel utilisé (feuilles de bananiers, caisses). La durée de fermentation dépend des conditions climatiques, de la région, de la variété de cacao, du degré de maturité de la cabosse, et de la masse de fèves mise à fermenter. Elle a une durée variable de 2 à 10 jours (**Schwan et Fleet 2014 ; De Vuyst et Weckx, 2016**). Pendant cette opération, un accroissement de la température pouvant atteindre 45-50°C est observé au milieu de la masse de cacao. En général, un brassage est effectué au bout de 48 heures et peut être renouvelé au besoin afin d'homogénéiser les fèves. Les quantités nécessaires pour la fermentation varient de quelques kilos à plusieurs tonnes. Toutefois, il est préférable de partir d'au moins 25 kg de fèves afin de minimiser les variations de température.

Cette fermentation est un procédé microbiologique essentiellement conduite par les levures, les bactéries lactiques, les bactéries acétiques et les bactéries sporulantes (**Schwan et Weals, 2004 ; Kostinek et al., 2008 ; Ouattara et al., 2017**). Cependant d'autres

microorganismes tels que les moisissures peuvent y prendre part même si leur intervention n'est pas souhaitable pour la qualité du cacao.

#### **I.1.2.4. Séchage des fèves fermentées**

Après la fermentation, vient l'étape de séchage qui permet de ramener la teneur en eau des graines fermentées de 80 % à environ 7% de manière à assurer au cacao de bonnes conditions de conservation durant le stockage et le transport (**Sandoval et Barreiro, 2002 ; Zahouli et al., 2010**). Le séchage permet aussi de stopper la plupart des réactions fermentaires et est en partie responsable du déclenchement de la réaction de Maillard dont la conséquence est la formation des précurseurs de l'arôme cacao et le brunissement des fèves (**Cros, 1995 ; Kongor et al., 2016**). La température de séchage doit être inférieure à 60°C pour favoriser la continuité du développement de ces arômes. Deux méthodes sont couramment utilisées en fonction de la source d'énergie utilisée : le séchage solaire ou naturel et le séchage artificiel. Au Cameroun, le séchage solaire se fait sur des nattes ou des baches (dans toutes les zones de production), sur des autobus (dans le Sud) et sur les aires cimentées (dans le Centre). Tandis que le séchage artificiel est plus rencontré dans le Littoral (Moungo) et dans le Sud-Ouest en raison de la forte pluviosité. Mais de façon général, les petits producteurs de cacao préfèrent le séchage solaire tandis que les grands planteurs préfèrent la méthode artificielle de séchage par air chaud (**Hii et al., 2009**).

#### **I.1.2.5. Stockage des fèves séchées**

Les conditions de stockage sont importantes. Le cacao est généralement emballé dans des sacs en jute de 65 kg (**Figure 5**) puis maintenu bien sec dans les magasins pour éviter le développement des moisissures (**Sandoval et Barreiro, 2002 ; Adabe et Ngo-Samnack 2014**). Il ne doit pas être contaminé par des odeurs et des fumées. Cependant, dans les pays tropicaux, le stockage dans les sacs en jute est difficile en raison des échanges entre les fèves à l'intérieur et le milieu environnant avec de l'air chaud et humide qui favorise le développement des insectes, des moisissures et par conséquent l'altération du produit (**CIRAD, 1999**). Des stockages hermétiques réalisés par la construction des structures en plastique, spécialement pour la conservation des grains de céréales et autres denrées à long et à moyen terme ont été développés et appliqués aux fèves de cacao (**Jonfia-Essien et al., 2010**).



**Figure 5.** Stockage des fèves de cacao : dans des sacs en jute (A), stockage hermétique expérimental pour le cacao- Cocoons™ (B), stockage hermétique expérimental pour le cacao-SuperGrainbag™ (C).

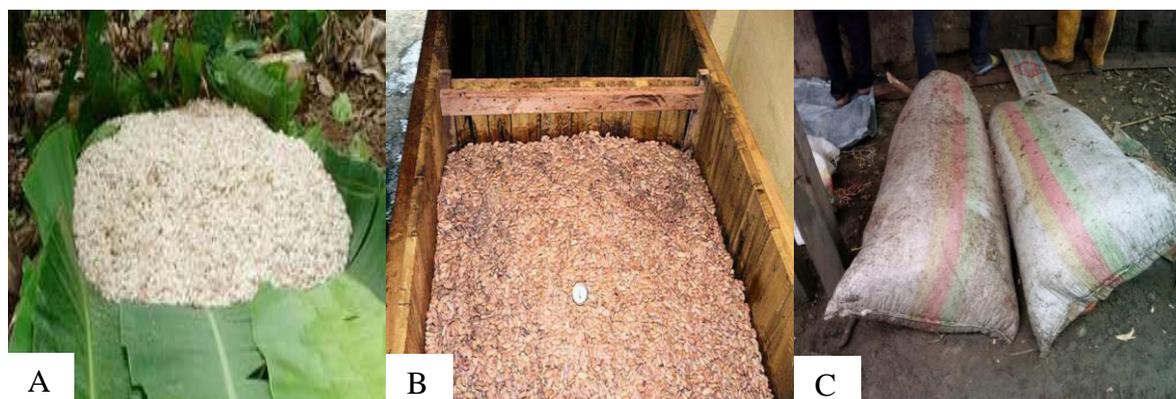
## **I.2. LA FERMENTATION DES FEVES : UN PROCESSUS COMPLEXE**

### **I.2.1. Importance de la fermentation des fèves**

Comme précédemment évoqué, les fèves de cacao non fermentées sont caractérisées par leur amertume et leur astringence. Pour cette raison elles sont soumises à la fermentation dans le but d'améliorer leurs propriétés organoleptiques (**De Vuyst *et al.*, 2016**). Bien conduite, cette opération a aussi pour but d'éliminer une grande partie de la pulpe qui entoure les graines, de supprimer leur pouvoir germinatif et de développer les précurseurs de l'arôme chocolat (**Kresnowati et Febriami, 2015 ; Kongor *et al.*, 2016**). Cependant lorsque la fermentation est mal effectuée, elle conduit à l'obtention des fèves sans potentiel aromatique, de couleur ardoisée après séchage ce qui constitue un défaut majeur. Bien que stérile avant ouverture de la cabosse, le mucilage est contaminé par les levures, bactéries lactiques et bactéries acétiques provenant des mains des opérateurs, des insectes (drosophiles, guêpes) présents autour des fèves, des feuilles de bananiers souvent utilisées pour recouvrir les tas de fèves en fermentation (**De Vuyst et Weckx, 2016**). A partir de cet instant, débute une multitude de réactions biochimiques durant lesquelles les microorganismes utilisent les nutriments disponibles dans la pulpe pour synthétiser d'autres molécules. Ces dernières diffusent dans les fèves et leurs confèrent des caractéristiques particulières. Les protéines des fèves sont dégradées par les protéinases et les polyphénols sont métabolisés par les polyphénols oxydases durant cette phase. Les produits de dégradations-des protéines (peptides, acides aminés) et des polyphénols vont former les précurseurs d'arôme. Ce processus se présente comme indispensable pour la qualité des fèves (**De Vuyst et Weckx, 2016**).

## I.2.2. Méthodes de fermentation

On rencontre différents modes de fermentation qui sont : la fermentation en tas sur feuille de bananier ou sur bâche, la fermentation en caisse, la fermentation en panier et la fermentation en sac (**Figure 6**).



**Figure 6.** Fermentation des fèves de cacao : tas (A), caisse (B) et sac (C).

### I.2.2.1. Fermentation en tas

La fermentation des fèves en tas est la plus simple des méthodes mises en œuvre dans les champs. La quantité des fèves à fermenter varie de quelques kilos à plus d'une tonne de fèves fraîches. Cette méthode est la plus répandue en Afrique de l'Ouest et même au Cameroun où elle est utilisée dans tous les bassins de production (**Fahrurrozi, 2015**). L'équipement requis est simple et disponible si bien que celle-ci peut être mise en œuvre par tout producteur des fèves de cacao. Ici, les fèves sont entassées et recouvertes de feuilles de bananier ou de macabo sur un lit de branchages qui facilite le drainage du jus. Ce recouvrement a pour but de ralentir la croissance des moisissures à la surface des fèves (**Moujouenpou, 2008**).

### I.2.2.2. Fermentation en caisse

Elle est menée dans des caisses en bois ou en plastique munies de trous de drainage à la base et sur les côtés pour faciliter l'écoulement du jus et favoriser l'entrée de l'air. Le volume de la caisse est très variable et doit être adapté aux possibilités de récolte. Lorsque la caisse est remplie par les fèves fraîches, la masse est recouverte des feuilles de bananier ou de sacs en jute afin de favoriser l'ensemencement naturel des levures et bactéries, de retenir la chaleur et protéger la surface des fèves du séchage. Le brassage se fait de façon transversale de la masse d'un bac à un autre. C'est une méthode très souvent mises en œuvre dans des vastes plantations.

Elle est plus employée au Brésil, Trinidad, Indonésie et en Malaisie (**Moujouenpou, 2008 ; Fahrurrozi, 2015**). Elle est très coûteuse et n'est pas très répandue au Cameroun.

### I.2.2.3. Fermentation en sac

Ici, les fèves fraîches sont transférées dans des sacs de toutes natures après écabossage. Généralement, ces sacs sont des sacs de transport des fèves des champs pour les villages dans le but d'éviter les vols. Ceux-ci sont déposés dans un coin de la maison à l'arrivée. Cette fermentation est observée dans certaines régions du Cameroun comme dans le Sud-Ouest et le Centre mais n'est pas recommandée selon les bonnes pratiques d'usage car elle ne permet pas l'aération des fèves et le brassage est difficile.

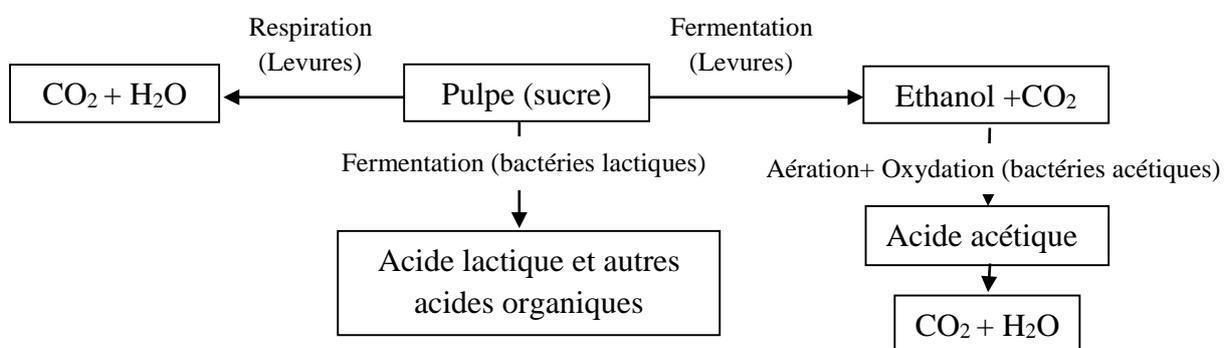
### I.2.2.4. Fermentation en panier

La fermentation en panier est beaucoup plus employée au Nigeria. Les paniers, tressés en fibres végétales, peuvent être de toutes dimensions. C'est une variante de la fermentation en caisse. Les paniers remplis sont posés sur le sol et recouverts des feuilles de bananier. Le brassage se fait en transvasant d'un panier à un autre (**Moujouenpou, 2008**).

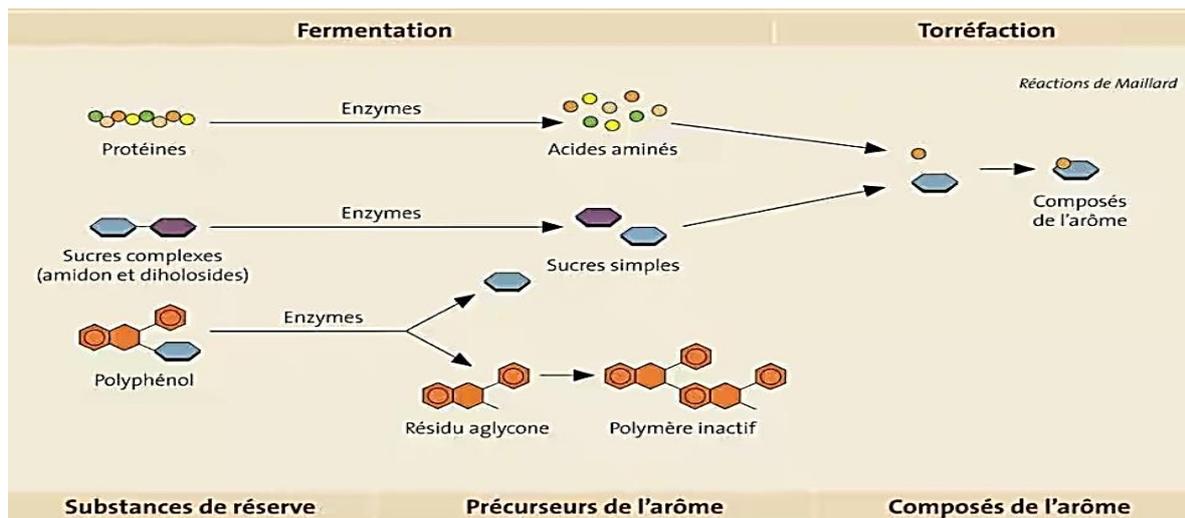
## I.2.3. Mécanismes et microorganismes de la fermentation des fèves de cacao

### I.2.3.1. Mécanisme de la fermentation

La fermentation des fèves a lieu à deux niveaux. Le premier, présenté par la **Figure 7** est constitué de toutes les réactions qui se déroulent à l'extérieur de la fève et dont les principaux médiateurs sont les microorganismes (**Schwan et wheals 2004**). Le second niveau de fermentation (**Figure 8**) comprend toutes les réactions enzymatiques d'hydrolyse s'effectuant à l'intérieur des fèves (**Ouattara et al, 2014**).



**Figure 7.** Activités microbiennes à l'extérieur des fèves durant la fermentation du cacao.



**Figure 8.** Réactions biochimiques à l'intérieur des fèves durant la fermentation du cacao (Barel, 2009).

La fermentation est fondamentalement liée à la conversion des sucres et de l'acide citrique de la pulpe en acides lactique et acétique par les microorganismes. Ces réactions de conversion engendrent une augmentation de la température de la masse fermentaire qui favorise le passage de ces acides de l'extérieur vers l'intérieur de la fève. L'abaissement du pH de l'amande par les acides organiques et la température élevée (supérieure à 40°C) activent les enzymes endogènes que sont la protéase aspartique, les carboxypeptidases, la polyphénoloxydase, les peroxydases et les amylases. Ces enzymes dégradent respectivement les protéines, les polyphénols et les sucres complexes de l'amande en acides aminés, en résidu aglycone et en sucres simples. Les composés ainsi dérivés de la dégradation des macromolécules vont s'associer pour former des composés d'arôme, de goût, et de formation de couleur brune recherchée dans les fèves de cacao de bonne qualité (Afoakwa *et al.*, 2014 ; Apriyanto *et al.*, 2017). En effet, les acides aminés ont une corrélation significative avec la formation de saveur dans des circonstances normales de fermentation. Il a été démontré qu'un cacao ayant de meilleurs arômes avait également des teneurs élevées en acides aminés libres et en sucres réducteurs. Car les acides aminés libres et les oligopeptides sont les précurseurs essentiels d'arôme (Apriyanto *et al.*, 2017).

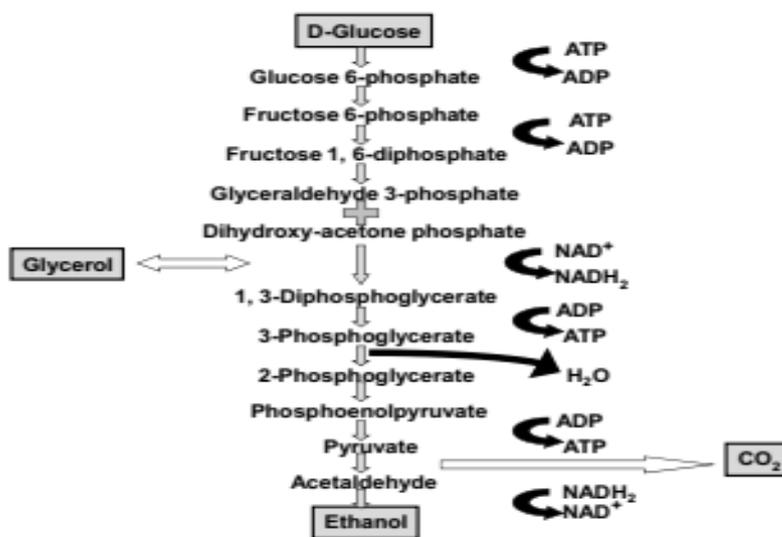
### I.2.3.2. Microorganismes de la fermentation

La microflore de la fermentation du cacao est très variée. Les levures sont les premières à coloniser le milieu, viennent ensuite des bactéries lactiques, auxquelles succèdent les bactéries acétiques qui sont enfin remplacées par les bacilles sporulantes aérobies (Lagunes-

Galvez *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007). Il est à noter que c'est la succession de ces microorganismes, en fonction d'une aération suffisante (bonne fréquence de brassage), qui conduit à un bon profil de variation de la température et du pH favorable à l'atteinte de la qualité souhaitée des fèves. Les facteurs climatiques peuvent également influencer sur la succession des microorganismes de la fermentation (Lagunes-Galvez *et al.*, 2007 ; Fahrurozi, 2015).

### I.2.3.2.1. Levures

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires eucaryotes qui interviennent lors de la fermentation pendant la phase dite d'anaérobie. En absence d'air, la pulpe sucrée et le pH bas constituent un milieu favorable à leur développement. Celles-ci transforment les sucres en alcool éthylique avec un dégagement de gaz carbonique (par le mécanisme décrit dans la Figure 9) et une élévation très importante de la température (jusqu'à 35 à 40°C après 48 h) (Moujouenpou, 2008).



**Figure 9.** Formation d'éthanol et 2 de CO<sub>2</sub> ou du glycérol à partir de la dégradation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas par les levures (Graham, 2017).

En plus de cette production d'éthanol, l'activité des levures induit la disparition de l'acide citrique présent dans la pulpe et augmente le pH jusqu'à la valeur de 5. Les enzymes pectinolytiques détruisent la pulpe et provoquent l'écoulement du jus (Pontillon, 1997). Nielsen *et al.* (2007) ont relevé une forte prolifération d'*Hanseniaspora guilliermondii* durant les 24 premières heures de la fermentation en tas du cacao. Après 36 à 48 h de fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia membranifaciens* deviennent les plus abondantes dans

toutes les fermentations (**Jespersen et al., 2005**). *Candida zemplinina* (**Nielsen et al., 2005**) et *Hanseniaspora* ont été décrites, respectivement dans les fermentations sur plateaux au Ghana et en caisse en République Dominicaine (**Lagunes-Galvez et al., 2007**).

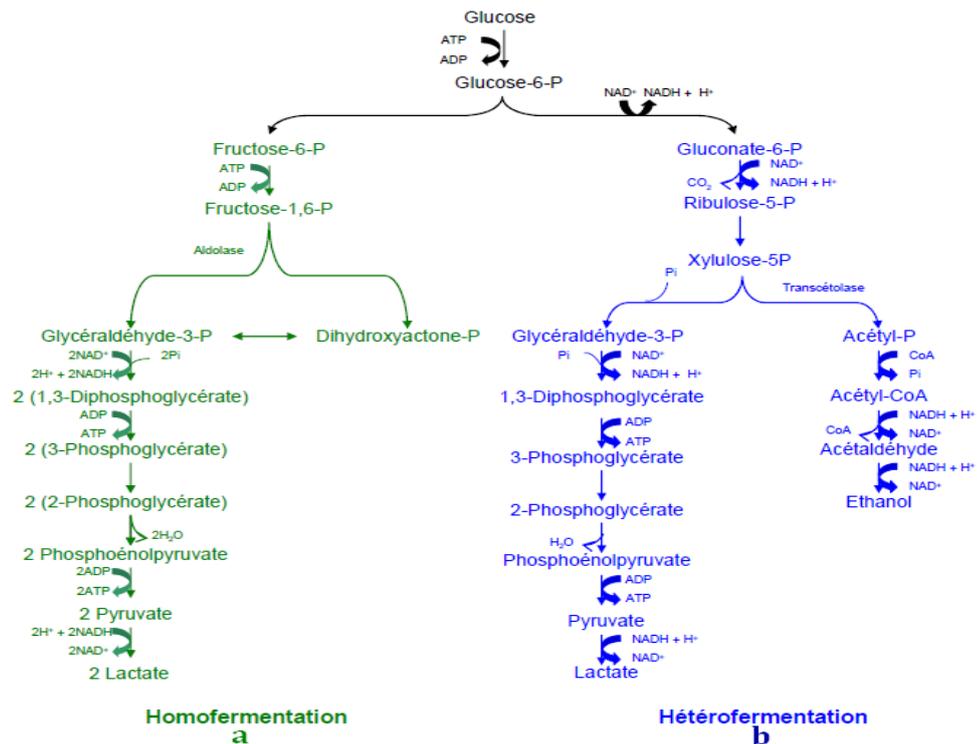
La charge en levures augmente les 12 premières heures de la fermentation allant de 10 à 10<sup>8</sup> UFC/g de pulpe ; puis se stabilise les 12 heures suivantes pour décroître considérablement jusqu'à seulement 10 cellules viables par gramme de pulpe après 48h de fermentation (**Shwan et Wheals, 2004**). C'est le cas de certaines espèces tel que *Pichia fermentans* et certains isolats de *Candida krusei* (**Jespersen et al., 2005**). Comme décrit par **Fahrurrozi (2015) et De Vuyst et Weckx (2016)**, les levures sont aussi responsables de:

- La production de certains acides organiques notamment les acides acétique, oxalique, phosphorique, succinique et malique ;
- La production des composés aromatiques principalement les alcools, les acides gras, les esters d'acides gras et les composés volatiles responsables de la saveur du chocolat ;
- La production des enzymes pectinolytiques qui hydrolysent les parois des cellules du mucilage ce qui réduit la viscosité de la pulpe, permet son écoulement et l'aération de la masse fermentaire et par conséquent, favorise la prolifération des bactéries.

#### **I.2.3.2.2. Bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires, procaryotes, très répandues dans la nature, qui possèdent la capacité de fermenter le lait. Ce sont des bactéries gram positif, catalase négative, non sporulantes, aéro-anaérobie facultative, de forme sphérique ou en bâtonnets. Cependant, elles ont aussi la capacité de fermenter d'autres hydrates de carbone avec production de l'acide lactique (**Stiles et Holzappel, 1997**). Durant les fermentations spontanées des fèves, certains genres sont majoritairement rencontrés ; c'est le cas des *Lactobacillus*. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, *Pediococcus acidilactici* et *Enterococcus casseliflavus* sont les espèces les plus fréquentes au Ghana (**Camu et al., 2007 ; Nielsen et al., 2007**) ; tandis qu'au Brésil, les genres *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus* sont les plus répandus (**Thompson et al., 2001**).

Durant leur phase active en milieu fermentaire, le métabolisme des bactéries lactiques se traduit par la production de l'acide lactique à partir des sucres simples présents dans le mucilage soit par voie homofermentaire (par la voie de la glycolyse ou voie d'Embden-Mayerhof) soit par voie hétérofermentaire (ou voie des pentoses phosphates) (Figure 10).



**Figure 10.** Principales voies fermentaires des hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi, 2012).

Une autre fonction importante des bactéries lactiques durant la fermentation du cacao est la dégradation de l'acide citrique, qui contribue à augmenter le pH du milieu fermentaire (Fahrurrozi, 2015). Elles sont présentes dans le matériel végétal et leur développement débute lorsque les conditions sont favorables : micro-aérophilie, pH (compris entre 5 et 7) et température (comprise entre 25 et 37°C), substrat (glucose) disponible. La liquéfaction du mucilage par les microorganismes précédents permet une élévation de la teneur en oxygène ce qui donne lieu à la colonisation des fèves par les souches aérobies notamment les bactéries asporulées, sporulantes et les champignons filamenteux.

### I.2.3.2.3. Bactéries acétiques

Les bactéries acétiques sont des microorganismes procaryotes de la famille des *Acetobacteraceae*. Elles ont été classées en 19 genres à savoir : *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Bombella*, *Commensalibacter*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Neokomagataea*, *Nguyenibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Swingsia* et *Tanticharoenia* (Trček et Barja, 2015). Elles transforment l'éthanol en acide acétique dans des conditions aérobies. Cette réaction exothermique contribue à la mort des fèves et à la libération des enzymes endogènes

que sont principalement l'endoprotéase aspartique et les carboxypeptidases (**Schwan et al., 1995 ; Nielsen et al., 2007**).

Pendant la phase aérobie, les bactéries acétiques transforment l'éthanol produit par les levures et les bactéries lactiques en acide acétique par oxydation exothermique. Elles métabolisent également le citrate en oxaloacétate puis en acétate (**Lagunes-Galvez, 2002 ; Schwan et Wheals, 2004 ; Camu et al., 2007**). Cette réaction d'oxydation leur procure l'énergie dont elles ont besoin pour leur croissance. En conséquence, il se produit un dégagement d'énergie de l'ordre de 496 KJ par molécule d'éthanol oxydée, ce qui conduit davantage à une élévation de la température de la masse fermentaire pouvant atteindre 50°C (**Fahrurrozi, 2015**). Le suivi de la cinétique de dégradation de certains composés durant la fermentation des fèves montre que l'oxydation de l'éthanol coïncide avec la disparition de l'acide lactique dans le milieu fermentaire. Ceci indique une implication des bactéries acétiques dans l'oxydation simultanée de ces deux composés en acide acétique puis en dioxyde de carbone et en eau (**Fahrurrozi, 2015**). La matière grasse, quant à elle, ne subit pas de transformation notable. Le genre *Acetobacter* est le plus rencontré et les espèces trouvées varient d'un pays à l'autre. Au Ghana, les souches *A. pasteurianus*, *A. tropicalis*, *A. syzygii*, sont les plus répandues (**Camu et al., 2007 ; Nielsen et al., 2007**) ; tandis qu'au Brésil, ce sont les espèces *A. liquefaciens*, *A. pasteurianus* et *A. peroxydans* (**Schawn et Wheals, 2004 ; Nielsen et al., 2007**).

#### **I.2.3.2.4. Bactéries sporulantes**

Les bactéries sporulantes se développent lorsque la fermentation est prolongée. Elles produisent un certain nombre de molécules telles que les acides gras et les alcools, qui influencent l'arôme final du cacao. C'est le cas de *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. coagulans* (**Nielsen et al., 2007**).

#### **I.2.3.2.5. Moisissures**

Ces champignons filamenteux ne sont pas considérés comme des microorganismes importants dans la fermentation car leur rôle durant la fermentation du cacao n'est pas encore clairement établi. Cependant, il est connu que certaines espèces peuvent hydrolyser la pulpe, produire des acides à partir des sucres contenus dans la pulpe ou altérer la qualité organoleptique des fèves par augmentation des acides gras libres issus de l'hydrolyse des triglycérides présents dans les fèves. Ils ont parfois été trouvés dans les parties bien aérées de la masse de fèves en fermentation et durant le processus de séchage (**Schwan et Wheals, 2004**).

Mais, certaines de ces moisissures produisent des mycotoxines sur le cacao et sont responsables des effets néfastes constatés dans les denrées alimentaires stockées altérant ainsi leur qualité (Magan *et al.*, 2003).

### **I.3. CRITERES DE QUALITE DES FEVES DE CACAO ET RISQUES MICROBIOLOGIQUES ASSOCIES**

La qualité est une préoccupation qui reste au cœur des inquiétudes des consommateurs. Toutes les denrées alimentaires sont soumises à des normes qui permettent de définir leur qualité. Ces normes sont établies en vue de protéger la santé des consommateurs et à promouvoir des pratiques loyales dans le commerce des produits. Elles sont établies par la commission du Codex Alimentarius, un programme mixte de la FAO/OMS. Elles rassemblent les aspects sanitaires, nutritionnels et organoleptiques d'un produit qui vise à satisfaire les utilisateurs.

#### **I.3.1. Attributs et critères de qualité d'une fève de cacao**

Les attributs de qualité d'une fève peuvent être regroupés en trois catégories:

##### **I.3.1.1. Les attributs technologiques**

Ceux-ci portent sur la teneur en eau, la taille des graines, le nombre de défauts à la coupe, la couleur (ardoisée, violette) et l'odeur (odeur de moisi, odeur de fumée) des fèves, le taux de coque, la teneur en matière grasse, le taux d'acides gras libres (AGL).

##### **I.3.1.2. Les attributs organoleptiques**

Ils font référence à l'acidité, l'amertume, l'astringence, l'arôme cacao, les arômes spéciaux (floral, fruité, moisi...), les goûts étrangers (moisi, fumé...) car la saveur du chocolat, principal dérivé du cacao est influencée par les caractéristiques génétiques et les pratiques de transformation post récolte.

##### **I.3.1.3. Les attributs sanitaires**

Ils sont liés aux critères tels que la présence de métaux lourds (cadmium...), les résidus de pesticides, la présence d'hydrocarbures polycycliques cancérigènes (HAP), et surtout le taux de toxines en particulier l'ochratoxine A.

L'ensemble de ces attributs sont appréciés par les acteurs de la filière cacao et les chercheurs au travers des critères tels que : l'indice de fermentation, le pH, la teneur en eau, la teneur en acide gras, la teneur en polyphénols, la teneur en sucre.

- **Indice de fermentation** : c'est le paramètre utilisé comme indicateur de l'efficacité du processus de fermentation. Ainsi l'on considère que les fèves de cacao ont subi une fermentation complète lorsque la mesure de l'indice de fermentation donne une valeur supérieure ou égale à 1 d'après les standards indonésiens (**Cempaka et al., 2014**).
- **pH** : Il ne devrait pas excéder 7,75 pour être de bonne qualité.
- **Test à la coupe** : C'est le test basique à effectuer lors de l'achat des fèves. Il consiste à couper longitudinalement 50 à 300 fèves prélevées au hasard dans un sac de 25 à 65Kg à l'aide d'un cutter, les déposer sur une planche face à face puis à en apprécier les caractéristiques physiques. Ces caractéristiques prennent en considération : le nombre de fèves moisies, de fèves bien fermentées (brunes, maronnes ou blanche), de fèves violettes (pas fermentées), de fèves ardoisées (pas suffisamment fermentées), de celles présentant d'autres défauts (fèves germées, fèves mitées, etc...). Il permet aussi d'apprécier le fractionnement des cotylédons. A l'issue de ce test, les fèves sont classées selon la norme en 3 grades : Grade I, Grade II et Hors standard ou Sous grade (**Guehi et al., 2008**).
- **Teneur en eau** : Elle permet de se rassurer que les fèves sont bien sèches avant le stockage. Elle doit avoir une valeur inférieure ou égale à 8 % après le séchage. Ici, il est également question de se rassurer que l'environnement de stockage soit favorable au maintien de cette teneur pour éviter une reprise en humidité favorable au développement des moisissures et à la reproduction de certains insectes. Elle peut être mesurée de façon directe par un hydromètre qui indique l'humidité relative des fèves conditionnées ou indirectement par la méthode des pesées de l'Organisation internationale de normalisation ISO 2291 :1980 (**Hamid et Lopez, 2000**).
- **Teneur en Acide gras libres**: Les résultats de la teneur en acide gras libre conformément à la norme doivent être inférieurs ou égaux à 1,75 g/100g d'échantillon. Elle peut se faire après extraction à l'ether de pétrole suivi du dosage au KOH selon le protocole utilisé à l'Office national du cacao et du café (ONCC).
- **Teneur en polyphénols totaux** : Les polyphénols sont des déterminants des arômes des fèves de cacao (**Eyamo et al., 2016**). Leur teneur peut baisser jusqu'à 0,81mg/g de fèves au cours de la fermentation (**Cempaka et al., 2014**).

### I.3.2. Normes sur la qualité des fèves

Les fèves sont sélectionnées par les chocolatiers pour leurs qualités gustatives variables en fonction de la variété et du site de production. Cependant, avant d'arriver dans la chaîne de transformation, les fèves passent par le contrôle des organismes accrédités comme l'Office national du café et du cacao (ONCC) au Cameroun pour le contrôle de sa qualité. Pour que les fèves de cacao soient acceptées sur le marché national et international, il faudrait qu'elles respectent les normes de qualité dont quelques-unes sont résumées dans le **Tableau V** (Tankou, 2016). Ces normes sont relatives aux aspects microbiologiques, physiques et chimiques des fèves.

**Tableau V:** Normes sur la classification du cacao marchand (Tankou, 2016).

Grade de cacao	Normes Camerounaises	Normes Ivoiriennes	Normes Internationales	Qualité
<b>Grade I (G1)</b>	Moisies ≤ 3%	Moisies ≤ 3%	Moisies+mitées ≤ 5% Ardoisées ≤ 5 %	Bien fermentées
	Ardoisées ≤ 3%	Ardoisées ≤ 3%		
	Défectueuses ≤ 3%	Défectueuses ≤ 3%		
<b>Grade II (G2)</b>	Moisies = 3%	Moisies = 4%	Moisies + mitées comprise entre 5% et 10% max Ardoisées comprise entre 5% et 10% max	Fermentation moyenne ou passable
	Ardoisées = 8%	Ardoisées = 8%		
	Défectueuses = 6%	Défectueuses = 6%		
<b>Sous Grade (SG)</b>	Moisies ≥ 4%	Moisies ≥ 4,1%	Moisies+mitées > 10% Ardoisées > 10%	Mal fermentées
	Ardoisées ≥ 8%	Ardoisées ≥ 8,1%		
	Défectueuses ≥ 6%	Défectueuses ≥ 6,1%		

Les normes publiées par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) constituent la base des règles de classification de plusieurs pays producteurs de cacao. La norme ISO 2451 "Fèves de cacao – Spécifications", publiée en 1973, révisée en 2014 s'adapte aux pratiques commerciales actuelles : Elle renvoie à trois autres normes ISO: l'ISO 1114 (Fèves de cacao – Épreuve à la coupe), l'ISO 2291 (Détermination de la teneur en humidité (méthode pratique)) et l'ISO 2292 (Echantillonnage). La norme l'ISO 2292 est actuellement en cours de révision et des nouvelles modifications sont en cours de discussion pour l'ISO 2451, en particulier pour les spécifications relatives à la taille des fèves et l'intégration éventuelle de cette norme à l'ISO 1114 et l'ISO 2291. La norme ISO 2451 définit les termes employés et les grades de classification des fèves de cacao. Ces grades sont basés sur le test de coupe qui permet de détecter certains défauts aromatiques flagrants (CAOBISCO, 2015).

Au niveau national, ces normes en code NC (Norme Camerounaise) ont été adaptées et connues sous les codes suivants : NC 217 (Classification cacao), NC 218 (Echantillonnage), NC 219 (Teneur en eau), NC 220 (Epreuve à la coupe des fèves), NC 221 (Emballage des fèves et marquage), NC 222 (Détermination du grainage), NC 223 (Détermination Taux de coque), NC 224 (Analyse sensorielle), NC03 (Sac en jute) (ANOR, 2015).

### I.3.3. Altération des fèves

Le problème de l'altération de la qualité des fèves commence durant le long processus de fermentation et conduit souvent à des pertes économiques énormes, lesquelles pour certains pays tel que la Côte d'Ivoire, peuvent être estimées à environ 60 milliards de FCFA (Yao *et al.*, 2017). Elle se poursuit tout le long de la chaîne de production chez l'agriculteur, dans les magasins de stockage des organismes accrédités et des coopératives. Elle prend en compte l'altération par les nuisibles (insectes, acariens) et l'altération par les moisissures (Figure 11).



**Figure 11.** Fèves contaminées par les moisissures (Berbiye, 2014).

Les moisissures sont des organismes eucaryotes, thallophytes car l'appareil végétatif est un thalle constitué par des filaments mycéliens à croissance apicale, dans toutes les directions à la même vitesse. Dépourvus de pigments assimilateurs, ce sont des microorganismes dépendants d'une source de carbone organique. Globalement peu exigeants sur les conditions du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux divers comme les céréales, les produits d'origine animale mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition, où elles trouvent une source de carbone et d'azote accessible (Tabuc, 2007).

La contamination fongique d'un substrat ou d'un aliment provoque des modifications physiques (aspect) et des modifications chimiques (modification des qualités nutritives)

(Tabuc, 2007). Elle détériore la qualité marchande et hygiénique des denrées alimentaires en synthétisant des métabolites toxiques connus sous le nom de mycotoxine (Dalié *et al.*, 2010).

Au Cameroun notamment, l'altération de la qualité des fèves est due à la mauvaise conduite de la fermentation et à la croissance des moisissures dont certaines sont responsables de la synthèse des mycotoxines comme l'Ochratoxine A (OTA) (Mounjouenpou, 2008). C'est la principale raison pour laquelle le cacao camerounais est classé comme étant de qualité moyenne.

Le développement des moisissures et leur production de mycotoxines dans les aliments et les fèves de cacao est fonction de plusieurs facteurs.

### **I.3.3.1. Facteurs favorisant la mycotoxinogénèse**

La mycotoxinogénèse (mécanisme de synthèse et d'excrétion des mycotoxines) est un phénomène d'une grande complexité. Ses conditions optimales dépendent d'une combinaison de facteurs divers. Les moisissures productrices de mycotoxines sont capables de se développer sur plusieurs substrats et dans différentes conditions d'humidité, de pH et de température (Moujouenpou, 2008). Ces moisissures peuvent se développer pendant la culture, la fermentation, le séchage ou pendant le transport et le stockage des produits agricoles. Trois types de facteurs conduisent à la colonisation fongique et à l'imprégnation mycotoxique. Ce sont les facteurs physiques, chimiques et biologiques.

#### **I.3.3.1.1. Facteurs physiques**

##### **➤ Activité de l'eau (Aw)**

La mycotoxinogénèse dépend fortement de l'activité de l'eau (Aw). Quand les autres facteurs ne sont pas limitants, elle croît d'une façon exponentielle avec l'Aw jusqu'à un seuil maximum où on observe un ralentissement de cette dernière due à un défaut d'oxygénation. L'Aw optimale pour *Aspergillus ochraceus* par exemple se situe entre 0,95 et 0,99 sur des milieux riches en sucre et 0,81 sur des milieux contenant du chlorure de sodium. Elle est de 0,82 chez *Aspergillus carbonarius* et est inférieure à 0,80 chez *Penicillium verrucosum* dans les mêmes conditions (Pitt et Hocking, 1997).

### ➤ **Température**

La température optimale de mycotoxinogénèse est généralement voisine à la température optimale de croissance des souches productrices de toxines (**Samson, 1991**). *Aspergillus ochraceus* est une espèce mésophile – xérophile (capable de vivre dans les conditions extrêmes). Il se développe entre 8 et 37°C, avec un optimum entre 24 et 37°C ; c'est donc dans cet intervalle qu'il est capable de produire sa toxine. *Aspergillus niger* se développe de façon optimale à des températures hautes, avec un optimum entre 35-37°C. *Penicillium verrucosum*, quant à lui, est capable de croître à température située entre 0 et 31°C avec un optimum à 20°C. La patuline, l'acide pénicillique et l'ochratoxine A sont élaborés à des températures généralement inférieures à celles de la croissance. Les températures optimales de croissance et de production d'aflatoxines chez *A. flavus* sont proches. Pour d'autres toxines (trichothécènes et zéaralénone), la température optimale de mycotoxinogénèse peut être jusqu'à 10°C inférieure à celle de la croissance (**Samson, 1991**).

#### **I.3.3.1.2. Facteurs chimiques**

##### ➤ **Oxygène**

La réduction de la disponibilité en oxygène a un effet inhibiteur bien plus important sur la mycotoxinogénèse que sur la croissance du champignon. La production d'aflatoxine est fortement inhibée lorsque la concentration en oxygène est inférieure à 1 % (**D'Mello et MacDonald, 1997**).

##### ➤ **Traitements agricoles par les pesticides**

L'utilisation des produits phytosanitaires sur les plantes pendant les traitements agricoles a une action préventive sur l'apparition des mycotoxines. L'emploi des pesticides protège des lésions dues aux insectes, aux acariens et réduit la contamination par les souches toxigènes et la production des mycotoxines.

##### ➤ **Nature du substrat**

La mycotoxinogénèse est liée à la composition chimique de la denrée. La biosynthèse de certaines mycotoxines peut être favorisée par la présence des glucides dans le substrat, puis des lipides et enfin les protéines qui ont une moindre influence (**Pitt et Hocking, 1997 ; Kokkomen et al., 2005**).

### **I.3.3.1.3. Facteurs biologiques**

Les facteurs biologiques sont liés à l'espèce fongique, à la variation de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces et par différents genres. C'est notamment le cas de la patuline et de l'Ochratoxine A (OTA) qui sont produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Une même espèce peut également produire plusieurs toxines (production d'OTA et de citrinine par *Penicillium verrucosum* ; d'OTA et d'acide pénicillique par *Aspergillus ochraceus* ; de citrinine et de patuline par *Penicillium claviforme* ou *Aspergillus terreus*) (**Le-Bars, 1988**). Au sein d'une espèce réputée toxigène, toutes les souches peuvent ne pas avoir cette propriété. Pour une même espèce, la production des toxines peut dépendre de la région et du substrat d'origine (**Kokkomen et al., 2005**).

### **I.3.3.2. Effet des mycotoxines sur la santé**

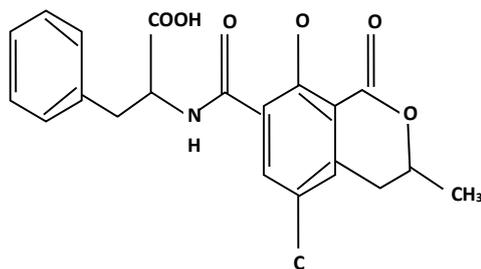
Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie *champignon* et du latin «*toxicum*» qui signifie *poison*. Il désigne certains métabolites secondaires sécrétés après l'arrêt de la réduction des groupes cétoniques pendant la biosynthèse des acides gras chez les moisissures (**Gimeno, 2000**). Les mycotoxines sont considérées comme faisant partie des contaminants alimentaires ayant le plus d'impact sur la santé publique, la sécurité alimentaire et l'économie de nombreux pays (**Pitt et al., 2000**). La détérioration des aliments par les moisissures et l'apparition de leurs mycotoxines constituent un danger certain pour la santé. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture ou Food Agriculture Organization (FAO), au moins 25 % des cultures vivrières dans le monde sont contaminées par les mycotoxines. Les plus touchées sont le raisin et ses dérivés, les céréales et leurs dérivés, le cacao, le café et les arachides. Le volume mondial de produits à risque est estimé à 100 millions de tonnes, dont plus de 20 millions dans les pays en voie de développement (**Park et al., 1998**). Les mycotoxines sont souvent classées en fonction des espèces fongiques qui les produisent et des produits qu'elles contaminent. Les plus communes dans les aliments et les plus importantes au niveau sanitaire et économique sont : les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, les zéaralénonnes, les fumonisines, les alcaloïdes de l'ergot, la citrinine, la patuline et la stérigmatocystine (**Gimeno, 2000**).

En Europe, une potentielle perte économique est évaluée entre 800 et 1000 millions d'Euros (soit près de 650 milliards de Francs CFA) par la contamination de céréales par l'ochratoxine A (**Olsen et al., 2003**). Les mycotoxines se retrouvent aussi dans le mycélium et

les spores fongiques. Elles peuvent être adsorbées dans les poussières et transportées sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques. Ce qui constitue une autre voie d'exposition pour l'homme par inhalation (**Jarvis et Miller, 2005**). La lutte contre les mycotoxines dans les aliments est l'un des axes des travaux menés au niveau mondial dans le cadre du *Codex alimentarius*. Des règlements ou des recommandations ont été édictés au niveau national et européen, et des valeurs guides existent pour fiabiliser les échanges commerciaux des denrées alimentaires du point de vue de la sécurité sanitaire (**Atoui, 2006**).

#### I.3.3.2.1. Cas de l'ochratoxine A (OTA)

Cette toxine est constituée d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyle en C7, et au groupement amine de la L-β-phénylalanine (**Ringot et al., 2006 ; Mounjouenpou, 2008**). L'OTA (**Figure 12**) agit principalement en inhibant la synthèse des protéines par compétition avec la phénylalanine au niveau de la fixation de cet acide aminé sur son acide ribonucléique de transfert (ARNt) spécifique chez les consommateurs.



**Figure 12.** Structure de l'ochratoxine A (**Ringot et al., 2006**).

L'ochratoxine A (OTA) représente la principale toxine connue associée aux moisissures qui attaquent le cacao (**Dongo et al., 2008 ; Copetti et al., 2013 ; Kedjebo et al., 2015**). Des travaux ont montré que sa teneur dans les fèves de cacao pouvait varier entre nd (non détecté) et 500 µg/kg de fèves dans certains cas alors que la réglementation n'en autorise que 2µg/ Kg. Si elle n'est pas contrôlée, elle peut être la source de nombreux problèmes sanitaires. Elle possède des effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes avérés (**Pfohl-Leskowicz et Castegnaro, 1999**).

### ➤ **Néphrotoxicité**

L'OTA ( $C_2OH_{18}ClNO_8$ ) est responsable de l'apparition d'un nombre drastique de tumeurs dans les voies urinaires supérieures rencontrées dans les Balkans. Cette corrélation est établie par plusieurs études scientifiques (**Moujouenpou, 2008**).

### ➤ **Tératogénicité**

L'OTA peut traverser le placenta et provoquer des anomalies morphologiques variées chez les embryons de rat, souris, hamster, porc et poulet. Les mécanismes de la tératogénicité semblent être liée à une action indirecte de l'OTA sur la mère, et à un effet direct sur le développement embryonnaire (**Pfohl-Leszkowicz et al., 1999**).

### ➤ **Immunotoxicité**

Le système immunitaire semble être plus touché par l'OTA que les autres organes qui lui sont sensibles. L'OTA agit sur l'immunité humorale en induisant la régression des immunoglobulines IgG, IgA et IgM. Elle est également responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire transmise par les lymphocytes B et T (immunité cellulaire). Des troubles au niveau de la moelle osseuse ont également été observés chez les animaux à qui l'OTA a été administrée (**Moujouenpou, 2008**).

### ➤ **Génotoxicité**

L'OTA et ses dérivés se fixent sur l'adénine et surtout sur la guanine. Il en résulte la formation de trois types d'adduits (composé produit d'une addition avec une molécule) : les adduits classiques, les adduits exocycliques et les pontages. Ces réactions sont à l'origine de plusieurs toxicités graves (**Pfohl-Leszkowicz et al., 1991**). **Hennig et al. (1991)** ont mis en évidence une activité mutagène importante chez *Salmonella typhimurium* exposée au surnageant d'hépatocytes de rats traités *in vitro* par l'OTA. Ils ont également observé une induction d'échange de chromatides sœurs dans les lymphocytes humains dans un milieu de culture contenant des hépatocytes et de l'OTA.

#### **I.3.3.2.2. Cas des aflatoxines**

Les aflatoxines sont des mycotoxines produites principalement par *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. *Aspergillus parasiticus* concerne principalement la culture d'arachide et *Aspergillus nomius* est prédominant sur le blé et le coton. Toutefois, ils ont également été détectés dans les fèves de cacao.

Les aflatoxines nécessitent un climat chaud et humide pour être produites. Ce problème concerne donc principalement les pays tropicaux et sub-tropicaux. Les teneurs maximales admises varient suivant la mycotoxine et l'aliment considéré. La commission européenne a limité la teneur en aflatoxines totales à 4 µg/kg. Pour les produits qui doivent subir un procédé industriel, la limite légale établie correspond à 15 µg/kg pour les aflatoxines totales (Coulibaly *et al.*, 2016). Par ailleurs, ces molécules ont été détectées dans les fèves de cacao à des valeurs situées entre nd (non détecté) et 13,87 µg/kg en Côte d'Ivoire (Coulibaly *et al.*, 2016).

### I.3.3.3. Contamination des fèves et législation

L'OTA, principale mycotoxine des fèves de cacao engendre de graves risques sur la santé des consommateurs tout comme l'Aflatoxine. Ceci a conduit les instances sanitaires de l'Union Européenne à établir des normes qui définissent les limites maximales tolérables dans plusieurs denrées agricoles (Larsen *et al.*, 2001). Ainsi, le **Tableau VI** présente les teneurs maximales d'Ochratoxine A (OTA) du règlement CE 123/2005 du 26 janvier 2005. Selon le Comité scientifique de l'alimentation humaine, il est prudent de réduire l'exposition à l'OTA en dessous de 5 µg/kg de poids corporel par jour (Moujouenpou, 2008 ; AFSSA, 2009).

**Tableau VI:** Teneurs maximales en ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg (AFSSA, 2009).

Aliment	Spécification	Limite maximale (OTA) admise (µg/kg)
Céréales	-Céréales en grain brut	5
	-Produits dérivés ou transformés des céréales	3
Raisin	-Raisins secs	10
	-Vins et boissons à base de vin ou de moût de raisin	2
	-Jus de raisin et boissons à base de jus de raisin	2
Café	-Café torréfié et café moulu	5
	-Café soluble	10
Aliments pour enfants	-Aliments élaboré à base de céréale	0,5
	-Aliments diététiques	0,5

La qualité des fèves de cacao tout comme celle des autres aliments se doit d'être préservée pour protéger le consommateur.

## I.4. MOYENS DE LUTTE CONTRE L'ALTERATION FONGIQUE DES ALIMENTS

Une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées des mycotoxines à cause de leur grande stabilité thermique. Jusqu'à présent, il n'existe pas de

procédés de décontamination fiables permettant d'éliminer la mycotoxine sans dénaturer le produit. Toutefois, quelques méthodes chimiques et physiques ont été développées pour contrôler l'apparition des moisissures et leurs toxines dans les aliments.

### **I.4.1. Moyens de lutte physique**

Dans la lutte physique, on retrouve : le nettoyage, la dégradation thermique, solaire ou par micro-ondes des substrats contenant les mycotoxines. Le but de ces méthodes est de modifier la structure chimique des toxines, puisque cette structure conditionne la toxicité de la molécule (**Quillien, 2002**). Mais, il existe aussi l'application des Bonnes Pratiques Agricoles (BPA) lors de la récolte, de la fermentation, du séchage et du stockage (principalement pour le cacao).

#### **I.4.1.1 Avant la récolte**

Les mesures de lutte physique en champ sont :

- Assurer de bonnes conditions écologiques (irrigation suffisante, apport de minéraux) et éviter les conditions écologiques favorables à l'infection fongique.
- Détruire les plants malades afin d'empêcher le risque de contamination des autres plants ou à la récolte suivante.

#### **I.4.1.2. Après la récolte**

Après la récolte, il convient de :

- Nettoyer fréquemment les lieux de stockage.
- Maintenir les stocks dans des conditions de température et d'humidité appropriées.

Le traitement thermique et l'irradiation restent les deux moyens les plus répandus dans la détoxification des aliments y compris pour le cas du cacao. En effet, les études réalisées par **Manda et al., (2009)** ont démontré une réduction de la teneur en OTA de 24-40% durant la torréfaction du cacao tandis que celles de **Copetti et al. (2013)** ont montré une réduction de 17%. Cependant, ces méthodes restent souvent limitées à cause de la thermostabilité des mycotoxines fongiques, et du coût énergétique qui y est généralement associé. Ces traitements entraînent également des modifications des caractéristiques organoleptiques de l'aliment. (**Mehrez, 2008**).

### I.4.2. Moyens de lutte chimique

Un large groupe de produits chimiques tel que les acides (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), les bases (Ammonium, hydroxyde de sodium), les agents oxydants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>), les agents réducteurs (Bisulfites), les agents chlorés (Hypochlorite de sodium, dioxyde de chlore, chlore gazeux) et d'autres réactifs comme le formaldéhyde, le benzoate, le propionate, le sorbate, le nitrate et nitrite, les sulfites se sont avérés capables de réduire la contamination fongique et de détruire ou inactiver les mycotoxines (**Silva et Lidon, 2016**). Pour cela, ils sont souvent utilisés dans la détoxification des aliments. Cependant certains procédés utilisant ces composés sont parfois sans action sur l'OTA ; c'est le cas de l'ammoniation utilisé dans la détoxification des aliments contre les aflatoxines (**Mehrez, 2008**).

- L'application de l'ammoniac (dans les arachides), qui, bien qu'efficace contre les mycotoxines, est elle-même potentiellement dangereuse pour la santé (**Quillien, 2002**).
- L'application des pesticides et antifongiques (acides propionique, acétique, sorbique, et benzoïque). Toutefois, les additifs antifongiques ne sont généralement pas autorisés en agro-alimentaire (**Lavermicocca et al., 2000**).

**Yao et al. (2017)** ont utilisé de la Polyhexamethylene Guanidine Hydrochloride (PHMGH) pour empêcher la contamination fongique des fèves de cacao. Ils ont prouvé que dans un environnement naturel, la PHMGH exerce l'activité fongicide à 4 g/l et un effet fongistatique à 2 g/l et pourrait être recommandé en raison de sa non-toxicité sur des humains.

En dépit des résultats obtenus, la réduction des moisissures par l'application des méthodes chimiques est coûteuse et considérée comme non sécurisante. D'ailleurs, il a été remarqué que certaines moisissures ont acquis la capacité à résister aux traitements chimiques et à certains conservateurs. Par exemple, certains *Penicillium* peuvent se développer en présence de sorbate de potassium et d'autres moisissures possèdent la capacité de dégrader le sorbate (**Nielsen et De Boer, 2000 ; Davidson, 2001**). En plus, certains résidus chimiques peuvent rester emprisonnés dans l'aliment le rendant également impropre à la consommation (**Laitila et al., 2002**).

### I.4.3. Moyens de lutte biologique

Le contrôle d'un organisme par un autre (lutte biologique par antibiose), a retenu beaucoup d'attention ces dernières années (**Magnusson et al., 2003, Dalié et al., 2010**). Le développement de la lutte biologique devrait contribuer à améliorer la sécurité des produits en contrôlant la croissance des moisissures et par conséquent la contamination par les

mycotoxines. Des recherches ont en effet montré que de nombreux microorganismes (bactéries lactiques, Bacillus, et même quelques levures) peuvent inhiber la croissance d'autres microorganismes par production de certaines molécules antimicrobiennes (**Masoud et Kalsoft, 2006 ; Dalié et al., 2010**). Cette méthode vient en réponse aux limites de l'utilisation des composés chimiques et des méthodes physiques dans la décontamination des aliments.

#### **I.4.3.1. Inhibition par les levures**

Alors que les antibiotiques et les bactériocines ont été découverts dans la première moitié du vingtième siècle, il a fallu attendre les années soixante pour qu'un principe équivalent soit mis en évidence chez les levures. En effet, les études qui se sont intéressées à l'inhibition des microorganismes par les levures ont souvent assimilé leur mode d'action à l'inhibition par compétition pour le substrat et leur capacité à acidifier le milieu. Mais, Il est reconnu que certaines espèces ont la capacité de produire des molécules appelées « mycocins » connues sous le nom de protéines « killer » lesquels sont capables d'inhiber le développement d'autres microorganismes (**Salas et al., 2017**). C'est ainsi, qu'en **1963, Bevan et Makover** furent les premiers à constater que certaines souches de *S. cerevisiae* pouvaient tuer d'autres levures de la même espèce (**Polonelli et al., 1991**).

Tout comme les bactéries, certaines levures sont capables d'inhiber de façon significative la croissance des moisissures et la synthèse des mycotoxines. Ceci a été le cas de *Pichia Anomala*, *Pichia kluyveri* et *Hanseniaspora uvarum* isolées de la fermentation du café *Arabica* en Afrique de l'Est qui ont inhibé la croissance d'*A. ochraceus* et la production d'Ochratoxine A (**Masoud et Kalsoft, 2006**).

Les levures « killer » se caractérisent par la production et la sécrétion dans le milieu, des substances de nature protéique ou glycoprotéique, appelées protéines ou toxines « killer » (**Wickner, 1986 ; Schmitt et Reiter, 2008**). Elles ont une action létale sur les souches de levures sensibles de la même espèce ou d'autres espèces sans contact direct de cellule à cellule (interaction indirecte) (**Wickner, 1996**). Ces substances peuvent exercer des effets antibactériens et antifongiques (**Magliani et al., 1997**). Les levures « killer » sont étudiées en vue de leurs exploitations pour des applications potentielles notamment dans les fermentations industrielles, pour combattre les levures indésirables de contamination (**Michalcakova et al., 1993 ; Chen et al., 2000 ; Ciani et Fatichenti, 2001**).

#### **I.4.3.2. Inhibition par les bactéries lactiques**

Parmi les antagonistes biologiques naturels, les Bactéries Lactiques (BL) ont un potentiel reconnu, même si les données relatives à leur activité biopréservatrice se concentrent sur les effets de leurs propriétés antibactériennes (**Dalié *et al.*, 2010**). Les BL sont classées en 13 genres à savoir : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Trichococcus*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Leuconostoc*, *Weisella* et *Pediococcus*. Ces microorganismes sont utilisés pour la production d'aliments fermentés et contribuent à la préservation de leur qualité, de leur stabilité, de leur flaveur et de leur structure (**Laitila *et al.*, 2002**). Les rapports de recherches indiquent que les BL ont des effets bénéfiques sur la santé chez les humains. Elles produisent des composés antagonistes capables de contrôler le développement des bactéries pathogènes, de la microflore indésirable, et de la microflore d'altération. Ces composés peuvent être des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, des bactériocines et des composés antimicrobiens de faible poids moléculaires (**Lavermicocca *et al.*, 2003 ; Dalié *et al.*, 2010**).

L'utilisation des BL pour contrôler la croissance des moisissures pourrait être une intéressante alternative aux méthodes physiques et chimiques. Toutefois, l'activité antifongique des souches lactiques n'est pas toujours avérée. Une revue a montré qu'une bonne sélection de bactéries lactiques pourrait permettre le contrôle de la croissance de moisissures et d'améliorer la durée de vie de nombreux produits fermentés et, par conséquent, de réduire les risques pour la santé dus à l'exposition aux mycotoxines (**Gourama et Bullerman, 1995**). Le **Tableau VII** présente quelques travaux déjà effectués pour évaluer la capacité antifongique de certaines de ces BL sur certaines moisissures.

**Tableau VII:** Liste de quelques souches bactériennes ayant le potentiel d'inhiber la croissance des moisissures toxigènes (**Dalié et al., 2010**).

Bactéries Lactiques	Spectre d'activité	References
Genre <i>Lactococcus</i>		
<i>L. lactis</i> C10	<i>A. parasiticus</i>	Wiseman et Marth, 1981
<i>L. lactis</i>	<i>A. flavus</i>	Coallier-Ascah et Idziak, 1985
<i>L. lactis</i>	<i>A. parasiticus</i>	Luchese et Harrigan, 1990
<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> DRCI	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i> ,	Batish et al., 1989
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CHD 28.3	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Roy et al., 1996
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz 2001
Genre <i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i> R	<i>A. fumigates</i>	Batish et al., 1990
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Suzuki et al., 1991
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> LC. 705	<i>A. niger</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.,	Mäyrä-Mäkinen et al., 1994
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i>	<i>A. flavus</i>	Gourama et Bullerman 1995 et 1997
<i>L. casei</i>	<i>Penicillium</i>	Gourama, 1997
<i>L. casei</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz, 2001
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>Coryniformis</i> Si3	Broad spectrum	Magnusson et Schnürer, 2001
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz, 2001
<i>L. Plantarum</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Suzuki et al., 1991
<i>L. plantarum</i> VTT E-78076	<i>F. avenaceum</i>	Niku-Paavola et al., 1999
<i>L. plantarum</i>	<i>P. corylophilum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. graminearum</i>	Lavermicocca et al., 2000
<i>L. plantarum</i> MiLAB 393	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i>	Ström et al., 2002 et 2005
<i>L. plantarum</i> MiLAB 14	<i>P. roqueforti</i> , <i>P. commune</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i>	Sjögren et al., 2003
<i>L. plantarum</i>	<i>A. flavus</i> , <i>F. graminearum</i>	Sathe et al., 2007
<i>L. reuteri</i> 1100	<i>F. graminearum</i>	Gerez et al., 2009
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Penicillium</i> spp.,	Stiles et al., 2002
<i>L. sanfranciscensis</i> CBI	<i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> , spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Corsetti et al., 1998
Genre <i>Leuconostoc</i>		
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Suzuki et al., 1991
Genre <i>Pediococcus</i>		
<i>P. acidilactici</i> LAB 5	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. oxyporum</i> , <i>Penicillium</i> spp.	Mandal et al., 2007
<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. expansum</i>	Rouse et al., 2008

Les approches expérimentales suivantes ont été utilisées pour évaluer l'activité antifongique des bactéries lactiques :

- L'étude *in vitro* de l'inhibition du diamètre de croissance de la colonie du pathogène et la formation d'une zone d'inhibition lorsqu'il est mis en culture avec l'antagoniste ou son filtrat de culture sur milieu solide en boîte de Petri (**Mikani et al., 2008**).
- L'étude *in vitro* et *in vivo* de l'inhibition de la germination des spores du pathogène ou de la croissance mycélienne en présence du filtrat de culture de l'antagoniste (suspension

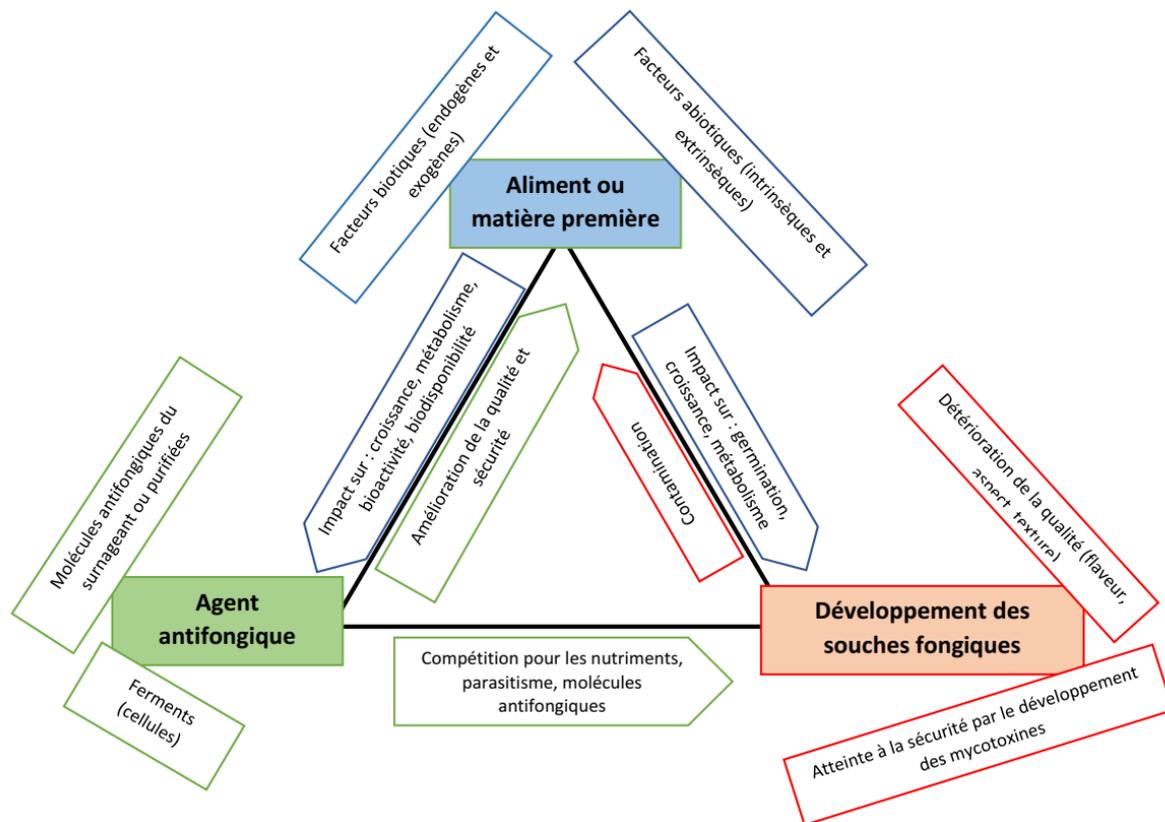
contenant les cellules de l'antagoniste tuées à la chaleur ou des cellules vivantes de l'antagoniste) (Mikani *et al.*, 2008).

#### **I.4.3.3. Inhibition par d'autres microorganismes**

Plusieurs genres bactériens comme *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Burkholderia spp.* ont montré une habileté à inhiber la croissance fongique et la production de l'aflatoxine par *Aspergillus spp* (Nesci *et al.*, 2005 ; Palumbo *et al.*, 2006). Ces isolats bactériens provenaient des fleurs et de noix d'amandiers ont complètement inhibé la croissance des souches *A. flavus*, isolées du maïs tout en inhibant l'accumulation de l'aflatoxine A. Wilson et Wisniewski (1989) ont également montré que les symptômes de la pourriture verte (*P. digitatum*) des citrons en conservation pouvaient être réduits par des applications de *B. subtilis* ou de son filtrat de culture contenant un lipopeptide (Iturine) sécrété par cette bactérie. Bull *et al.* (1998) ont pu contrôler *Penicillium digitatum* responsable de la pourriture grise des agrumes, ainsi que *Geotrichum citri-aurantii* et *Rhodotorula pilimanae* à partir de deux souches de *Pseudomonas syringae* produisant la syringomycine E.

#### **I.4.4. Principes actifs à l'origine de l'activité antimicrobienne**

Plusieurs molécules sont citées comme responsables de l'activité antimicrobienne. Et les mécanismes mis en œuvre pour expliquer ces activités peuvent être représentés par la **Figure 13**.



**Figure 13.** Mécanisme d’action à l’origine de l’activité antifongique de certains microorganismes (Salas *et al.*, 2017).

L’habileté des BL à produire des substances antimicrobiennes leur confère un potentiel de biopréservation. La majorité d’entre elles ont le status de GRAS ‘Generally Recognise As Safe’ et sont considérées comme sécurisant pour les animaux, les hommes et l’environnement (Schnürer et magnusson, 2005; Gajbhiye et Kapadnis, 2016).

L’activité antifongique des bactéries lactiques est attribuée à plusieurs composés comme le présente le **Tableau VIII**. Parmi ces composés, on compte les acides organiques, les protéines, les peptides cycliques et bactériocines, les composés phénoliques, l’eau oxygénée, les biosurfactants, les exopolysaccharides. Le genre *Lactobacillus* isolé de divers milieux est le plus reconnu pour cette activité antifongique (Schnürer et Magnusson, 2005 ; Dalié *et al.*, 2010; Crowley *et al.*, 2013 ; Gajbhiye et Kapadnis, 2016). Ils peuvent agir séparément ou de façon synergique.

**Tableau VIII : Quelques BL et leurs composés antifongiques (Crowley et al., 2013)**

Isolats de BL	Sources	Composés antifongiques isolés et identifiés	Références
<i>L. sanfranciscensis</i> CB1	Levain	Acide acétique, acide caproïque, acide propionique, acide butyrique, acide n-valique	Corsetti et al., 1998
<i>L. pentosaceus</i> TV35	Vagin	Pentocine TV35b	Okkers et al., 1999
<i>L. plantarum</i> VIT E-78076	Bière	Acide benzoïque, mevalolactone, methylhydantoïne, cyclo(glycyl-L-leucyl)	Miku-Paavola et al., 1999
<i>L. plantarum</i> 21B	Levain	Acide phenyllactique (PLA), acide 4-hydroxyphenyllactique	Lavermicocca et al., 2000
<i>L. plantarum</i> MiLAB393	Ensilage végétale	Cyclo (L-Phe-L-Pro), Cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), 3-PLA	Strom et al., 2002
<i>L. coryniformis</i> Si3	Végétaux	Cyclo (Phe-Pro), Cyclo (Phe-trans-4-OH-Pro), PLA, reuterine	Magnusson et al., 2003
<i>L. plantarum</i> MiLAB14	Fleurs Lilac	Acide 3-R-hydroxydecanoïque, acide 3-hydroxy-5-cis-dodecanoïque, 3-R-hydroxydodécanoïque	Sjogren et al., 2003
<i>L. plantarum</i> MiLAB14, <i>L. plantarum</i> MiLAB93	Fleurs Lilac	Acide 3-hydroxydecanoïque, acide 2-hydroxy-5-methylpentanoïque, acide benzoïque, catéchol, acide hydrocinnamique, acide salicylique, 3-PLA, 4-hydroxybenzoïque, acide (trans, trans) -3,4-dihydroxycyclohexane-1-carboxylique, acide p-hydro coumarique, acide vanillique, acide azealique, acide hydroferullique, acide p-coumarique, acide hydrocafféique, acide férulique, acide cafféique	Broberg et al., 2007
<i>L. plantarum</i> FST 1.7	Orge maltée	Acide lactique, PLA, cyclo (L-Leu-L-Pro), cyclo(6-Phe-L-Pro)	Dal Bello et al., 2007
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> SM20	Lait brut	Acide propionique, acide acétique, acide succinique, acide lactique, acide 2-pyrrolidone-5-carboxylique	Schwenninger et al., 2008
<i>P. jensenii</i> SM11	Lait brut	Acide 3-phenyllactique, acide 3-hydroxyphenyllactique	Schwenninger et al., 2008
<i>L. plantarum</i>	Ensilage végétal	3-PLA	Prema et al., 2008
<i>L. plantarum</i> AF1	Kimchi	Cyclo (Leu-Leu), δ-dodecalactone	Yang et Chang, 2010 Yang et al., 2011
<i>L. plantarum</i> LB1 <i>L. rossiae</i> LB5	Blé fermé	Acide lactique, acide formique, PLA	Rizello et al., 2011
<i>L. amylovorus</i> DSM19280	Environnement céréalier	Acide lactique, acide acétique, acide succinique, acide D-glucuronique, citidine, 2'-deoxycytidine, decanoate de sodium, acide p-coumarique, 3-PLA, acide 3-Phenylpropanoïque, acide (E)-2-methylcinnamique, acide 4-hydroxyphenyllactique, cyclo(L-Pro-L-Pro), cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Try-L-Pro), cyclo(L-Met-L-Pro), cyclo(L-Met-L-Pro), cyclo(L-His-L-Pro)	Ryan et al., 2011
<i>L. Plantarum</i> VE56, <i>W. paramesenteroides</i> LC11	Manioc fermenté	Acide 2-hydroxy-4-methylpentanoïque	Ndagano et al., 2011
<i>L. plantarum</i> IMAU10014	Koumiss	3-PLA, acide benzène acétique, 2-propenylester	Wang et al., 2012
<i>L. casei</i> AST18		Cyclo-(Leu-Pro), 2'-diphényl-piperidine, 5,10-diéthoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H et 6Hdipyrrolol-1,2-a,10,20-dipyrazine	Li et al., 2012
<i>L. amylovorus</i> FST2.1	Environnement céréalier	Acide DL-p-hydroxy phenyllactique, 1,2-dihydroxybenzène, acide 4-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide (5)-(-)-2-hydroxyisocaproïque, 3-(4-hydroxy-3-méthoxy-3-méthoxyphényl)propanoïque, acide azelaïque, PLA, acide benzoïque, acide hydrocinnamique, acide 3-hydroxydecanoïque, acide DL-β-hydroxylaurique, acide decanoïque, 2-hydroxydodecanoïque, acide DL-β-hydroxymyrstique, acide salicylique, acide hydrocinnamique D9, 1,2-dihydroxybenzène, acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propanoïque	Brosnan et al., 2012
<i>L. arizonensis</i> R13	Fromage, orge malté		
<i>L. plantarum</i> FST1.7			
<i>L. reuteri</i> R2			
<i>W. cibaria</i> PS2			
<i>L. reuteri</i> ee1p	Porc	Acide (5)-(-)-2-hydroxyisocaproïque, acide hydrocinnamique, acide phenyllactique, acide decanoïque, acide azealique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide coumarique, acide vanillique, acide DL-β-hydroxyphenyllactique, acide 3-hydroxydecanoïque	Guo et al., 2012
<i>L. hammesii</i> DSM 16381	Levain de blé	Mono-hydroxy C18 :1 acide gras	Black et al., 2013

#### **I.4.4.1. Acides organiques**

La synthèse de l'acide acétique et de l'acide lactique est un facteur majeur de la biopréservation. La production de ces acides dans un milieu réduit le pH ce qui inhibe la croissance mycélienne. Car les molécules d'acides causent la destruction des membranes cellulaires. Les faibles pH convertissent les acides dissociés en molécules d'acides non dissociés quand le pH chute en dessous du pKa de l'acide correspondant. Les molécules acides sont en activité sous la forme non dissociée, comme ils sont lipophiles et peuvent passer par la membrane cytoplasmique. En raison du pH intracellulaire élevé, l'acide dissocie et libère des protons et des anions (bases conjuguées) qui perturbent la force motrice de proton de membrane (**Gajbhiye et Kapadnis, 2016**). L'accumulation des protons acidifie le milieu intracellulaire et empêche les activités métaboliques de la cellule, ayant pour résultat la diminution du rendement de triphosphate d'adénosine (Energie). L'inhibition des souches fongiques par les acides organiques peut être liée à l'inhibition des activités enzymatiques, ce qui entraîne un mécanisme de rupture de membrane cellulaires (**Schnürer et Magnusson, 2005 ; Dalié et al., 2010 ; Gajbhiye et Kapadnis, 2016**).

Le pKa de l'acide acétique (4,8) est plus élevé que celui de l'acide lactique (3,83), ainsi quand il y a baisse du pH, les molécules non dissociées d'acide acétique sont produites en premier alors que celles de l'acide lactique seront produites lorsque le pH sera en-dessous de 3,83. En outre, l'acide acétique a une constante élevée de dissociation ce qui le rend plus efficace que l'acide lactique dans l'inhibition de la croissance fongique (**Dalié et al., 2010**).

D'autres acides qui montrent une activité antifongique ont été identifiés dans les silos inoculés avec les bactéries lactiques (**Broberg et al., 2007**) à l'exemple de l'acide phenyllactique. **Gerez et al., (2010)** ont démontré que l'activité des cultures de bactéries lactiques était due aux acides lactique, acétique et phenyllactique. *P. digitatum* et *citri-aurantii* de *Geotrichum* ont été employés comme des mycètes d'indicateur pour évaluer l'effet de ces acides organiques.

L'acide phenyllactique est actif contre des levures et moisissures. Cependant, ce métabolite contribue le plus à l'effet antifongique global en synergie avec d'autres composés produits par les BL (**Schnürer et Magnusson, 2005**). Il a également été identifié dans des surnageants de culture de *L. coryniformis* Si3, de *L. plantarum* dMiLAB 393 (**Ström et al., 2002**), de *L. pentosaceus* et *L. sakei* (**Magnusson et al., 2003**). Dans la fermentation du pain par *L. plantarum* 21B, le début de la croissance de *Aspergillus niger* a été retardé de 7 jours,

en comparaison au pain ayant *L. brevis* pour starter ; ceci grâce à la production de l'acide phenyllactique et de l'acide 4-hydroxy-phenyllactique (**Lavermicocca et al., 2000**).

D'autres acides comme l'acide formique, propionique, butyrique, valérique et caproïque sont également connus pour leur activité antimicrobienne (**Corsetti et al., 1998 ; Gajbhiye et Kapadnis, 2016**)

#### **I.4.4.2. Acides gras**

Les acides gras sont connus pour causer l'inhibition de la croissance mycélienne. Quatre types d'hydroxy acide gras antifongiques à savoir : l'acide 3-(R)-hydroxydecanoïque, l'acide 3-hydroxy-5-cis-dodecenoïque, l'acide 3(R)-hydroxydodecanoïque et l'acide 3(R)-hydroxytetradecanoïque, ont été isolés dans le surnageant de culture de *L. plantarum* MiLAB 14 (**Sjogren et al., 2003**). Les composés hydroxylés d'acide gras présentent un spectre très large d'inhibition et sont efficaces contre les moisissures et des levures. La concentration inhibitrice minimum (CMI) des acides gras hydroxylés s'échelonne entre 10 et 100 µg/ml (**Dalié et al., 2010**).

Tous les acides gras hydroxylés sont synthétisés pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne. Ceci prouve qu'ils ne résultent pas des membranes lysées des cellules bactériennes (**Dalié et al., 2010 ; Gajbhiye et Kapadnis, 2016**). Le mécanisme antimicrobien général pourrait être lié au fait qu'ils agissent comme un détergent et détruisent les membranes cellulaires. Ainsi, on observe une augmentation de la perméabilité membranaire, une libération des électrolytes et des protéines intracellulaires des cellules fongiques (**Gajbhiye et Kapadnis, 2016**).

#### **I.4.4.3. Composés protéiques**

Des peptides antimicrobiens d'origine ribosomale ont été trouvés chez les mammifères, les oiseaux, les amphibiens, les insectes, les plantes, et les microorganismes. Ils ont une extrémité hydrophobe et hydrophile, une taille de 20-50 acides aminés et des propriétés cationiques (**Schnürer et Magnusson, 2005**).

Plusieurs peptides cycliques et autres composés peptidiques ont été présentés par des chercheurs comme étant à l'origine de l'activité antimicrobienne. Parmi ceux-ci, le cyclo (Gly-L-Leu), cyclo (L-Phe-L-Pro), et cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) qui sont produits par les souches *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *L. sakei* et *L. coryniformis* pourraient être des

métabolites communs des bactéries lactiques. Ces dipeptides cycliques ont été identifiés à partir des milieux de cultures des BL (**Lavermicocca et al., 2000 ; Schnürer et Magnusson, 2005**).

Les bactériocines ont habituellement de faible poids moléculaire (rarement plus de 10kDa). Elles peuvent être facilement dégradées par les enzymes protéolytiques particulièrement par les protéases de l'appareil gastro-intestinal des mammifères. Ce sont en général les molécules cationiques et amphipathique qui contiennent un excès des résidus lysylique et d'arginyle (**Zacharof et Lovitt, 2012**). Parmi les bactériocines les plus importantes, on peut citer : Lactacine F, Lactocine 705, Lactococcine G, Lactococcine, nisine, Leucocine H, Plantaricine EF, Plantaricine W, Plantaricine JK, et Plantaricine S. Un grand nombre de lactobacilles qui produisent la nisine A a également une variable normale, la nisine Z qui est fortement efficace contre les agents microbiens causant l'intoxication alimentaire et la détérioration. En outre, la nisine est la seule bactériocine qui a été officiellement utilisée dans l'industrie alimentaire et son utilisation a été approuvée dans le monde entier (**Zacharof et Lovitt, 2012**).

#### **I.4.4.4. Reuterine**

La reuterine (3-hydroxypropionaldehyde) est un produit de fermentation du glycérol par *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus collinoides* et *Lactobacillus coryniformis* en conditions anaérobiques (**Gajbhiye et Kapadnis, 2016**). On a montré que dans les organismes cibles, ce composé pouvait supprimer l'activité de la ribonucléase, enzyme principale de la biosynthèse de l'ADN. Elle a été citée comme pouvant empêcher la croissance d'*Aspergillus* et de *Fusarium* par **Dalié et al. (2010)**.

#### **I.4.4.5. Diacetyl**

Le diacetyl (2,3-butanedione), composé aromatique caractéristique du beurre, a des effets antimicrobiens au pH bas et est produit par quelques souches de bactéries lactiques pendant la fermentation du citrate. Cependant, les quantités de diacétyl requises pour exercer l'activité antimicrobienne est de l'ordre de 200 mM, ce qui change nettement le goût et l'arôme du produit (**Schnürer et magnusson, 2005**).

#### **I.4.4.6. Peroxyde d'hydrogène**

La présence de flavoprotéine oxydase dans la majorité des BL leur permet de produire du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence d'oxygène. Les BL ne peuvent pas produire la

catalase. Donc, elles peuvent ne pas dégrader le peroxyde d'hydrogène qui, après accumulation, oxyde la membrane lipidique et les protéines cellulaires des organismes cibles (**Dalié et al., 2010 ; Gajbhiye et Kapadnis, 2016**). Dans plusieurs aliments comme le lait, l'activité antimicrobienne du peroxyde d'hydrogène, aux concentrations non létales est attribuée à sa réaction avec le sulfocyanate, catalysée par une lactoperoxydase. Les produits de cette réaction parmi lesquelles l'hypothiocyanate et d'autres molécules intermédiaires, peuvent réduire la croissance de plusieurs micro-organismes indésirables (**Schnürer et Magnusson, 2005 ; Dalié et al., 2010 ; Gajbhiye et Kapadnis, 2016**). **Venturini et al. (2002)** ont donc proposé que l'application de petites quantités de peroxyde d'hydrogène à la peau de pomme pourrait être une alternative aux fongicides pour empêcher la croissance de *P. expansum*. La concentration bactéricide de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contre les bactéries Gram négatif est de 25-30 µg/ml (**Sulistyo et al., 2014**). **Dalié et al., 2010** ont également suggéré que le peroxyde d'hydrogène pourrait affecter le taux de germination de spore de *F. graminearum*.

#### **I.4.4.7. Autres composés**

Des expériences menées par **Ryan et al. (2011)** ont signalé l'isolement de deux nucléosides avec une activité antifongique dans le filtrat de culture de *L. amylovorus* DSM 19280. La cytidine et la 20-désoxycytidine ont été identifiées à partir d'un cocktail de 17 composés antifongiques et possèdent des valeurs de CMI supérieures à 200 mg/ml contre *A. fumigatus* J9.

Les lactones, produites par deux *L. plantarum* isolées de la bière et du kimchi, deux produits fermentés, ont démontrées des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales (**Miyazawa et al., 2000 ; Crowley et al., 2013**). Les lactones antifongiques des bactéries lactiques ont été signalées pour la première fois par **Niku et al. (1999)** alors que la mévanolactone s'est révélée produite par *L. plantarum* VTT E-78076 (**Crowley et al., 2013**). **Yang et Kim (2011)** ont signalé la purification de la d-dodécalactone produite par *L. plantarum* AF1 avec une CMI qui variait entre 350 et 6250 mg/ml contre le genre *Aspergillus* et *P. roqueforti*.

#### **I.4.5. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne dans la lutte biologique**

De nombreux facteurs peuvent influencer la réponse inhibitrice des microorganismes y compris les bactéries lactiques.

#### **I.4.5.1. Facteurs intrinsèques**

Les facteurs intrinsèques des microorganismes sont ceux qui sont liés à eux même avec entre autres : le type de microorganisme (bactéries, levures, ou moisissures), la mobilité, la morphologie, présence d'une capsule, production de matériel extracellulaire, pigmentation.

Des expériences menées par **Laref et al. (2013a)** qui ont fait varier les conditions du milieu de culture de différentes souches de *L. plantarum*, ont révélé que chacune des souches se comportait différemment dans la production des composés antifongiques et présentait une activité plus ou moins prononcée vis-à-vis de *Penicillium notatum*, *Aspergillus repens* NRRL 13, *Aspergillus versicolor* M1069 et *Aspergillus candidus* C25.

#### **I.4.5.2. Facteurs extrinsèques**

Ces facteurs sont liés à l'environnement de croissance de la souche considérée. Ainsi, ils correspondent généralement aux éléments qui permettent une meilleure croissance de la souche. Ce sont : la température, le pH, le temps, la teneur et la nature du substrat (source d'éléments nutritifs), la pression osmotique ou disponibilité en eau, la teneur en oxygène, la nature de la cible.

**Laref et al. (2013a)** ont montré que la température, le pH, les nutriments présents dans le milieu de culture pouvaient influencer la production des composés antifongiques de *L. plantarum* et *L. farciminis*. Les résultats qu'ils ont obtenus ont révélés que chacune des souches de BL avait un optimum de production de composés antifongiques à une température, un pH et une source de carbone, différente de celui des autres souches de la même espèce. En effet, les facteurs biotiques et abiotiques sont capables de changer le métabolisme des bactéries lactiques.

Au regard de ce qui précède, deux principales stratégies sont élaborées dans la décontamination des aliments par des méthodes biologiques. La première approche de réduction des mycotoxines est préventive à travers l'inhibition de la croissance fongique et la seconde vise à éliminer celles déjà présentes dans l'aliment. La seconde approche nécessite que les microorganismes et l'aliment soit en contact dans une phase liquide ; ce qui n'est pas applicable aux aliments solides comme le cacao. Dans ce contexte l'unique solution applicable pour la préservation des fèves de cacao contre les moisissures et leurs toxines est la prévention à travers l'inhibition de la croissance des champignons et moisissures. Pour cela, les bactéries

lactiques et les levures s'avèrent être de bons candidats aux potentialités pouvant fournir des résultats dans la biopréservation du cacao.

### **I.5.Utilisation des starters comme moyen de stabilisation de la qualité des aliments**

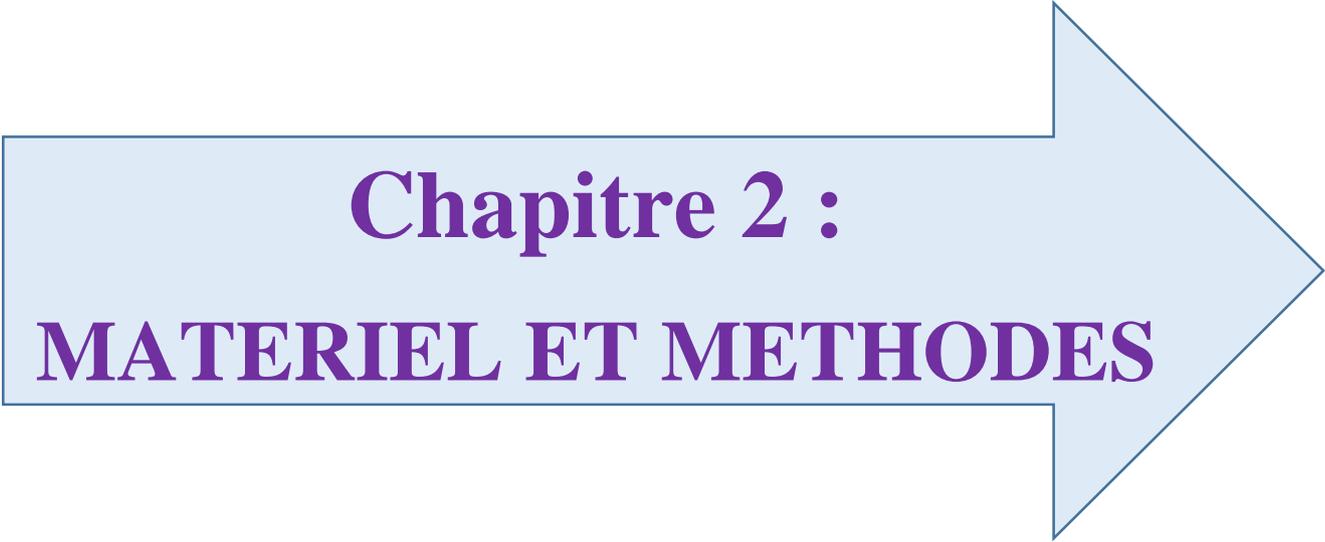
La variabilité de la qualité et la durée de production de nombreux produits fermentés sont à l'origine d'une recherche permanente de souches microbiennes d'intérêt capables d'améliorer la qualité et le rendement de production tout en assurant une stabilité au cours du temps. Cette recherche de souches d'intérêt est à l'origine de l'exploitation ou de la mise au point de starter microbien dans différentes industries agroalimentaires (**Nielsen *et al.*, 2005 ; Koen *et al.*, 2012**). Les plus connues de ces industries étant celle de la yaourterie, la fromagerie, la boulangerie, la vinification, la brasserie, la charcuterie (**Smid *et al.*, 2014 ; Graham, 2017 ; Pareira *et al.*, 2017 ; Laranjo *et al.*, 2019, Garcia-Diez et Saraiva, 2021**).

Un starter est un microorganisme ou ensemble de microorganismes utilisés en grande quantité pour accélérer la fermentation et ainsi réduire sa durée par rapport à la durée de fermentation naturelle. De nos jours, il peut également être défini comme un microorganisme ou ensemble de microorganismes permettant d'améliorer la qualité et/ou la stabilité d'un produit fermenté. Ces microorganismes doivent avoir des caractéristiques connues (**Smid *et al.*, 2014**). L'intérêt des starters dans les industries modernes est aujourd'hui à l'origine de divers travaux d'amélioration des produits fermentés parmi lesquelles les produits dérivés du manioc (**Nkoudou et Essia, 2017**), du café (**Pareira *et al.*, 2017**), de la charcuterie (**Laranjo *et al.*, 2019**) et les fèves de cacao, objet de cette étude.

Malgré la similarité d'intervention des principaux genres durant la fermentation des fèves, une grande variété d'isolats a été observée dans différents pays producteurs comme le Ghana, le Brésil, la Malaisie, Trinidad (**Ardhana et Fleet, 2003 ; Jespersen *et al.*, 2005 ; Nielsen *et al.*, 2007**), justifiant ainsi les essais de mise au point et d'exploitation de différents types de starters. Parmi ceux-ci figurent : les starters constitués d'une souche de levure dont *Saccharomyces cerevisiae* var. Chevalieri (**Cempaka *et al.*, 2014**) de plusieurs souches de levures dont *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11, *Pichia kluyveri* CCMA0237, et *Hanseniaspora uvarum* CCMA0236 (**Kresnowati et Febriani, 2015**), de levures et de bactéries dont *Saccharomyces cerevisiae* var. Chevalieri, *Lactobacillus plantarum*, et

*Acetobacter aceti* (**Batista et al., 2016**), et *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii* (**Visintin et al., 2017**).

Malgré l'intérêt de ces travaux sur la qualité organoleptique et physicochimique, très peu de travaux se sont intéressés à la lutte contre la contamination fongique et la production des mycotoxines.



**Chapitre 2 :**  
**MATERIEL ET METHODES**

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### II.1. MATERIEL

Un ensemble de matériel dont certains sont en **Annexe 1** a été utilisé pour la réalisation de cette étude. Il était constitué du matériel biologique, des milieux de culture, des composés chimiques, des réactifs, des standards analytiques, et des équipements.

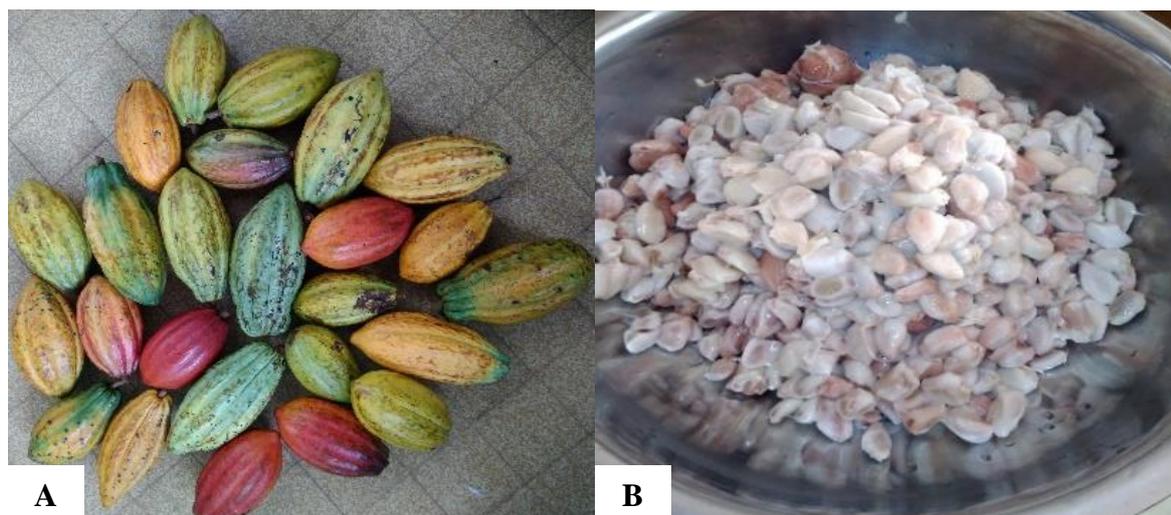
#### II.1.1. Souches microbiennes

Les souches microbiennes utilisées ont été constituées de :

- Dix (10) souches de moisissures utilisées comme souches fongiques cibles des BL et provenant du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I à savoir : *Aspergillus carbonarius* NRRL 368 (codé AC) et *Aspergillus niger* NRRL 612 (codé AN) offertes par l'ARS Culture Collection - BFPM Research Unit National Center for Agricultural Utilization Research (USA), *Aspergillus flavus* codé AF, *Aspergillus fumigatus* M11, *Aspergillus oryzae* M13, *Aspergillus versicolor* M14, *Aspergillus versicolor* M22, *Aspergillus tamarii* M21, *Penicillium citrinum* M7 et *Penicillium citrinum* M8 ; ( les 7 dernières étant isolées des fèves de cacao) (**Annexe 2**). Ces moisissures ont été conservées après revivification dans des tubes de gélose en pente *Potatoes Dextrose Agar* (PDA, Potato Dextrose Agar, CM0139, Oxoid, UK) à température ambiante.
- Trois (03) BL de références également disponibles au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I, à savoir : *Lactobacillus brevis* 207, *Lactobacillus sanfranciscensis* BB12, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14147, provenant du laboratoire du campus Sciences des Aliments de l'Université de Bologne en Italie. Après revivification, ces souches pures ont été conservées à -4°C dans un bouillon MRS (*De Man Rogosa and Sharpe*, MRS broth, LF610025, Italie) supplémenté à 30% (v/v) de glycérol (GE Healthcare, Sigma-Aldrich, ge17-1325-01 St.Louis, MO, USA).
- La souche de référence *Candida parapsilosis* ATCC 20019 (Codé Cp), provenant du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Agronomiques et de Médecine Vétérinaire de Bucarest (USAMVB) en Roumanie. Cette souche a été conservée dans un bouillon Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar, Titan Biotech, TM 387, Inde) après revivification.

## II.1.2. Echantillons de cacao

- Les fèves de cacao hydrides *forastero - trinitario* en fermentation provenaient de Yaoundé, d'Ayos et de Bafia pour l'isolement des BL et des levures durant la période d'Octobre à Décembre 2015;
- Les cabosses de cacao hydrides *forastero - trinitario* (**Figure 14**) provenant de trois cacaoyères des localités de Bafia, Ntui et Ezezang dans la région du Centre Cameroun.



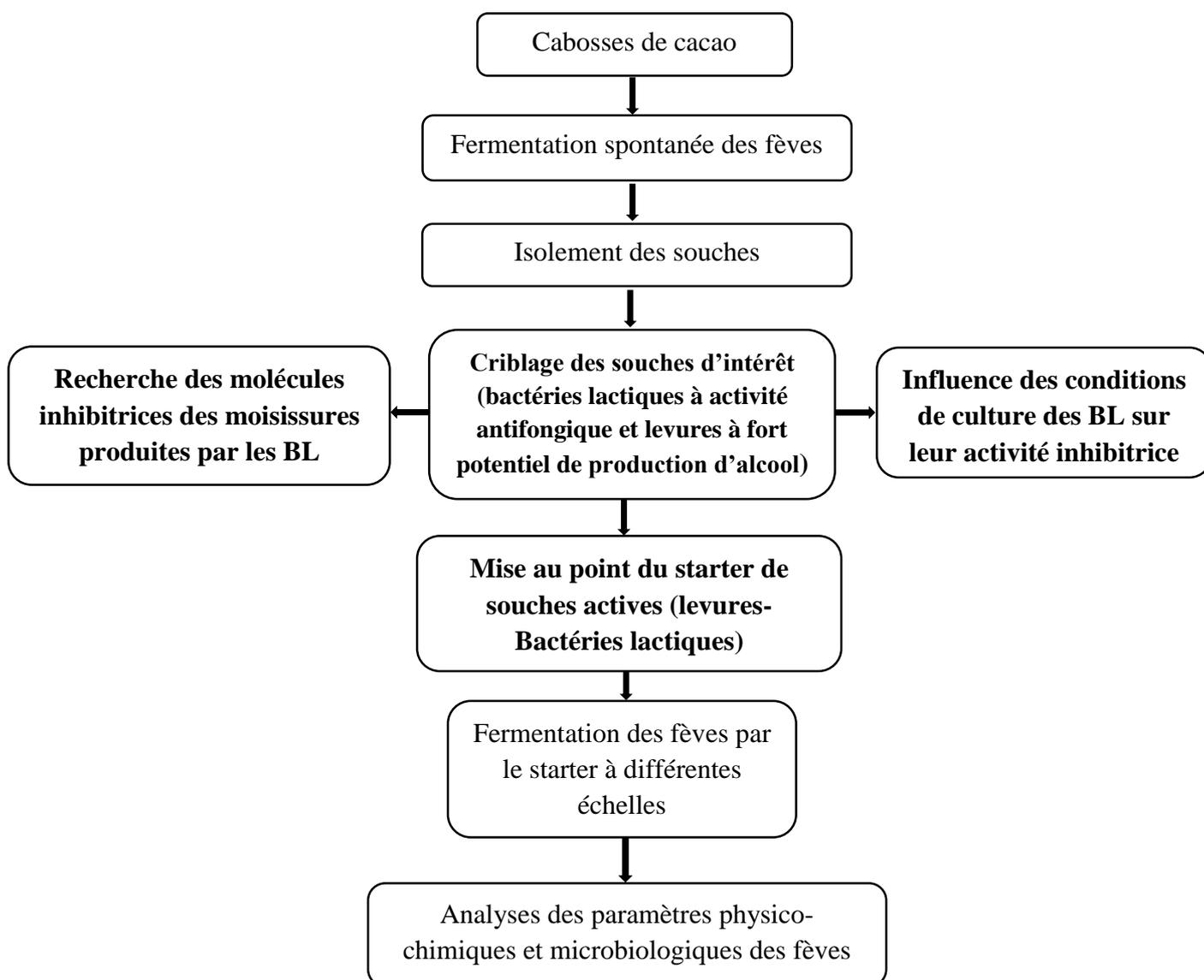
**Figure 14.** Aspect des cabosses de cacao hydrides *forastero-trinitario* (A) et leurs fèves fraîches (B) (Youté, 2019).

## II.2. METHODES

La réalisation de ce travail s'est faite en 3 principales phases correspondant à chacun des objectifs spécifiques préalablement définis:

- 1- La recherche des bactéries lactiques à activité antifongique et des levures à forte aptitude fermentaire isolées de la fermentation des fèves de cacao ;
- 2- La mise en évidence des familles des composés impliqués dans l'inhibition des moisissures et la recherche du paramètre de culture des BL influencant l'inhibition des moisissures ;
- 3- L'évaluation de la qualité des fèves obtenues par l'utilisation du starter constitué des bactéries lactiques à meilleure activité antifongique et des levures à forte production d'éthanol.

Le diagramme synoptique de la réalisation du travail et présenté dans la **Figure 15** :



**Figure 15.** Diagramme synoptique de réalisation du travail

### **II.2.1. Criblage et identification des souches d'intérêt**

La réalisation de ce premier objectif s'est articulée sur 4 étapes :

- 1- Le criblage des bactéries lactiques (BL) à activité antifongique ;
- 2- La caractérisation des souches des bactéries lactiques les plus actives ;
- 3- Le criblage des levures à fort potentiel de production d'alcool ;
- 4- Identification des levures sélectionnées.

### **II.2.1.1. Criblage des bactéries lactiques à activité antifongique**

Ce criblage va de l'isolement des différentes souches de bactéries lactiques aux tests d'antagonisme fongique.

#### **❖ Isolement et purification des bactéries lactiques**

Des masses de 50g des fèves fermentées en tas dans des cacaoyères ont été prélevées de façon aléatoire du 1<sup>er</sup> au 4<sup>ème</sup> jour à température ambiante (25°C) auprès de quatre producteurs locaux dont deux dans la ville de Yaoundé, un dans la ville d'Ayos et un dans la ville Bafia durant la période d'Octobre à Décembre 2015. Les prélèvements ont été conditionnés dans des sachets de congélation en plastique, et transportés au laboratoire dans une glacière contenant des glaçons pour maintenir la température à 4°C. Au laboratoire, les fèves fermentées de différents jours des mêmes producteurs ont été mélangées. Une masse de 25 g de fèves de chaque échantillon a été prélevée puis lavée dans 225ml d'une solution de NaCl 0,9% (p/v) stérile contenu dans un erlenmeyer. La solution obtenue de ce lavage a été soumise à une série de dilutions décimales et chacune de ces dilutions a été ensemencée par étalement à la surface de la gélose *Man, Rogosa and Sharpe* (De Man, Rogosa and Sharpe, MRS Gélose, DIFCO 882, USA) au fluconazole (0,5g/l) pour inhiber la croissance des champignons. Les boîtes de Petri ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 48 heures en conditions aérobies. Les colonies isolées ont été purifiées par repiquages successifs en surface sur la gélose MRS à 37°C pendant 48 heures. L'uniformité des colonies et les observations microscopiques après coloration de Gram ont permis de confirmer la pureté des isolats. Ces derniers ont enfin été soumis à des tests biochimiques permettant de sélectionner les BL. Les souches pures ont été codées et conservées à -4°C dans un bouillon MRS (*De Man Rogosa and Sharpe*, MRS broth, LF610025, Italie) supplémenté à 30% (v/v) de glycérol (GE Healthcare, Sigma-Aldrich, ge17-1325-01 St.Louis, MO, USA).

#### **❖ Sélection des bactéries lactiques inhibitrices des moisissures**

##### **➤ Préparation des inocula de bactéries lactiques et de moisissures cibles**

Les bactéries lactiques précédemment isolées et conservées à -4°C, ainsi que les souches lactiques de référence ont été repiquées trois fois dans un bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 24 heures pour les revivifier.

La préparation des inocula fongiques quant à elle, a consisté en un repiquage de chacune des moisissures cibles sur de la gélose *Potatoes Dextrose Agar* (PDA, Potato Dextrose Agar, CM0139, Oxoid, UK) suivi d'une incubation à 28°C pendant 72 heures. Les spores obtenues de cette culture ont été récupérées par lavage à de l'eau distillée stérile supplémentée de Tween 80 (1% v/v) pour faciliter leur mise en suspension. La solution de spores a été diluée de manière à obtenir une concentration de 5Log spores/ml (évaluée par dénombrement au microscope à l'aide d'un hématimètre de Malassez). Cette dernière solution a été à nouveau ensemencée par étalement sur PDA puis incubée dans les mêmes conditions que précédemment. La nouvelle culture a servi à la réalisation des disques mycélium (taillés à l'aide d'un emporte-pièce de 0,5 cm de diamètre) qui seront utilisés dans les tests d'inhibition.

#### ➤ Test d'inhibition des moisissures

La capacité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des moisissures a été évaluée par la méthode modifiée de **Laref *et al.* (2013b)**. A cet effet, les BL revivifiées et dont la charge de 8Log UFC/ml ont été ensemencées à l'aide d'une anse de platine sur deux fronts polaires distants de 4cm de la gélose MRS coulée en boîte de Petri, puis incubées à 37°C pendant 48 heures en aérobic. Les disques de moisissures initialement préparés ont été déposés au centre de la boîte de Petri contenant les deux fronts de bactéries lactiques et l'ensemble a été incubé à 28°C pendant 3jours. L'arrêt du test s'est fait après une colonisation d'un diamètre supérieur à 4cm à partir du centre de la boîte témoin. Les mesures de ces diamètres ont été prises à l'aide d'un pied à coulisse. Ces analyses *in vitro* ont été réalisées en triplicate et les résultats ont été exprimés en termes de moyennes et d'ecart-type.

Le pourcentage d'inhibition de la moisissure par les différents isolats de BL a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left( \frac{DC-DT}{DC} \right) \times 100 \quad \text{Eq 1}$$

**DC** = Colonisation maximale ou distance colonisée par la moisissure dans le témoin

**DT**= Distance colonisée par la moisissure dans le test en présence des BL

#### II.2.1.2. Identification des souches des bactéries lactiques les plus actives

Les isolats de BL préalablement retenus pour leur forte activité antifongique vis-à-vis des moisissures testées ont été soumis à :

- L'évaluation des caractères biochimiques,
- L'identification moléculaire.

#### ❖ L'évaluation des paramètres biochimiques

La caractérisation biochimique des bactéries lactiques les plus actives isolées des fèves de cacao s'est faite selon le protocole décrit par **Kozaki *et al.* (1992)**, **Yimin *et al.* (1999)** et **Holzapfel *et al.* (2006)**. Les paramètres évalués ont été les suivants:

- La production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) à partir de la réduction du thiosulfate dans le milieu de culture Kligler reconstitué caractérisée par la formation d'un complexe noir avec des ions de fer (III).
- La capacité de dégradation d'une source de carbone : Pour cela, 0,1ml des isolats d'intérêt revivifiés comme précédemment décrit a été ensemencé dans un milieu de base dont la composition est donnée en **Annexe 1** et supplémenté d'une source de carbone à la fois (Glucose, Fructose, Maltose, Lactose, Sucrose, Galactose (D-) Arabinose, L-Rhamnose, (D+) Raffinose, Inositol, Amidon, Cellobiose, Glycérol, Melibiose, Mannitol, Ribose, Xylose, Tréhalose ou Esculine (de Sigma Aldrich, USA)) en présence du rouge méthyl (Merck, Darmstadt, Allemagne) comme indicateur coloré. L'ensemble a ensuite été incubé à 37°C pendant 48 heures et la dégradation de l'hydrate de carbone supplémenté a été mise en évidence par le virage de la couleur de l'indicateur.
- La production de gaz au cours de la fermentation du glucose. Celle-ci a été évaluée par des cloches de Durham introduites dans des tubes à essai contenant un bouillon de culture glucosé. La présence de bulles dans les cloches indiquait la production de gaz (dioxyde de carbone).
- La croissance à 45°C : Elle a été étudiée en incubant un tube contenant du bouillon de culture glucosé inoculé dans les mêmes conditions que précédemment, puis incubé à 45°C pendant 48 heures pour observer la turbidité (signe de croissance bactérienne).

Les résultats obtenus ont été comparés aux contrôles qui étaient constitués d'une solution ne contenant pas de sucre mais inoculée de la même charge microbienne et incubée dans les mêmes conditions que chacune des souches et des solutions contenant les différents sucres mais non inoculées. Ces expériences ont été réalisées en triplicate.

## ❖ L'identification moléculaire des BL antifongiques

### ➤ Extraction des acides nucléiques des BL

Les isolats de BL ayant présenté les meilleures activités antifongiques et leurs caractères biochimiques ont été soumis à une identification moléculaire. Une culture bactérienne obtenue par ensemencement dans un bouillon MRS (*De Man Rogosa and Sharpe*, MRS broth, LF610025, Italie) et incubée à 37°C pendant 48 h comme précédemment décrit a été centrifugée à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire recueilli puis lavé à deux reprises à l'aide de l'eau ultra pure (EMQ, Promega Corp, USA). L'ADN des BL a ensuite été extrait à l'aide du kit d'extraction *QIAamp cador Pathogen kit* (Qiagen, Allemagne) selon les instructions du fabricant détaillées en **Annexe 3** et conservé à -4°C pour les analyses ultérieures.

### ➤ Amplification PCR (*Polymerise Chain Reaction* ou Amplification en Chaîne par polymérisation)

#### - Principe :

Cette méthode biochimique de synthèse de l'ADN est une technique de replication ciblée qui repose sur l'amplification enzymatique in vitro d'un court fragment du génome de l'agent recherché par une enzyme (ADN polymérase).

#### - Protocole :

L'identification moléculaire des BL à meilleure activité antifongique a porté sur l'analyse d'une région spécifique aux bactéries lactiques de l'ADN ribosomique 16S. A cet effet, cette région spécifique aux bactéries lactiques par PCR a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces LacF (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3') / LacR (5'-ATTYCACCGCTACACATG-3') (Promega Corp, USA) générant des fragments de 340 paires de bases (**Ritchie et al., 2010**). La réaction PCR a été effectuée dans un volume réactionnel final de 50µl (dont la composition est donnée en **Annexe 3**) à l'aide d'un thermocycleur multigène (MyCycler thermal cycler, BIO RAD, Hercules, USA) suivant les étapes rapportées au **Tableau IX (Bogdan et al., 2018)**.

**Tableau IX** : Phases décrites pour l'amplification PCR par le couple d'amorces LacF/LacR des BL.

Description de l'étape		Température et durée	Nombre de cycles
Préchauffage (Dénaturation initiale)		94 °C, 2 min	1
Amplification	Dénaturation	9 °C, 15 sec	30
	Hybridation	51 °C, 15 sec	
	Elongation	72 °C, 30 sec	
	Elongation finale	72 °C, 7 min	1

➤ **Séparation et révélation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose**

Les différents produits issus de la PCR ont été séparés par migration sur gel d'agarose 2% (p/v). A cet effet, 10µl d'amplifiat de PCR ont été mélangés à 2 µl de colorant de charge d'ADN (6X *MassRuler DNA Loading Dye*), puis déposés au fond des puits d'un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium (10 µg/µl) baignant dans une cuve contenant une solution de tampon Tris-Borate-EDTA 1X (Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane: 1,5M pH 8,8 , Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane 0,5 pH 6,8) (Sigma-Aldrich, USA). Pour référence, 10µl de *DNA molecular marker-100* (100pb) (Promega Corp, USA) ont été introduits à l'une des extrémités des puits comme marqueur de poids moléculaire pour vérifier à la fois la taille et la concentration des fragments amplifiés. L'électrophorèse a été conduite sous une tension de 90 volts pendant 90 min.

➤ **Séquençage et analyses phylogénétiques**

Les différents amplifiats obtenus à la suite d'une nouvelle amplification identique à la précédente ont été séquencés dans les deux directions et les résultats ont été analysés en utilisant l'alignement multiple des séquences (*Multiple Sequence Alignment, Clustal Omega tool*) au laboratoire BaseClear (Pays-Bas) qui s'est référé à la base de données de séquences de nucléotides EMBL (*European Molecular Biology Laboratory Nucleotide*) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Après nettoyage à l'aide du logiciel ClustalW1.8, les séquences obtenues ont été analysées et identifiées par BLASTn (*Basic Local Alignment Tool nucléotide*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sur la base des données nucléotidiques de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), puis déposées dans cette dernière.

L'analyse phylogénétique des séquences a été effectuée afin d'évaluer leur proximité avec des séquences existantes et d'en déduire leur histoire évolutive. A cet effet, un arbre phylogénétique basé sur des séquences nucléotidiques de 265 nucléotides du gène situé sur l'ARNr 16S de nos isolats et de bactéries lactiques de référence obtenues de la base de données GenBank a été construit. Pour cela, les séquences ont été alignées à l'aide de Clustal Oméga implémenté dans MEGA version 10.2.4 et réaligné à l'aide de MAFFT version 7. L'arbre phylogénétique a ensuite été construit à l'aide de *Seaview* version 5.0.4. La robustesse a été déterminée à l'aide de la méthode *Neighbor-Joining* (Saitou et Nei, 1987 ; Tamura *et al.*, 2004). Les pourcentages des nombres de fois où les taxons se regroupent ensemble ont été calculés à l'aide du test *bootstrap* (1000 répétitions) et indiqués sur les branches. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide du model Jukes et Cantor, et sont estimées en nombre de substitutions par site.

### **II.2.1.3. Criblage des levures à fort potentiel de production d'alcool**

La réalisation de cette partie a été faite en 3 étapes qui sont :

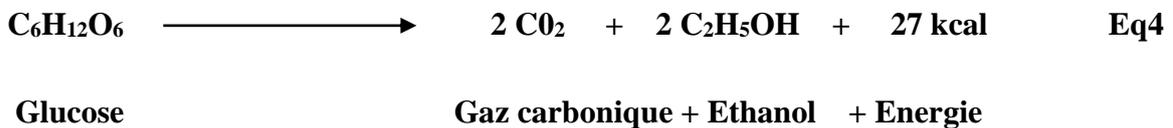
- 1- L'isolement et purification des levures ;
- 2- La sélection des isolats de levures ayant un fort potentiel de production d'alcool.
- 3- Identification des isolats de levures

#### **❖ Isolement et purification des levures**

Les fèves de cacao en fermentation prélevées auprès des producteurs locaux et transportées au laboratoire ont été traitées comme précédemment décrit pour l'isolement des BL. A cet effet, une masse de 25g de fèves a été lavée dans 225ml d'une solution de NaCl 0,9% (p/v) stérile ; et la solution obtenue soumise à plusieurs dilutions décimales avant ensemencement en surface sur gélose Sabouraud (Sabouraud, Titan Biotech, TM387, Inde) au chloramphénicol (0,5g/l) pour inhiber la croissance des bactéries. Les boîtes de Petri ensemencées ont été incubées à 30°C pendant 24 heures, et les colonies isolées ont été purifiées par la méthode des stries dans les mêmes conditions de culture. Les isolats purs sélectionnés sur la base de l'aspect macroscopique de leurs colonies et de l'observation microscopique de leurs cellules ont été codés et conservés à -4°C dans un bouillon nutritif à 30% (v/v) de glycérol (GE Healthcare, Sigma-Aldrich, ge17-1325-01 St.Louis, MO, USA).

### ❖ Sélection des levures à fort potentiel de production d'alcool

Un volume de mucilage frais variant entre 600 et 750ml (en fonction de sa teneur en sucre) a été dilué dans de l'eau distillée stérile afin d'obtenir une concentration en sucre finale de 80g/l. L'extrait ainsi obtenu a été tamisé, réparti à raison de 25ml dans des flacons de 100ml avant d'être stérilisé. Les flacons stérilisés et refroidis ont étéensemencés de 6Log UFC/ml de chaque isolat de levure préalablement revivifiés par trois repiquages successifs dans un bouillon nutritif au glucose incubés à 25°C pendant 24 heures. Les différents flacons ont été incubés sous agitation pendant 40 heures et la production d'éthanol évaluée au cours du temps. La masse et la vitesse de production d'éthanol permettant de sélectionner les meilleurs isolats a été estimée de manière indirecte à partir de la quantité de CO<sub>2</sub> dégagée sur la base de l'équation de Gay-Lussac. Ces expériences ont été réalisées en triplicate.



$$m(\text{Et})t = \frac{m(\text{CO}_2)t * M(\text{Et})}{M(\text{CO}_2)} \quad \text{Eq 5}$$

$$V(\text{Et}) = \frac{m(\text{Et})t - m(\text{Et})i}{t - i} \quad \text{Eq 6}$$

Avec : m(CO<sub>2</sub>)t= masse de CO<sub>2</sub> au temps t , M (CO<sub>2</sub>): masse moléculaire de CO<sub>2</sub>, M (Et): masse moléculaire de l'éthanol, m(Et)t: masse d'éthanol au temps t, m(Et)i: masse d'éthanol au temps initial , V :Vitesse de production d'éthanol, . V(Et) : Vitesse de production d'éthanol, t=Temps t, i= temps initial.

#### II.2.1.4. Identification des levures à fort potentiel de production d'alcool

Les isolats de levures à forte capacité de production d'alcool préalablement retenus ont été identifiés par une approche PCR-ITS-RFLP (*Polymerase chain reaction- internal transcribed spacer region- restriction fragment length polymorphism*) selon le protocole décrit par **Diguta et al. (2011)**, **Sule et al. (2012)** et **Mbuk et al. (2016)**.

##### - Principe

Cette méthode biochimique d'identification des espèces fongiques combine deux autres (PCR et RFLP) en se basant sur les différences des séquences d'ADN d'une région spécifique caractérisant le polymorphisme interspécifique et la variabilité interspécifique des espèces.

➤ **Extraction des acides nucléiques des levures**

Les isolats de levures retenus pour leur capacité de production d'alcool ont été cultivés dans un milieu *Potatoes Dextrose Broth* (PDB) et incubés à 30°C pendant 48 heures. La culture obtenue a été centrifugée à 5000rpm pendant 15 minutes et le culot cellulaire a été recueilli puis rincé comme dans le cas des BL. L'ADN des levures a été extrait par le kit d'extraction d'ADN fongique E.N.Z.A (Omega Bio-Tek, USA) selon les instructions du fabricant détaillées en **Annexe 3** et conservé à -4°C pour les analyses ultérieures.

➤ **Amplification de l'ADN des levures**

La région 5,8S-ITS de l'ADN précédemment obtenu a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Promega Corp, USA) dans les conditions de l'**Annexe 3**. Le mélange réactionnel a été amplifié dans un thermocycleur multigène (MyCycler thermal cycler, BIO RAD, Hercules, USA). Le programme appliqué décrit les phases du **Tableau X**.

**Tableau X:** Etapes décrites par le programme d'amplification de l'ADN des levures.

Description de l'étape		Température et durée	Nombre de cycles
Préchauffage (Dénaturation initiale)		95 °C, 2 min	1
Amplification	Dénaturation	94 °C, 1min	35
	Hybridation	55,5 °C, 2 min	
	Elongation	72 °C, 30 sec	
	Elongation finale	72 °C, 7 min	1

➤ **Digestion par les enzymes de restriction, séparation et révélation des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose**

Les amplifiats de PCR ont été digérés avec les enzymes de restriction (*HhaI*, *HinfI*, *HaeIII* et *DdeI*) (Fermentas, France) dans les conditions de l'**Annexe 3**. Ces amplifiats et leurs fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (p/v) contenant du bromure d'ethidium (10µg/µl). Les révélations se sont effectuées sous lumière UV après une migration sous tension à 90 volts pendant 90 minutes avec en référence un marqueur de taille *DNA molecular marker-100* (100pb) (Promega Corp, USA). Ensuite, les produits de PCR et les profils théoriques ont été comparés à ceux de la souche de référence *Candida parapsilosis* ATCC 20019 (Codé Cp), et également aux données de la littérature.

## **II.2.2. Recherche des familles de composés impliqués dans l'inhibition des moisissures et Influence des conditions de culture des BL sur l'inhibition**

### **II.2.2.1. Recherche des familles de molécules responsables de l'inhibition des moisissures par les BL**

Les bactéries lactiques étant capables d'inhiber d'autres microorganismes par de nombreux mécanismes extracellulaires, la caractérisation de ces derniers s'est faite en 2 phases :

- 1- La préparation des surnageants des BL à forte activité antifongique;
- 2- La recherche des différentes familles de molécules actives produites par les BL à forte activité antifongique.

#### **❖ Préparation des surnageants des BL à meilleure activité antifongique**

Deux des isolats de BL sélectionnées pour leur meilleure activité inhibitrice de la croissance des moisissures ont été revivifiées comme précédemment décrit. Les cellules ont été séparées du milieu par centrifugation à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu a été stérilisé par filtration sur membranes de 0,45µm de diamètre des pores et reparti dans différents tubes à essai stériles pour la recherche de différentes familles de molécules.

#### **❖ Recherche des différentes familles de molécules actives produites par les BL à meilleure activité antifongique**

La mise en évidence de l'inhibition des moisissures par les différents groupes de molécules excrétées dans le milieu extracellulaire par les BL à meilleure activité antifongique a été menée sur les souches *A. carbonarius* NRRL 368 (choisi pour sa faible sensibilité à l'activité inhibitrice des BL et sa capacité à produire l'Ochratoxine A) et *Penicillium citrinum* M8 (choisi pour sa sensibilité à l'activité inhibitrice des BL) par la méthode des puits modifiée de Tzu-Hsing et Tzu-Ming (2019).

➤ **Recherche de l'effet des acides organiques**

- **Dosage des acides organiques par chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatographie HPLC)**

La teneur des acides organiques excrétés par les BL dans le milieu de culture à meilleures activités antifongique testées a été-déterminée par HPLC par la Méthode OIV-MA-AS313-04 : R2009 (Tusseau et Benoit, 1987). L'analyse chromatographique a été réalisée à l'aide d'un système Waters Alliance avec un module de séparation 2695 munie d'un détecteur UV 2487 (Waters; Millipore, Milford, MA, USA). La séparation analytique a été réalisée avec une colonne SUPELCOGEL H Guard (50mm\*4,6mm) en utilisant comme phase mobile du H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 0,1 % à un débit de 0,17 ml/min. La détection UV a été effectuée à 210 nm (correspondant à la longueur d'onde nécessaire pour les solvants alcooliques). A cet effet, une cartouche de l'appareil a été lavée par 10 ml de méthanol puis par 10 ml d'eau distillée stérile. Ensuite, 10 µl des solutions de référence ont été injectées successivement ainsi que 10 µl de chaque échantillon de surnageant de cultures bactériennes obtenues précédemment et 10 µl du bouillon MRS stérile. Les données ont été collectées et analysées avec le système Empower 2.3. Les acides organiques ont été identifiés en fonction de leurs temps de rétention. La quantification a été faite selon l'aire du pic des composés d'une bordure de calibration obtenue en injectant différents volumes d'une solution étalon contenant 30 ng/µl d'acide lactique, 50 ng/µl d'acide acétique, 25 ng/µl d'acide citrique, 40 ng/µl d'acide phenyllactique, 77 ng/µl d'acide gluconique, 50 ng/µl d'acide butanoïque, 32 ng/µl d'acide octanoïque, 48ng/µl d'acide carbonique, 50 ng/µl d'acide pentanoïque (chacun des acides avait une pureté comprise entre 98-99,5% ; Sigma-Aldrich, USA). Ces expériences ont été réalisées en triplicate et les résultats ont été exprimés en termes de moyennes et d'écart-type.

- **Effet de la neutralisation des acides organiques produits par les BL à meilleure activité antifongique sur l'inhibition des moisissures**

La neutralisation du pH des surnageants a servi à mettre en évidence l'implication des acides organiques dans l'inhibition des moisissures par les BL. A cet effet, des puits ont été creusés à l'aide d'un emporte-pièce dans une gélose de PDA préalablementensemencée d'une suspension de 5Log spores/ml de la moisissure cible. Les surnageants stériles des différents isolats ont été ensuite scindés en deux parties chacun : l'une ajusté à pH 7 avec une solution de NaOH 1N (Muhialdin *et al.*, 2011) et l'autre servant de témoin positif. Un volume de 100µl

de chacun des différents surnageants a été introduit dans les différents puits et un témoin négatif constitué d'un bouillon MRS simple a également été introduit dans un puits. L'ensemble des boîtes a été incubé à 25°C pendant 48 heures, et l'inhibition mise en évidence par la taille des auréoles autour des puits a été mesurée par un pied à coulisse. Ces expériences ont été réalisées en triplicate et les mesures obtenues ont été exprimées en fonction de leur intensité d'activité.

- **Recherche de la concentration minimale inhibitrice antifongique de l'acide lactique sur la croissance des moisissures**

Des solutions d'acide lactique de concentrations croissantes de 0 à 50g/l ont été préparées par dilution dans de l'eau distillée. Un volume de 100µl de chacune de ces solutions a été introduit dans les différents puits d'une gélose PDA préalablementensemencée respectivement des moisissures *P. citrinum* M8 et *A. carbonarius* NRRL368. L'ensemble des boîtes a été incubé à 25°C pendant 48 heures, et l'inhibition mise en évidence par la taille des auréoles autour des puits a été mesurée par un pied à coulisse. Ces expériences ont été réalisées en triplicate et les mesures obtenues ont été exprimées en fonction de l'intensité de leur activité.

➤ **Recherche de l'effet des protéines**

- **Mise en évidence de la production des peptides par les BL à forte activité antifongique par Chromatographie sur couche mince**

Un test de présence de peptides a été effectué sur chromatographie sur couche mince avec la ninhydrine comme révélateur pour vérifier la présence des composés protéiques nouvellement formés dans le surnageant de culture des bactéries lactiques qui ont présentées des propriétés antifongiques.

- **Principe :**

Elle est basée sur la migration par capillarité des composés selon leur différence d'affinité entre une phase fixe (plaque de silice) et le solvant ou éluant ou phase mobile. Cette différence va permettre la séparation de ces différentes substances sur la plaque.

- **Protocole :**

Un volume de 4 µl de surnageants bactériens et de milieu MRS stérile (Control négatif) a été déposé (en deux fois sur le même point ou double dépôt) sur une phase stationnaire (plaque de silice) en verre de dimension 10 cm/10 cm. Après séchage, la plaque a été mise dans une cuve saturée contenant comme solvant de migration (Phase mobile), un mélange butanol - acide acétique-eau (70 :18 :12 v/v). Après 2 heures de migration, la plaque a été séchée à l'air

froid puis soumise à la révélation par aspersion d'une solution de ninhydrine à 1% dans de l'éthanol. Les rapports frontaux (Rf : La distance parcourue par une substance par rapport à la distance parcourue par le solvant) ont été relevés. Il est à noter qu'en général, les composées protéiques sont de couleur pourpre après révélation à la ninhydrine.

**- Dosage de protéines totales dans les surnageants bruts des bactéries lactiques**

La teneur en protéines totales a été évaluée par la méthode quantitative de Bradford qui se fait par dosage colorimétrique, réalisée à l'aide de quantités connues de l'albumine de sérum bovin (BSA) du **Tableau XI (Bradford, 1976)**.

**Principe :**

C'est une méthode colorimétrique basée sur le changement d'absorption et donc de coloration du bleu de Coomassie G-250 qui vire du rouge –marron au bleu après liaison avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phenylalanine) et les résidus hydrophobes des protéines.

**Tableau XI:** Dosage des protéines par la méthode de Bradford.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Extrait
<b>Solution de BSA 0,1mg/ml (µl)</b>	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	-
<b>Volume de l'extrait</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	800
<b>Eau distillée (µl)</b>	800	790	780	770	760	750	740	730	720	710	700	-
<b>Réactif de Bradford (µl)</b>	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

Incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant 20minutes puis lire la DO à 595nm

Les poudres obtenues de la lyophilisation des surnageants des cultures bactériennes ont été reprises à une concentration de 2 mg/ml dans de l'eau distillée et diluées au dixième. Ensuite, un volume de 200 µl de réactif de Bradford a été ajouté à 800 µl de la solution du surnageant diluée. L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 20 minutes avant la lecture des densités optiques à 595 nm. Le même protocole a été suivi pour les fractions actives. La quantité de protéines de chaque prise d'essai a été déterminée en se reportant à la courbe d'étalonnage d'équation de régression :  $y = 0,0923x + 0,0257$  ( $R^2 = 0,99$ ) présenté dans l'**Annexe 4**. Ces expériences ont été réalisées en triplicate et les résultats ont été exprimés en termes de moyennes et d'écart-type.

- **Mise en évidence de l'effet des protéines produites par les BL à forte activité antifongique sur l'inhibition des moisissures**

La mise en évidence de l'inhibition des moisissures par les molécules de nature protéique a été conduite de manière similaire à celle des acides organiques. A cet effet, les surnageants ont été divisés en 4 parties : l'une servant de témoin, les deux autres soumises à un traitement thermique de 121°C pendant 15 minutes (**Muhialdin et al., 2011**) , la dernière soumise à l'activité d'une enzyme protéolytique ; dans ce dernier cas le surnageant ajusté à pH 7 a été additionné de la protéinase K (Sigma-Aldrich, USA) à une concentration finale de 1 mg/ml. Le mélange (surnageant + enzyme) a été incubé pendant 1 heure à 37°C avant d'être introduit dans les puits. Ces expériences ont été réalisées en triplicate et les mesures obtenues ont été exprimées en fonction de leur intensité d'activité.

- **Fractionnement des composés**

Ce test a été mené selon le protocole de **Muhialdin et al. (2016)** avec quelques modifications. Une masse de 0,5 g de surnageant lyophilisé a été dissoute dans 2 ml d'eau distillée et la solution obtenue a été fractionnée sur un gel de Sephadex G-25. Cette résine est capable de séparer les composés de tailles comprises entre 1 et 5 KDa. La poudre de résine a initialement été dissoute dans de l'eau distillée bouillante pendant 3 heures et l'eau de dissolution a été remplacée par rinçage au tampon de migration PBS. La résine a été lavée et dégazée avec du HCl 5 M, puis coulée dans une colonne de 50 cm de longueur et de 1,6 cm de diamètre. La migration s'est faite à l'aide d'une phase mobile constituée du PBS 0,2 M, pH 7. Le débit a été ajusté à 0,5 ml par minute dans une chromatographie liquide analytique couplée à un détecteur diode DAD (*diode array detector*, L-7455 de Hitachi (Tokyo, Japon)) et d'un passeur automatique d'échantillons L-2200 (Boucle de 20ml) permettant l'obtention de 80 fractions. Les composés élués ont été suivis en mesurant l'absorbance à 214nm pour identifier les fractions positives.

- **Activité antifongique des fractions**

Les fractions obtenues précédemment ont été testées pour leur activité antifongique par la méthode des puits dans les conditions décrites plus haut en introduisant 100 µl de chaque fraction dans un puits de gélose PDA préalablementensemencée de moisissures (**Yang et Chang 2010**). La teneur en protéines totales des fractions actives a été évaluée par la méthode de Bradford comme précédemment décrite. Les expériences ont été menées en triplicate et les mesures obtenues ont été exprimées en fonction de leur intensité d'activité.

### ➤ Recherche du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène peut être décomposé par la catalase à une concentration finale de 1 mg/ml. De ce fait, 5ml de filtrat acellulaire a été supplémenté par 5 mg de catalase (Shaanxi, Chine). Le mélange (surnageant + enzyme) a été incubé pendant 1 heure à 37°C avant d'être introduit dans les puits. Ces expériences ont été réalisées en triplicate et les mesures obtenues ont été exprimées en fonction de leur intensité d'activité.

### II.2.2.2. Impact des conditions de culture des BL sur l'inhibition des moisissures par leurs surnageants

Les conditions de culture des bactéries lactiques peuvent avoir une influence sur leur capacité à produire des molécules antifongiques ou à réduire la croissance d'autres microorganismes (**Batish *et al.*, 1990; Sathe *et al.*, 2007 ; Hayek et Ibrahim, 2013**). Cette partie du travail a été effectuée en vue d'évaluer l'effet des conditions du milieu de culture fermentaire sur la production extracellulaire des molécules antifongiques par les BL, et donc qui promeuvent une réduction optimale de la croissance des moisissures dans un milieu comme celui du cacao en fermentation. Pour ce faire, la BL qui a présenté la meilleure capacité à inhiber la croissance des moisissures et une BL parmi les plus représentatives ont été choisies pour cette partie des travaux.

La réalisation de cette partie s'est faite en 2 phases :

- 1- La culture des isolats lactiques dans différentes conditions expérimentales et la comparaison des charges cellulaires obtenues.
- 2- La réalisation des tests d'inhibition des moisissures avec les surnageants obtenus des différentes conditions de culture

#### ❖ Variation des conditions de culture des bactéries lactiques inhibitrices des moisissures selon un plan expérimental

Les deux isolats de BL (Lab11.1 et A19) sélectionnées pour leur meilleure activité inhibitrice de la croissance des moisissures et revivifiées comme précédemment décrit ont été cultivées dans différentes conditions de culture selon un plan expérimental fractionnaire  $3^{3-1}$  utilisé en vue de déterminer les conditions qui influencent la production des molécules inhibitrices des moisissures dans un milieu similaire à celui du mucilage de cacao. Ce plan expérimental avait comme variables le pH du milieu, sa teneur en sucre et la température d'incubation (**Tableau XII**). Un milieu de simulation de pulpe a été préparé en diluant des ingrédients dans l'eau de façon à obtenir les proportions de : 1,5% de pectine, 2% d'acide

citrique, 2,5% de protéines 0,05% de sulfate de Magnésium, 0,02% de sulfate de Manganèse. Selon le plan expérimental, la teneur en sucres variait de 10 à 20% (rapport fructose 50%, glucose 25%, saccharose 25%), et le pH de 3,5 à 5,5 (Lefeber *et al.*, 2010 ; Apriyanto *et al.*, 2016).

**Tableau XII:** Plan expérimental contenant les valeurs réelles des niveaux testés.

Essais	Niveaux codés			Niveaux réels		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	pH (X <sub>1</sub> )	Concentration en sucre (%) (X <sub>2</sub> )	Température (°C) (X <sub>3</sub> )
<b>1</b>	-1	-1	-1	3,5	10	25
<b>2</b>	-1	0	1	3,5	15	45
<b>3</b>	-1	1	0	3,5	20	35
<b>4</b>	0	-1	1	4,5	10	45
<b>5</b>	0	0	0	4,5	15	35
<b>6</b>	0	1	-1	4,5	20	25
<b>7</b>	1	-1	0	5,5	10	35
<b>8</b>	1	0	-1	5,5	15	25
<b>9</b>	1	1	1	5,5	20	45
<b>10</b>	0	0	0	4,5	15	35

Pour chacune des BL, les tubes ont étéensemencés d'une charge initiale de 6Log UFC/ml puis incubés sous agitation à la température à tester (25, 35 ou 45°C) pendant 48 heures (temps moyen de culture des BL en milieu liquide). Parallèlement, une culture a été faite dans le milieu MRS à 37°C pendant 48 heures pour servir de témoin. Les charges des BL obtenues ont été évaluées après dilution et ensemencement sur gélose MRS suivis d'une incubation à 37°C pendant 48 heures. Ces expériences ont été réalisées en triplicate et les résultats ont été exprimés en termes de moyennes et d'écart-type.

#### ❖ Test d'inhibition des moisissures

Les cultures des BL obtenues dans les différentes conditions ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Leurs surnageants ont été stérilisés par filtration sous vide au travers d'une membrane de 0,45µm de diamètre des pores. Ensuite, 1 ml de surnageant de chacune des conditions a été incorporé à 15ml d'une gélose PDA encore liquide dans une boîte de Pétri, homogénéisé pendant environ 15 secondes et laissé au repos pour solidification. Par la suite, cette gélose a étéensemencée par dépôt d'un spot de 5 µl d'une suspension de spores d'*A. carbonarius* NRRL 368 à la charge 5 Log spores/ml au centre de la boîte. Le surnageant obtenu de la culture des bactéries lactiques dans du bouillon MRS a été utilisé comme témoin positif car il constitue le milieu initial d'évaluation des propriétés antifongiques des BL. Aussi, le MRS stérile non inoculé a été utilisé comme contrôle négatif. Le suivi de l'évolution de la

croissance fongique s'est fait sur 2 à 5 jours à 30°C par la mesure du diamètre de colonisation de la boîte par la moisissure, à l'aide d'un pied à coulisse et les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule de **Laref *et al.*, (2013b)** précédemment décrite (**Eq1**). Toutefois le temps retenu pour l'expression des résultats a été 2 jours car au bout de ce dernier, les pourcentages d'inhibition ont été les plus exprimés visuellement. Ce test d'inhibition a été fait en triplicate et les résultats ont été exprimés en termes de moyennes et d'écart-type.

### **II.2.3. Mise au point d'un starter de fermentation des fèves de cacao**

Les levures et les bactéries lactiques représentant les principaux microorganismes de la fermentation, la levure à meilleure production d'alcool et la BL à meilleure activité antifongiques initialement choisies ont été testées comme starter pour améliorer la qualité des fèves de cacao. La mise au point de l'utilisation de ce starter à deux souches a comporté les étapes suivantes :

- 1- La détermination des concentrations en levure à fort potentiel de production d'alcool et en BL antifongique permettant respectivement de réduire la durée de fermentation et de limiter la croissance d'*A. carbonarius* NRRL368 ;
- 2- La réalisation d'essai d'application des meilleures combinaisons de ces microorganismes durant la fermentation des fèves à différentes échelles de grandeur.

#### **II.2.3.1. Détermination des concentrations des microorganismes du starter**

##### **❖ Conditions de fermentation**

La durée de fermentation et la qualité des produits étant influencées par la concentration initiale des inocula, une recherche préalable des meilleures concentrations en levure et en BL précédemment sélectionnées a été réalisée pour la mise au point du starter microbien à deux souches.

Pour cela, des cabosses de cacao récoltées et transportées au laboratoire dans un sac en polyéthylène ont été lavées à l'eau contenant un détergent suivi d'un rinçage, puis trempés dans une solution chlorée à 2% (v/v) pendant 10 minutes afin de réduire au maximum la flore naturelle présente sur les cabosses. Elles ont ensuite été ouvertes en conditions aseptiques à l'aide d'un couteau et les fèves extraites ont été réparties par masse d'1 kg dans des bocaux en plastique. Les masses d'1kg de fèves ont ensuite été mélangées à 1 ou 10ml d'une suspension de microorganismes d'intérêt à 9 log UFC/ml de manière à obtenir des concentrations initiales de 6

ou 7 log /g de fèves. Le choix de ces concentrations supérieures à 5log visait à accélérer le processus de fermentation et à limiter l'activité de la flore naturelle. Les différents échantillons de fèves ont été inoculés au laboratoire avec des concentrations variables de levure et de bactéries lactique préalablement revivifiées (à des charge variables de 6 ou 7 Log/g en se référant aux charges maximale de starter pouvant être utilisées), en présence de la moisissure *A. carbonarius* à la charge de 6 Log spores/g selon le plan du **Tableaux XIII** puis transférés dans des bocaux en plastique perforés. En plus de ces conditions, un contrôle négatif (non inoculé) a également été mis en fermentation. Ces différents échantillons ont été soumis à un profil de température comparable à celui des fermentations paysannes à savoir: 0-24 heures à 30°C, 24-48 heures à 35°C, 48-72 heures à 40°C, 72-120 heures à 50°C (Cempaka et *al.*, 2014).

**Tableau XIII:** Plan expérimental contenant les valeurs réelles des niveaux testés des concentrations de levures et BL.

N° de l'essai	Charge initiale en Levures (en Log UFC /g)	Charge initiale en Bactéries lactiques (en Log UFC /g)	Charge initiale en moisissures (en Log spore/g)	Codes des échantillons
1	0	0	6	M
2	0	6	6	LabM1
3	0	7	6	LabM2
4	6	0	6	LevM1
5	7	0	6	LevM2
6	6	6	6	LLM1
7	7	7	6	LLM2
8	6	7	6	LLM3
9	7	6	6	LLM4
10	0	0	0	C

Pendant ces fermentations, des fèves ont été prélevées à 0, 48 et 96 heures pour des analyses microbiologiques portant sur l'évaluation de la charge en moisissures servant à la détermination du taux d'inhibition de la moisissure, des analyses physico-chimiques sur le mucilage (teneur en sucre réducteur et l'acidité du mucilage) et des analyses physiques sur les fèves pour la détermination du grade des fèves de cacao obtenues.

#### ❖ Détermination de la charge des moisissures et déduction des pourcentages d'inhibition

Une masse de 10 g de fèves de cacao en fermentation a été prélevée à 0, 48 et 96 heures , lavé chacune dans 90 ml d'eau distillée stérile supplémenté de tween 80 (1% v/v). Cette solution a subi des dilutions décimales pour déterminer la concentration en moisissures de chaque condition par dénombrement sur milieu PDA au chloramphenicol.

Les charges de moisissures obtenues en présence et en absence des différentes combinaisons de starter lactobacilles -levures ont été utilisées pour la détermination du pourcentage d'inhibition de la moisissure par les souches d'intérêt. Ce pourcentage d'inhibition a été calculée selon la formule (Eq 8) ci-dessous et la combinaison des deux souches présentant la meilleure inhibition a été retenue comme starter pour des essais de fermentation des fèves de quantité plus importante. Ces expériences ont été menées en triplicate et les résultats ont été exprimés en termes de moyennes et d'écart-type.

$$PI(\%) = \left(1 - \left(\frac{\text{Nombre de colonies fongiques en coculture}}{\text{Nombre total de colonies fongiques en absence de coculture}}\right)\right) \times 100 \quad \text{Eq 8}$$

#### ❖ Dosage des sucres du mucilage

La fin du processus de fermentation pouvant dépendre de l'épuisement des sucres de la pulpe dans le milieu fermentaire lié à la consommation de ces derniers par les micro-organismes pour leur métabolisme, la teneur en sucres réducteurs a été évaluée par la méthode à la Liqueur de Fehling afin de déterminer le moment probable d'arrêt de la fermentation.

Le principe de ce test repose sur l'oxydation des sucres réducteurs en présence de la liqueur de Fehling à chaud. Il se forme alors un complexe de coloration rouge brique dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de sucres présents.

A cet effet, un volume de 1ml de la solution de mucilage des tests précédents a été mélangé à 1 ml de liqueur de Fehling puis l'ensemble a été porté au bain marie à 80°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, la lecture de la densité optique du complexe formé s'est faite à 510 nm et les teneurs en sucre réducteurs présents dans chaque échantillon ont été déterminées grâce à la droite d'étalonnage faite en utilisant une solution de glucose de concentration connue comme témoin. Les conditions opératoires ont été celles du **Tableau XIV**. La quantité de sucres de chaque prise d'essai a été déterminée en se reportant à la droite d'étalonnage d'équation de régression :  $y = 0,3756x - 0,0019$  ( $R^2 = 0,99$ ) présentée dans l'**Annexe 4**.

**Tableau XIV:** Condition de réalisation de la droite d'étalonnage des sucres réducteurs.

	Solutions standard de glucose 1 g/l											Extrait
<b>Volume à prélever (ml)</b>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1
<b>Eau distillée (ml)</b>	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0	0
<b>Liqueur fehling (ml)</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Porter au bain marie bouillant pendant 5 minutes puis refroidir et lire la D0 510 nm</b>												

### ❖ Acidité titrable du mucilage

Le dosage de l'acidité s'est fait par titration selon la méthode décrite par **Apriyanto et al. (2016)** avec quelques modifications. Pour cela, 10 ml de filtrat obtenu du lavage de 10 g de fèves dans 90 ml d'eau distillée chaude ont été utilisés pour le dosage acido-basique. Le dosage s'est effectué avec la soude à la concentration 0,1N et en présence de la phénolphtaléine à 1% utilisée comme indicateur coloré. Après dosage, la concentration pondérale ( $C_P$ ) de l'acide de chaque échantillon a été déterminée d'après la formule :

$$C_P = 0,81V_b \quad \text{Eq 9}$$

Les résultats ont été exprimés en équivalent gramme d'acide lactique/g de fèves avec  $V_b$  : correspondant au volume de base versée.

### ❖ Test à la coupe ou « Cut Test » des fèves de cacao

Le grade des fèves de cacao a été déterminé à partir du test à la coupe selon le protocole de **Guehi et al. (2008)**. Après la fermentation, les fèves ont été séchées au soleil jusqu'à une teneur en eau inférieure ou égale à 8% avant d'être soumis au test à la coupe. La détermination de la matière sèche a été effectuée par la méthode de **AFNOR (1982)**. Une masse  $M_0$  de l'échantillon est séchée à 105 °C jusqu'à poids constant dans une étuve pendant 24 heures. Le résidu sec total ou matière sèche (MS) est exprimé en pourcentage de matière fraîche selon la formule :

$$\%MS = [(M_2 - M_0)/(M_1 - M_0)] \times 100 \quad \text{Eq 10}$$

avec  $M_0$  : la masse en gramme de la capsule vide;  $M_1$  : masse en gramme de la capsule contenant la prise d'essai avant étuvage;  $M_2$  : masse en gramme de la capsule contenant la prise d'essai;

le test à la coupe a pour objectif de vérifier la présence de mycellium visible à l'intérieur des fèves et le degré de fermentation par l'appréciation visuelle des fèves. En effet, trente fèves coupées longitudinalement ont été observées à la lumière du jour afin d'apprécier la qualité physique des fèves basée sur leur couleur et leur degré de contamination. Ces observations permettent de ranger les fèves en 3 grades en fonction du pourcentage de défauts : le groupe constitué de fèves marron ou brunes dites de bonne qualité (grade 1) ; les fèves présentant des défauts constituées de fèves moisies, ardoisées, violettes, les mitées et des fèves germées (grade 2 et Hors standard) selon la norme camerounaise NC 218: 2004/01.

### II.2.3.2. Essais d'application du starter durant la fermentation des fèves à différentes échelles de grandeurs

La meilleure combinaison de levure et BL du starter précédemment retenue a été expérimentée dans la fermentation des fèves à différentes échelles de grandeurs : Tas de fèves d'1 kg (au Laboratoire), de 10 kg (fermentés en conditions paysannes dans des sacs en polyéthylène à Yaoundé) et de 25 kg ( en milieu rural à Ntui, Chef-lieu du département du Mbam et Kim, région du centre Cameroun). En effet, les cabosses de cacao ont été récoltées en champ et transportées dans des sacs au laboratoire pour les deux premiers cas et conservées en champ pour le dernier cas. Le lendemain de la récolte les cabosses ont été ouvertes et les fèves fraîches ont été introduites dans des cuvettes en plastique, mélangées, puis inoculées par les différents microorganismes du starter selon les conditions prévues. Les fèves fraîches inoculées ont été respectivement introduites dans des bocal perforés (1 kg), des sacs en polyéthylène (10 kg) ou versées sur des feuilles de bananiers et recouverts de ces mêmes feuilles (25 kg) selon la période des essais. Toutes les fermentations ont été menées pendant 5 jours. Les conditions considérées pour les différentes fermentations ont été celles du **Tableau XV**.

**Tableau XV:** Conditions des fermentations à différentes échelles.

Conditions	Codes	Charge en levure du starter (Log UFC /g)	Charge en BL du starter (Log UFC /g)	Charge en moisissure (Log spore /g)
Fèves fermentées naturellement (Contrôle négatif)	C	0	0	0
Fèves fermentées avec la levure et la bactérie lactique	LL	6	6	0
Fèves fermentées avec la levure et la bactérie lactique en présence de la moisissure	LLM	6	6	6
Fèves fermentées en présence de la moisissure (Contrôle positif)	M	0	0	6

Durant ces essais, les fèves ont été prélevées aux heures 0, 48, 72, 96 et 120. Une partie de chaque prélèvement a été utilisée frais et l'autre séchée au soleil sur des baches jusqu'à une humidité inférieure ou égale à 8% à une température ambiante de  $28 \pm 3^\circ\text{C}$  pendant en moyenne 10 jours. Ces fèves ont servi pour des analyses des paramètres de fermentations

concernant le mucilage et les fèves. Les analyses de qualité microbiologique étaient : la charge en levures, la charge en bactéries lactiques, la charge en moisissures (qui permettait de déduire les taux d'inhibition). Et les analyses physicochimique étaient : le profil de température au cours des fermentations, le profil de pH du mucilage et des fèves, les sucres totaux du mucilage, l'indice de fermentation des fèves, la teneur en polyphénols totaux des fèves, le grade des fèves et la teneur en ochratoxine A des fèves).

#### ❖ **Analyses microbiologiques**

Les fèves ont été prélevées (10 g ou 25 g) et lavées à 90 ou 225ml d'eau physiologique supplémentée de tween 80 comme précédemment décrit. Les dilutions décimales réalisées ont servi pour le dénombrement de la flore lactique sur milieu MRS au fluconazole (0,5 g/l), et pour le dénombrement des moisissures sur milieu PDA au chloramphénicol (0,5 g/l). Le dénombrement des levures s'est fait par comptage au microscope optique à l'aide de l'hématimètre de Malassez. Les charges de moisissures obtenues en présence et en absence du starter des lactobacilles et des levures ont été utilisées pour la détermination du pourcentage d'inhibition de la croissance des moisissures par les souches d'intérêt selon la formule de l'équation 8. La solution mère initialement préparée a également servi pour d'autres tests physicochimiques.

#### ❖ **Analyses physicochimiques**

Elles permettent d'évaluer le degré de fermentation et la qualité des fèves de cacao pendant et après la fermentation.

##### ➤ **Analyses sur le mucilage**

###### - **Profil du pH du mucilage**

Il a été déterminé par la méthode de **Hii et al. (2009)**. Pendant et à la fin de la fermentation, le pH du mucilage a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre à partir de la solution mère préparée initialement selon la méthode de l'**AOAC (1970)**. Dix grammes (10 g) de l'échantillon ont été homogénéisés dans 90 ml d'eau distillée chaude, et filtré à travers le papier filtre Whatman # 4 pour éliminer les particules solides. Ensuite, un aliquot de 25 ml a été pipeté dans un bécher et le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre préalablement calibré aux tampons phosphate de pH 4,01, 7,00 et 9,21.

## - Dosage des sucres totaux dans le mucilage

Il a été réalisé selon la méthode de **Dubois *et al.* (1956)**. En milieu acide et à chaud, les pentoses (C<sub>5</sub>) et hexoses (C<sub>6</sub>) subissent une cyclisation pour donner respectivement le furfural et l'hydroxyméthyl furfural. Les composés ainsi formés réagissent avec le phénol pour donner un complexe coloré jaune-orangé qui absorbe dans le visible à des longueurs d'ondes variants entre 450-500 nm avec une absorption maximale à 490 nm.

Cette méthode comporte deux étapes principales à savoir l'extraction et le dosage. En effet, 0,5 ml d'extrait de mucilage de chaque échantillon a été introduit dans un tube à essai contenant 5 ml d'acide sulfurique (1,5 N). Le mélange a été porté à ébullition pendant 45 minutes puis refroidi à 25°C. Ensuite, 10 ml d'éthanol à 70%, 1 ml d'acétate de zinc (2% p/v) et 1 ml de ferrocyanure de potassium (10,6 % p/v) ont été ajoutés. Le mélange a été filtré dans une fiole de 50 ml et le volume ajusté au trait de jauge. Après extraction, 0,375 ml d'extrait ont été mélangés à 0,5 ml de phénol (5 %), 4,625 ml d'eau distillée et 2,5 ml d'acide sulfurique concentré dans un tube à essai. Après 10 minutes au repos et à température ambiante, l'ensemble a été homogénéisé puis porté dans un bain marie maintenu à 100°C pendant 20 minutes. La densité optique de la coloration orangée développée a été lue au spectrophotomètre à 490 nm contre un blanc (exempt d'échantillon) préparé dans les mêmes conditions (**Tableau XVI**). La quantité de sucres totaux de chaque prise d'essai a été déterminée en se référant à la droite d'étalonnage tracée avec une solution de glucose 1 g/l et d'équation de régression :  $y = 1,1803x - 0,0119$  ( $R^2 = 0,99$ ) présenté dans l'**Annexe 4**.

**Tableau XVI:** Conditions de réalisation de la droite d'étalonnage des sucres totaux.

N° des tubes	Blanc	1	2	3	4	5	Extrait
<b>Etalon de glucose à 1mg/ml (ml)</b>	0	0,125	0,25	0,375	0,5	0,625	0
<b>Echantillon à doser (ml)</b>	/	/	/	/	/	/	0,375
<b>Phénol aqueux 5% (ml)</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Acide sulfurique (d =1,83) (ml)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>Eau distillée (ml)</b>	5	4,875	4,75	4,625	4,5	4,375	4,625
Laisser reposer 10 minutes, agiter, puis incuber au bain-marie à 100°C pendant 20 minutes							
Lecture de la DO à 490 nm							

### ➤ Analyses sur les fèves

#### - Profil de température des masses fermentaires

La température au milieu de la masse de fèves en fermentation a été déterminée toutes les 24 heures à l'aide d'un thermomètre électronique.

### - Profil du pH des fèves

Il a été évalué par le même protocole que celui du mucilage en homogénéisant 10 g de poudre de fèves sèches dans 90 ml d'eau distillée chaude pendant une minute suivi de la filtration sur papier filtre Whatman # 4 et de la mesure à l'aide d'un pH-mètre (Hii *et al.*, 2009).

### - Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été dosés selon la Méthode du Folin-ciocalteu (Marigo, 1973). C'est une méthode colorimétrique basée sur les réactions d'oxydo-réductions du Folin-Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PM_{12}O_{40}$ ) de coloration jaune. Dans un milieu alcalin, le Folin-Ciocalteu réagit avec les composés phénoliques ; cette réaction est basée sur l'oxydation des phénols et la formation d'un complexe bleu de molybdène tungstène.

L'extraction a consisté à introduire 1 mg d'échantillon dans un bécher dans lequel ont été ajoutés 40 ml d'acétone (80% v/v). Le mélange a été laissé au repos pendant 24h, suivi d'une filtration à l'aide du papier Whatman # 4. Les extraits obtenus ont été dosés suivant le protocole du **Tableau XVII**. Ainsi, la quantité de polyphénols totaux dans chaque essai a été déterminée en se référant à la droite d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution d'acide gallique avec pour équation :  $y = 0,0062x + 0,0192$  ( $R^2 = 0,97$ ) de l'**Annexe 4**.

**Tableau XVII:** Conditions de réalisation de la droite d'étalonnage des polyphénols totaux.

N° des tubes	Blanc	1	2	3	4	5	Extrait
<b>Étalon d'acide gallique à 1mg/ml (µl)</b>	0	20	40	60	80	100	0
<b>Echantillon à doser (µl)</b>	/	/	/	/	/	/	40
<b>Eau distillée (ml)</b>	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0	1,8	2,4
<b>Folin ciocalteu 1N (ml)</b>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Agiter et laisser reposer pendant 5-10 minutes à température ambiante et à l'obscurité							
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% (ml)</b>	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Agiter et laisser reposer pendant 1heure à température ambiante et à l'obscurité							
Lecture de la DO à 725 nm							

### - Indice de fermentation des fèves

Il a été évalué par la méthode de Cempaka *et al.* (2014). Des cotylédons de fèves fraîches ont été prélevés au courant des fermentations, broyées et 0,5 g de la pâte obtenue a été mélangé à 50 ml d'un mélange méthanol-HCl (97: 3 v/v). L'homogénat a été laissé au réfrigérateur (8°C) pendant 16 à 19 heures, puis filtré à l'aide du papier Wattman # 4 à l'obscurité. La densité optique du filtrat a été déterminée par un spectrophotomètre. L'indice

de fermentation de l'échantillon a été obtenu en calculant le rapport de l'absorbance à 460 nm à l'absorbance et à 530 nm.

$$IF = \frac{\text{absorbance des fèves broyées à 460nm}}{\text{absorbance des fèves broyées à 530nm}} \quad \text{Eq 11}$$

- **Test à la coupe ou « Cut Test »**

Il a été réalisé comme précédemment décrit dans la section II.2.3.1.

- **Quantification de la production de l'ochratoxine A dans les fèves**

Après fermentation et séchage, les fèves de cacao ont été séparées en deux parties, la première destinée à l'analyse de la teneur en OTA juste après la fermentation et la deuxième destinée à cette analyse au cours du stockage dans des sacs en jute à une température ambiante de 28 à 30°C. La préparation des échantillons et le dosage ont été réalisés par la méthode enzymatique ELISA selon les instructions du fabricant du Kit (Ochratoxin A ELISA Test KIT, Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co., Ltd) détaillées en **Annexe 4**.

Les différents échantillons ont subi une extraction liquide-solide. En effet, les fèves de cacao sèches fermentées ont été broyées finement. L'extraction a été réalisée avec du méthanol 70% (v/v) dans de l'eau distillée sur des échantillons de 10 g à un ration 5 :1 en agitant à 4000 rpm à 25°C pendant 10 minutes. L'extrait a ensuite été filtré avec un papier watman # 4 et 1 ml de filtrat dilué a été mélangé à 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1M , dont 50 µl a été prélevé pour le dosage.

Le principe du protocole de dosage était le suivant : un standard ou un échantillon est ajouté dans un puits approprié et si l'ochratoxine A est présente, elle se fixe à l'anticorps enrobé. Ensuite l'ochratoxine A liée à la peroxydase de raifort (TMB) est ajouté et se lie à l'anticorps qui n'est pas déjà occupé par l'OTA présente dans le standard ou dans l'échantillon. Après la période d'incubation, le contenu des puits est décanté, lavé et on ajoute le substrat TMB qui développe une couleur bleu en présence de l'enzyme. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité du conjugué lié ou inversement proportionnelle à la quantité d'OTA dans le standard ou l'échantillon dont la lecture de la densité optique a été faite à 450nm. Par conséquent, plus la concentration en OTA dans le standard ou l'échantillon augmente, plus l'intensité de la couleur bleue diminue. La réaction est stoppée par ajout d'une solution d'acide qui fait virer la couleur bleue au jaune. La quantité d'Ochratoxine A dans chaque essai a été déterminée en se référant à la droite d'étalonnage réalisée à l'aide des

standards du Kit de dosage avec pour équation :  $y = -0,1568x + 2,6202$  ( $R^2 = 0,99$ ) de l'**Annexe 4**.

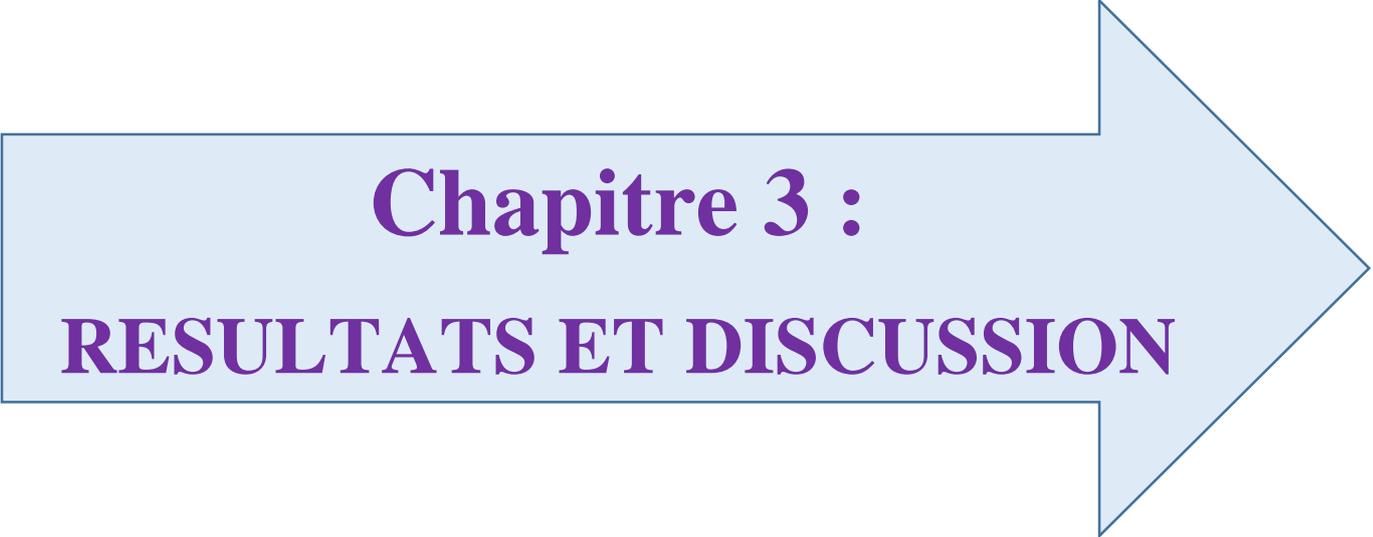
#### **II.2.4. Analyses statistiques**

Les analyses d'inhibition des moisissures *in vitro* par les BL, de la capacité de production d'alcool par les levures, et de la recherche de l'antagonisme BL-moisissures par du surnageant acellulaire ont été réalisées en triplicate. Les résultats ont été exprimés en termes de moyennes et d'écart-type à partir du Tableur Excell office 2013.

Le Logiciel ClustalW1.8 a été utilisé dans le cadre de l'identification moléculaire des BL et de la levure pour couper les chimères dans les séquences d'ADN issus de l'amplification, et réaliser les alignements des nucléotides. L'arbre phylogénétique des BL a été tracé à partir du logiciel MEGA 10.2.4.

Les analyses sur la recherche du facteur qui influence l'inhibition des moisissures ont été faites en triplicate et une analyse des variances entre les moyennes obtenues a été faite ( $p \leq 0,05$ ) à l'aide du Logiciel STATISTICA 12 (ANOVA Post-hoc test- Tukey HSD).

Les essais d'inhibition *in vivo* pendant la fermentation des fèves de cacao on été réalisés chacun à des saisons différentes et les résultats ont été exprimées en terme de moyenne et d'écart type. Les analyses de la moyenne et de l'écart type ont été effectuées sur Excell office 2013.



## **Chapitre 3 :**

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### III.1. Résultats

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail ont été organisés suivant la méthodologie mise en œuvre pour atteindre les objectifs fixés.

#### III.1.1. Isolats d'intérêt de la fermentation des fèves

La phase d'isolement des souches provenant des fèves de cacao a permis d'obtenir des bactéries lactiques et des levures.

##### III.1.1.1. Bactéries lactiques isolées du milieu de fermentation des fèves de cacao

Un ensemble de 28 isolats de bactéries lactiques a été obtenu des prélèvements faits des fèves de cacao en cours de fermentation en milieu rural. Ces isolats ont été initialement sélectionnés sur la base de leur aspect macroscopique et microscopique. Ils se sont révélés être pour certains des bâtonnets, des coccobacilles ou des coques, Gram positif, immobiles, négatifs au test de la catalase conduisant à une conclusion présumée d'appartenance aux bactéries lactiques. Ces isolats ont été codés de façon aléatoire comme suit : Lab1, Lab2, Lab3, Lab4, Lab5, Lab6, Lab8, Lab9, Lab10, Lab11.1, Lab 11.2, Lab 12, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A21, A22, A23, A24, A25, Ped2 et Ped3.

##### III.1.1.2. Activité antifongique des Bactéries Lactiques isolées

L'activité antifongique des 28 isolats de bactéries lactiques et des 3 souches lactiques de référence a été testée vis-à-vis de 10 moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, principaux contaminants des fèves de cacao. Les résultats de cette analyse résumés dans le **Tableau XVIII** et présentés dans la figure 14 pour quelques-unes de ces souches montrent que toutes les souches bactériennes isolées des fèves ont une activité antifongique vis-à-vis des moisissures cibles. Cependant, les pourcentages d'inhibition variaient d'une souche à l'autre ceux-ci allant de 6,82% à 100%. Il ressort de ce tableau que l'isolat Lab11.1 est le plus actif car il a non seulement complètement inhibé la croissance des souches de *Penicillium citrinum* et d'*A. Niger*, mais est également celui qui a inhibé l'ensemble des souches avec des taux d'inhibition supérieurs et allant de 37 à 100% (pour une moyenne de 67,93%). Sept (7) autres isolats lactiques ont présenté des pourcentages d'inhibition moyen supérieurs ou égale à 40%, à savoir : A21 (60,67%), Ped 2 (48,55%), Lab 9 (48,46%), Lab 10 (48,23%), Ped3 (47,38%), Lab 11.2 (42,52%), A19 (41,92%). Pour les souches de références, *sanfranscisencis* a été la plus active avec une valeur de 45,86%, suivi de *L. brevis* avec 43,21% et de *L. plantarum* 42,73 %.

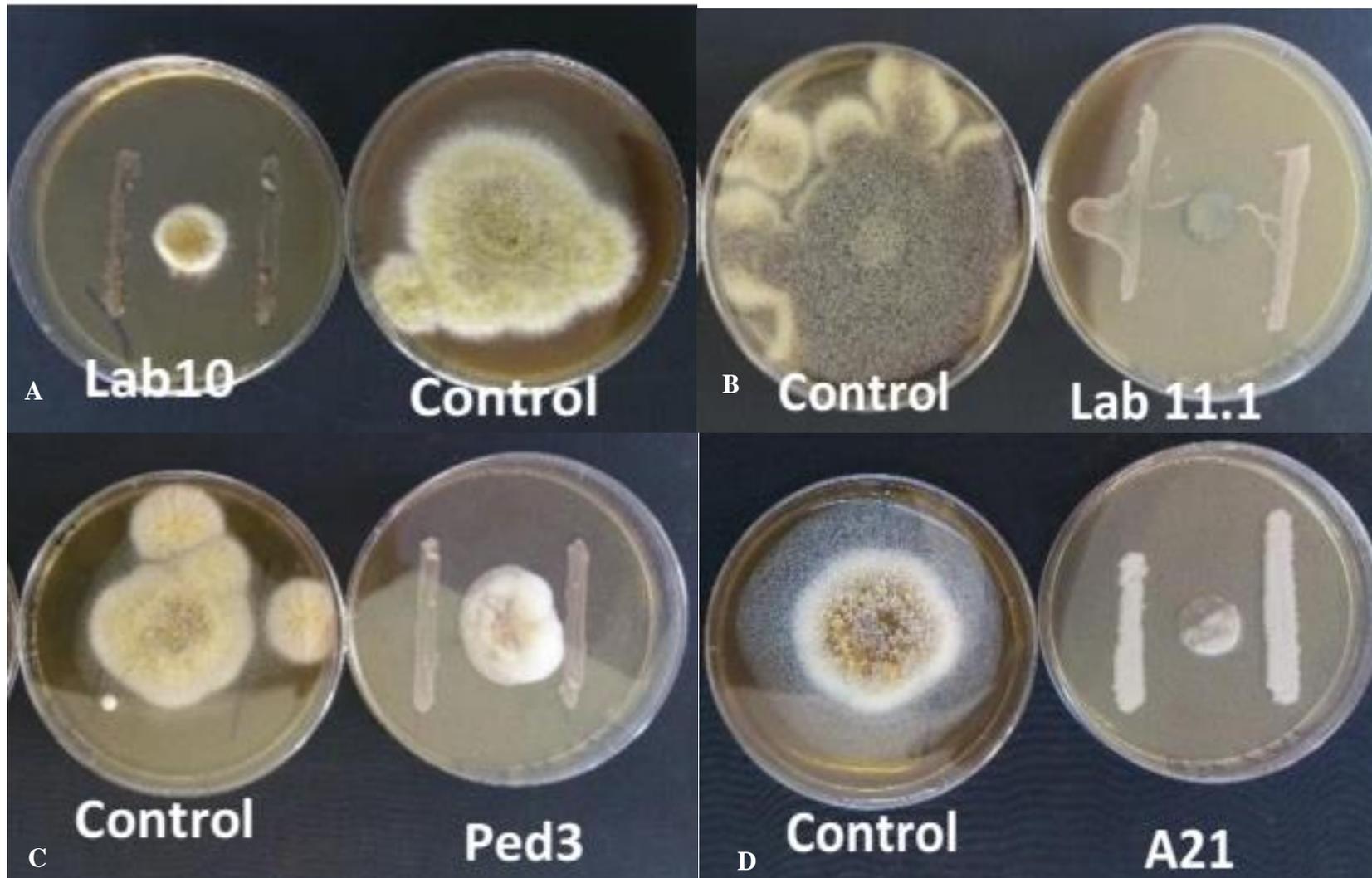
**Tableau XVIII:** Pourcentage d'inhibition des moisissures par les bactéries lactiques.

Souches	AC	AN	AF	M7	M8	M11	M13	M14	M21	M22	Moyennes
<i>L. brevis</i> 207	50,62±0,72	27,27±0,33	26,66±0,20	65,85±0,21	37,50±0,17	47,85±0,23	34,61±0,55	51,06±0,37	22,72±0,31	68,00±0,00	43,21
<i>L. plantarum</i> ATCC 14147	50,62±0,44	22,72±0,51	28,88±1,07	65,85±1,63	57,50±0,35	44,28±0,10	61,53±0,13	40,42±0,30	20,45±0,16	35,00±0,00	42,73
<i>L. sanfranciscensis</i> BB12	56,92±0,11	31,81±0,47	35,55±0,58	43,90±0,14	43,85±0,07	64,28±0,11	44,28±0,16	40,42±0,82	29,54±0,76	68,00±0,17	45,86
Lab 1	14,77±0,04	20,45±0,78	17,77±0,38	65,85±0,21	37,50±0,17	37,23±0,55	15,91±0,08	36,17±0,24	14,80±0,28	28,00±0,08	28,85
Lab 2	54,55±0,64	9,09±0,17	11,11±0,13	45,12±0,33	48,80±0,18	36,17±0,24	6,82±0,45	29,79±0,23	18,20±0,28	25,00±0,00	28,47
Lab 3	37,50±0,71	9,09±0,42	24,44±0,08	39,02±0,04	37,50±0,21	14,89±0,06	20,45±0,24	27,66±0,45	14,80±0,00	25,00±0,00	25,04
Lab 4	20,45±0,78	12,50±0,14	16,66±0,47	40,24±0,37	32,50±0,20	21,27±0,33	31,82±0,45	27,66±1,02	14,80±0,00	25,00±1,56	24,29
Lab 5	14,77±0,33	18,18±0,03	15,55±0,34	65,85±0,14	23,80±0,20	30,85±0,14	31,82±0,06	29,79±0,33	12,50±0,24	25,00±0,44	26,81
Lab 6	18,18±0,25	18,18±1,30	15,55±0,28	41,46±0,62	30,00±0,58	14,89±0,16	20,45±0,16	19,15±0,41	18,20±0,42	23,00±0,06	21,91
Lab 7	14,77±0,35	25,00±1,27	14,44±0,16	43,90±0,14	30,00±0,57	21,27±0,13	18,18±0,10	25,53±0,23	14,80±0,20	20,00±0,00	22,79
Lab 8	14,77±0,76	12,50±0,71	21,11±1,26	20,73±0,18	21,30±0,07	32,98±0,03	43,18±0,10	24,47±0,57	15,90±0,00	18,00±0,14	22,49
<b>Lab 9</b>	<b>60,63±0,18</b>	<b>39,77±0,62</b>	<b>35,55±0,07</b>	<b>57,31±0,27</b>	<b>57,50±0,71</b>	<b>58,57±0,61</b>	<b>44,32±0,42</b>	<b>36,17±0,11</b>	<b>45,80±0,21</b>	<b>49,00±0,30</b>	<b>48,46</b>
<b>Lab 10</b>	<b>61,36±0,06</b>	<b>27,27±0,13</b>	<b>30,00±0,28</b>	<b>65,85±0,18</b>	<b>65,00±0,28</b>	<b>56,38±0,88</b>	<b>71,59±0,13</b>	<b>29,79±0,21</b>	<b>26,10±0,24</b>	<b>49,00±0,07</b>	<b>48,23</b>
<b>Lab 11.1</b>	<b>59,09±0,16</b>	<b>100,00±0,00</b>	<b>37,77±0,71</b>	<b>100,00±0,00</b>	<b>100,00±0,00</b>	<b>78,72±0,11</b>	<b>60,23±0,38</b>	<b>59,57±0,45</b>	<b>40,90±0,14</b>	<b>43,00±0,16</b>	<b>67,93</b>
<b>Lab 11.2</b>	<b>44,32±0,40</b>	<b>31,82±0,45</b>	<b>23,33±0,24</b>	<b>65,85±0,14</b>	<b>57,50±0,18</b>	<b>48,93±0,24</b>	<b>53,41±0,25</b>	<b>40,43±0,04</b>	<b>29,60±0,57</b>	<b>30,00±0,37</b>	<b>42,52</b>
Lab12	20,45±0,21	29,55±0,64	11,11±0,04	51,22±1,10	25,00±0,20	32,98±0,20	44,32±0,44	29,79±0,23	29,60±0,37	25,00±0,44	29,90
A11	29,55±0,64	20,45±0,07	18,88±0,54	50,00±0,07	30,00±0,20	30,85±0,14	20,45±0,16	31,91±0,06	14,80±0,23	28,00±0,18	27,49

Souches	AC	AN	AF	M7	M8	M11	M13	M14	M21	M22	Moyennes
A12	22,73±1,17	14,77±0,04	18,88±0,33	39,02±0,06	28,80±0,23	30,85±0,00	44,32±0,89	21,28±0,81	18,20±0,00	25,00±0,14	26,39
A13	29,55±0,92	18,18±0,03	15,55±0,28	50,00±1,41	12,50±0,07	38,30±0,28	53,41±0,72	29,79±0,30	14,80±1,27	25,00±0,00	28,71
A14	20,45±0,82	14,77±0,11	17,77±0,38	39,02±1,39	17,50±0,17	14,89±0,16	21,59±0,23	17,02±0,03	9,09±1,29	28,00±0,28	20,01
A15	14,77±0,38	14,77±0,35	17,77±0,25	34,15±0,21	32,50±0,00	34,04±0,08	30,68±0,40	14,89±1,26	15,90±0,07	25,00±0,00	23,45
A16	14,77±1,24	12,50±0,14	17,77±0,38	50,00±0,88	23,80±0,00	14,89±0,16	20,45±0,58	24,47±0,66	15,90±0,11	25,00±0,52	21,96
A17	12,50±0,71	18,18±0,74	17,77±0,33	65,85±0,18	30,00±0,14	20,21±0,30	53,41±0,00	21,28±0,00	18,20±0,14	24,00±0,14	28,14
A18	12,50±0,00	27,27±0,04	16,66±0,51	36,59±0,58	30,00±0,17	28,72±0,40	44,32±0,00	29,79±0,10	15,90±0,00	25,00±0,16	26,68
<b>A19</b>	<b>51,25±0,35</b>	<b>25,00±0,00</b>	<b>23,33±0,66</b>	<b>65,85±0,00</b>	<b>54,85±0,41</b>	<b>52,14±0,20</b>	<b>20,19±0,47</b>	<b>32,98±1,39</b>	<b>21,60±0,57</b>	<b>72,00±0,21</b>	<b>41,92</b>
<b>A21</b>	<b>44,32±0,45</b>	<b>36,36±0,00</b>	<b>68,88±0,17</b>	<b>100,00±0,00</b>	<b>100,00±0,00</b>	<b>70,21±0,00</b>	<b>59,09±1,09</b>	<b>30,85±0,18</b>	<b>33,00±0,28</b>	<b>64,00±0,20</b>	<b>60,67</b>
A22	22,73± <b>0,38</b>	18,18±0,17	13,33±0,52	39,02±1,44	27,50±0,64	27,66±0,20	20,45±0,14	30,85±0,41	17,10±0,21	28,00±0,00	24,48
A23	29,55±0,81	27,27±0,75	11,11±0,16	37,80±0,49	28,80±0,28	27,66±0,28	53,41±0,76	36,17±0,25	11,40±0,28	25,00±0,17	28,82
A25	20,45±0,07	12,50±0,20	18,88±0,17	39,02±0,18	35,00±0,14	27,66±0,14	44,32±0,96	32,98±0,03	17,10±0,28	25,00±0,06	27,29
Ped 2	<b>56,82±0,54</b>	<b>36,36±0,21</b>	<b>35,55±0,49</b>	<b>65,85±0,10</b>	<b>57,50±0,20</b>	<b>51,06±0,20</b>	<b>44,32±0,96</b>	<b>40,43±0,35</b>	<b>29,60±0,85</b>	<b>68,00±0,17</b>	<b>48,55</b>
Ped 3	<b>44,32±1,10</b>	<b>31,82±0,45</b>	<b>35,55±0,21</b>	<b>65,85±0,18</b>	<b>37,50±0,49</b>	<b>59,57±0,08</b>	<b>63,64±0,00</b>	<b>51,06±1,33</b>	<b>20,50±0,71</b>	<b>64,00±0,20</b>	<b>47,38</b>

**Legende:** AC-*Aspergillus carbonarius* NRRL 368, AF - *Aspegillus flavus*, AN- *Aspergillus niger* NRRL 612, M7-*Penicillium citrinum* Ma, M8- *Penicillium citrinum* Md , M11- *Aspergillus fumigatus*, M13- *Aspergillus oryzae*, M14- *Aspergillus versicolor*, M21- *Aspergillus tamarii*, M22- *Aspergillus versicolor*.

Les isolats de BL notés en gras sont ceux retenus pour leur fort pourcentage d'inhibition moyen supérieur ou égale à 40% vis-à-vis des moisissures cibles.



**Figure 16.** Inhibition des moisissures par les bactéries lactiques en boîte de Petri (Lab 10, A21, Ped 3 et Lab 11.1): A) *A. oryzae* M13; B) *A. niger* NRRL 612; C) *A. versicolor* M14; D) *A. flavus* AF

### **III.1.1.3. Identité des bactéries lactiques à meilleure activité antifongique**

#### **❖ Caractéristiques biochimiques des isolats à forte activité antifongique**

Les 8 isolats de BL à forte activité antifongique préalablement retenus ont été soumis à plusieurs tests biochimiques dont les résultats sont résumés dans le **Tableau XIX**. L'ensemble des données microscopiques et biochimiques montre que 5 isolats (A19, A21, Lab10, Lab11.1 et Lab 11.2) sont capables de se développer à 45°C (Thermophiles) et que 4 isolats dont 3 thermophiles (A19, A21 et Lab10) et 1 mésophile (Ped2) ont un métabolisme hétérofermentaire se traduisant par la production du CO<sub>2</sub> à partir du glucose. Aucun d'entre eux ne produit de sulfure d'hydrogène.

L'utilisation des hydrates de carbone testés, variable entre les isolats montre toutefois que les isolats Ped2, Lab10 et A19 (en forme de coques) ont le même profil d'utilisation des hydrates de carbone. Il en est de même des isolats Ped3 et Lab11.2 dont ce profil est également comparable à l'exception de la dégradation du raffinose.

**Tableau XIX:** Caractéristiques microscopiques et biochimiques des BL sélectionnées.

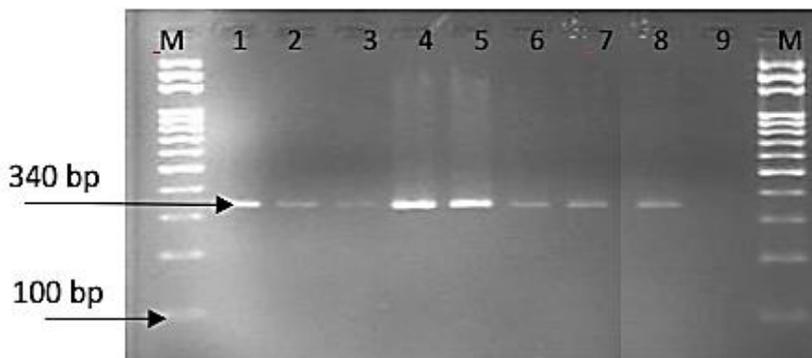
Caractéristiques	Ped 2	Ped 3	Lab 9	Lab 10	LAB 11.1	Lab 11.2	A19	A21
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Forme	Cocci	Cocci	Coccobacille	Cocci	Batonnet	Cocci	Cocci	Batonnet
Regroupement	Amas	Ind.	Tétrade	Ind.	Ind	Diplocoque	Amas	Ind.
Croissance à 45°C	-	-	-	+	+	+	+	+
Production H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
Production CO <sub>2</sub> dans le glucose	+	-	-	+	-	-	+	+
Fermentation								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	-	+	-	-	-	+	-	-
D(-)Arabinose	+	+	-	+	-	+	+	+
Galactose	-	+	+	-	+	+	-	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	-	+	-	-	+	-
Trehalose	-	+	+	-	+	+	-	-
D(+) Raffinose	-	+	-	-	+	-	-	+
Amidon	+	+	-	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	-	+	+	-	-	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	-
Melibiose	-	+	+	-	-	+	-	-
Ribose	-	+	+	-	-	+	-	-
Xylose	+	-	+	+	-	-	+	+
Esculine	+	+	-	+	+	+	+	+
Identité probable des isolats	<i>W. cibaria</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>W.cibaria</i>	<i>L. farciminis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>W. cibaria</i>	<i>L. brevis</i>

+ Réaction positive, - Réaction négative, Ind : individualisé

L'ensemble de ces résultats laisse penser que les 8 isolats ci-dessus sont effectivement des BL et qu'elles appartiendraient à cinq espèces différentes. Cette identification basée sur le métabolisme a été comparée à ceux de quelques auteurs. Ainsi les caractéristiques obtenues sont conformes à celles rapportées par **Fusco et al. (2015)** pour *Weissella cibaria*, par **Tsuda et al. (2012)** pour *Lactobacillus farciminis*, par **Baradaran et al. (2012)** pour *Pediococcus pentosaceus*, par **Manero et Blanch (1999)** pour *Enterococcus faecium* et par **Gandevia et al. (2017)** pour *Lactobacillus brevis*. La confirmation de cette identification a été recherchée par voie moléculaire.

### ❖ Données moléculaires des BL à forte activité antifongique

Les données biochimiques des 8 BL à meilleure activité antifongique n'ayant pas permis de déterminer le nom des espèces de différents isolats, leurs acides nucléiques ont été extraits, purifiés, clonés, séquencés puis génotypés pour les identifier. A l'issue de l'amplification de la zone ciblée à l'aide du couple d'amorces LacF/LacR, suivi de la migration des amplicons sur gel d'électrophorèse, la visualisation sous lumière UV a révélé une bande unique pour tous les isolats, cette dernière correspondant de 340 paires de bases attendues (**Figure 17**).



**Figure 17.** Fragments amplifiés des bactéries lactiques par les amorces LacF and LacR (340 bp) (M-Marqueur de taille de 100 bp, 1-Ped 2, 2-Ped 3, 3-Lab 9, 4-Lab 10, 5-Lab 11.1, 6-Lab11.2, 7-A19, 8-A21, 9- control négatif).

Le séquençage des différents fragments a permis d'obtenir huit séquences présentées comme suit.

#### > *Weissella cibaria* (Ped2)

```
AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGG
GTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGAC
GGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAG
CGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCC
TCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAAC
TCCATGTGTAGCGGTGAAAT
```

#### > *Enterococcus faecium* (Ped3)

```
AGTTTCCATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTG CGCT
CGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGC TGCTGGCACGTA
GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATAACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTC TC
TAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGCGTGTGCTCGGTCAGACTTTTCG
T CCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGAGGAGGC
```

#### > *Weissella cibaria* (A19)

```
AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGG
GTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGAC
GGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCA AG
CGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCT
CAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAAC TC
ATGTGTAGCGGTGAAAT
```

>*Lactobacillus brevis* (A21)

AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGG  
GTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGAC  
GGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAG  
CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTT  
CGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACT  
CCATGTGTAGCGGTGGAAT

>*Pediococcus pentosaceus* (Lab9)

AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG  
GGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTG  
ACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAACAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC  
AAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCASGCGGTCTTTTAAGTCTAATGGGAAAG  
CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTG  
GAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT

>*Weissella cibaria* (Lab10)

AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGAGAAGG  
GTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGATAACTGTTCAATGTGTGAC  
GGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAG  
CGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGGCC  
TCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACT  
TCCATGTGTAGCGGTGGAAT

>*Lactobacillus farciminis* (Lab11.1)

AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAA  
GGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTGAAGAAGAACAAGCGTGAGAGTAACTGTTTACGTACT  
GACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGAGGCGGTTTATTAAGTTTGAAGTGAAG  
GCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCATTTCGAAACTGGTAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG  
GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAAT

>*Enterococcus faecium* (Lab11.2)

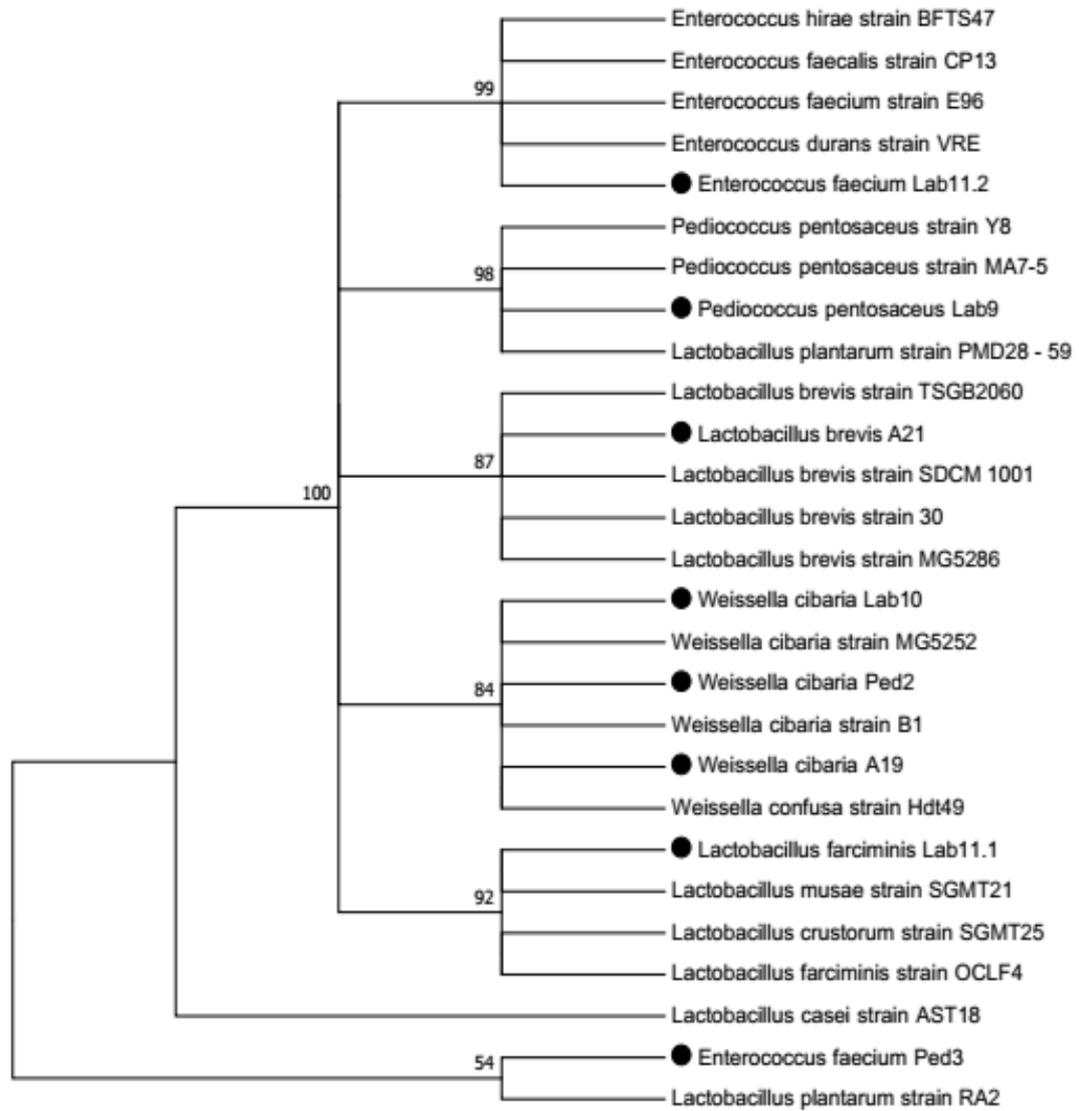
AGCAGTAGGGAATCTTCCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT  
TTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTACCTTGACGG  
TATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG  
GC TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGA

L'analyse BLASTn de ces dernières sur la base de données de NCBI a permis d'identifier cinq espèces bactériennes que sont *Weissella cibaria*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus farminis* et *Lactobacillus brevis*. Les isolats Ped2, Lab10, A19 ayant présenté 99 à 100% de similitudes nucléotidiques avec les souches de *Weissella cibaria*. Les isolats Ped3 et Lab11.2 quant à eux ont présenté 99 à 100% de similitudes avec les souches d'*Enterococcus faecium*. Enfin les souches Lab9, Lab11.1 et A21 ont présentées 99 à 100% de similitudes avec les souches *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus farciminis* et *Lactobacillus brevis* respectivement (**Tableau XX**). Nos séquences ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès allant de MN173224 à MN173231.

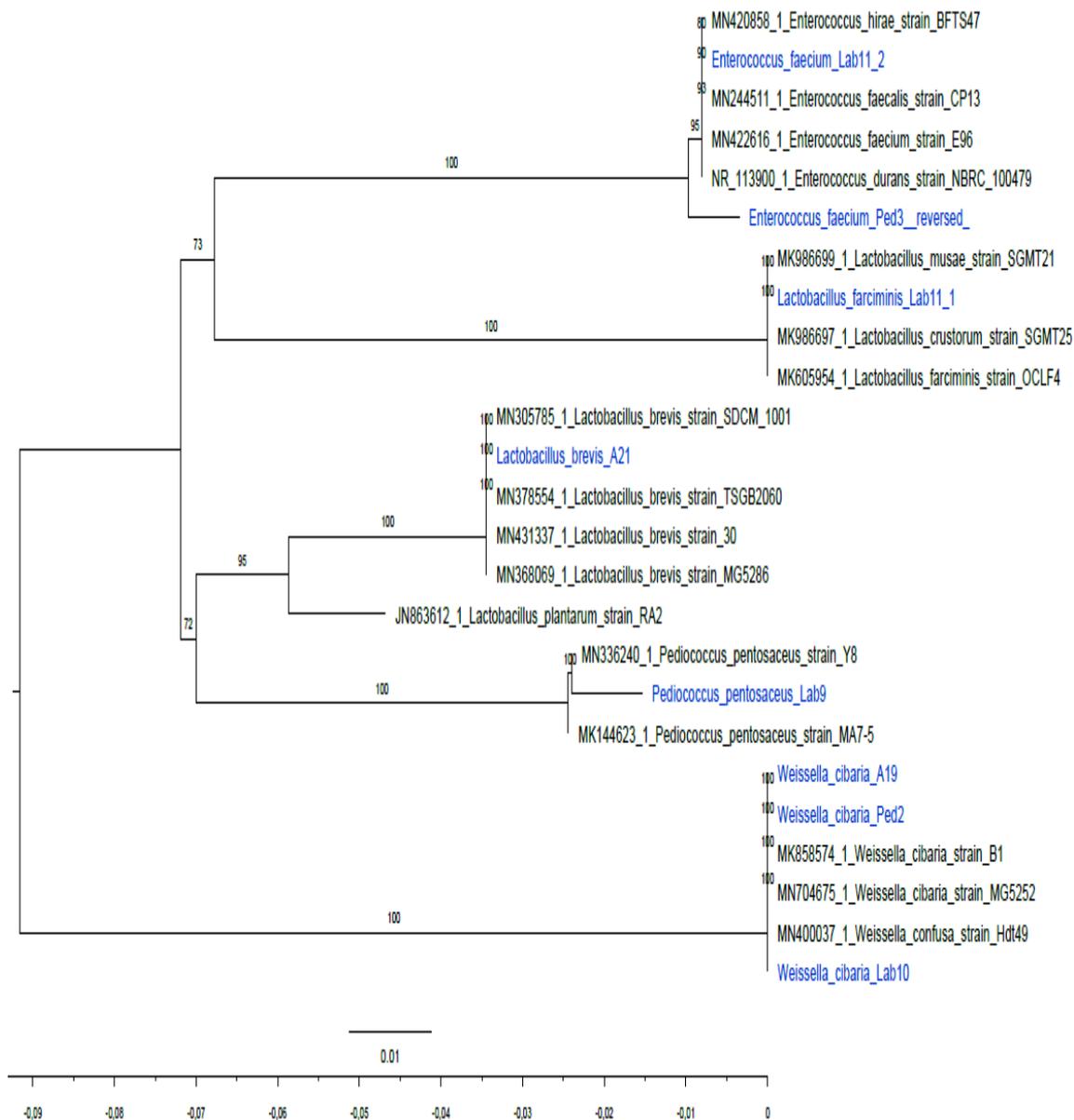
**Tableau XX:** Identité moléculaire des bactéries lactiques sélectionnées.

Isolats	Identité des Isolats	des	Numéro d'accès NCBI	Pourcentage d'identité	Souches de comparaison	de	Numero d'accès de la souche de comparaison
<b>Ped2</b>	<i>Weissella cibaria</i>		MN173224	100%	<i>Weissella cibaria</i> DISSPA64		KJ187152.1
<b>Ped3</b>	<i>Enterococcus faecium</i>		MN173225	99%	<i>Enterococcus faecium</i> MZF2		MH569604.1
<b>Lab9</b>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		MN173228	99%	<i>Pediococcus pentosaceus</i> RG4B		MH555085.1
<b>Lab10</b>	<i>Weissella cibaria</i>		MN173229	100%	<i>Weissella cibaria</i> DISSPA64		KJ187152.1
<b>Lab11.1</b>	<i>Lactobacillus farciminis</i>		MN173230	99%	<i>Lactobacillus farciminis</i> HBUAS52186		MH473439.1
<b>Lab11.2</b>	<i>Enterococcus faecium</i>		MN173231	100%	<i>Enterococcus faecium</i> HOU503		CP040706.1
<b>A19</b>	<i>Weissella cibaria</i>		MN173226	99%	<i>Weissella cibaria</i> zy-F2		MH588445.1
<b>A21</b>	<i>Lactobacillus brevis</i>		MN173227	100%	<i>Lactobacillus brevis</i> G160		MK971786.1

L'analyse phylogénétique de nos isolats basée sur l'alignement nucléotidique des séquences obtenues et la construction de l'arbre phylogénétique montre qu'ils se regroupent au sein de leurs genres et espèces respectifs confirmant leur proximité avec les souches précédemment identifiées, ainsi que la conservation du gène cible au sein des différents genres de bactéries lactiques (**Figure 18 et 19**). Il faut noter que l'arbre de la **Figure 19** corrige l'erreur faite dans la **Figure 18** où l'isolat *Enterococcus faecium* (Ped3) considéré pour générer ce dernier était une séquence reverse et la séquence de *Lactobacillus plantarum* strain RA2 était une séquence partielle, ceci ayant eu pour conséquence l'éloignement de leur groupe clustal.



**Figure 18.** Arbre phylogénétique des séquences du gène cible de l'ARNr 16S des bactéries lactiques. Les séquences des isolats obtenus dans ce travail sont représentées avec un rond noir (en début de position).



**Figure 19.** Arbre phylogénétique des séquences du gène cible de l'ARNr 16S des bactéries lactiques. Les séquences des isolats obtenus dans ce travail sont représentées en bleu et les autres séquences ont été téléchargées dans GenBank, NCBI. L'arbre a été construit à l'aide de *Seaview* version 5.0.4. Le nombre de répétitions (*bootstrap*) a été fixé à 1000, et seules les valeurs supérieures à 70% sont indiquées sur les branches. L'arbre a été enraciné à partir du point moyen (*Midpoint rooted*).

#### III.1.1.4. Levures à fort potentiel de production d'alcool

Les levures étant les premiers responsables de la fermentation alcoolique des fèves de cacao, leur capacité à produire l'éthanol a été évaluée afin de sélectionner celles ayant les meilleures aptitudes pour une fermentation contrôlée.

### ❖ Aptitude fermentaire des levures isolées

Un total de vingt-neuf isolats codés de E1 à E29 a été obtenu de la fermentation des fèves. Ces isolats ont été testés pour leur vitesse de production de l'éthanol à partir des sucres du mucilage au travers de la perte de masse qui est proportionnelle au dégagement gazeux (CO<sub>2</sub>) que chacun est capable d'entraîner (Annexe 5). Les vitesses de production d'éthanol obtenues à partir du tableau de la perte de masse au cours du temps sont relevées dans le **Tableau XXI** ci-après.

**Tableau XXI:** Récapitulatif de la capacité de production d'alcool par les isolats de levures.

<b>Isolats</b>	<b>m<sub>eth</sub>(g)</b>	<b>v<sub>eth</sub>(g/h)</b>
E1	0,88±0,01	0,022
E2	1,00±0,01	0,025
E3	0,94±0,01	0,023
E4	0,95±0,01	0,024
E5	0,73±0,00	0,018
E6	0,78±0,00	0,020
E7	1,00±0,01	0,025
E8	1,02±0,00	0,026
E9	1,01±0,01	0,025
E10	0,84±0,01	0,021
E11	0,74±0,01	0,018
E12	0,95±0,01	0,024
E13	0,75±0,01	0,019
E14	0,74±0,01	0,018
E15	0,75±0,01	0,019
E16	0,95±0,01	0,024
E17	0,74±0,01	0,019
E18	1,01±0,01	0,026
E19	0,95±0,01	0,024
E20	1,11±0,09	0,028
<b>E21</b>	<b>1,57±0,01</b>	<b>0,039</b>
E22	1,05±0,00	0,026
E23	1,10±0,07	0,027
<b>E24</b>	<b>1,78±0,01</b>	<b>0,045</b>
E25	1,04±0,01	0,026
E26	0,88±0,06	0,022
E27	0,84±0,01	0,021
E28	0,79±0,01	0,020
E29	0,77±0,03	0,019

**m<sub>eth</sub>** : Masse d'éthanol produite ; **v<sub>eth</sub>** : Vitesse de production d'éthanol en 40heures.

Il ressort de ces données que: les isolats E21 et E24 sont ceux qui ont produit les quantités de CO<sub>2</sub> les plus importantes après 40h de fermentation correspondantes. Ces valeurs correspondent aux masses d'éthanol respectives de 1,57g et 1,78g associées aux vitesses les plus élevées de 0,039g/h et 0,045g/h.

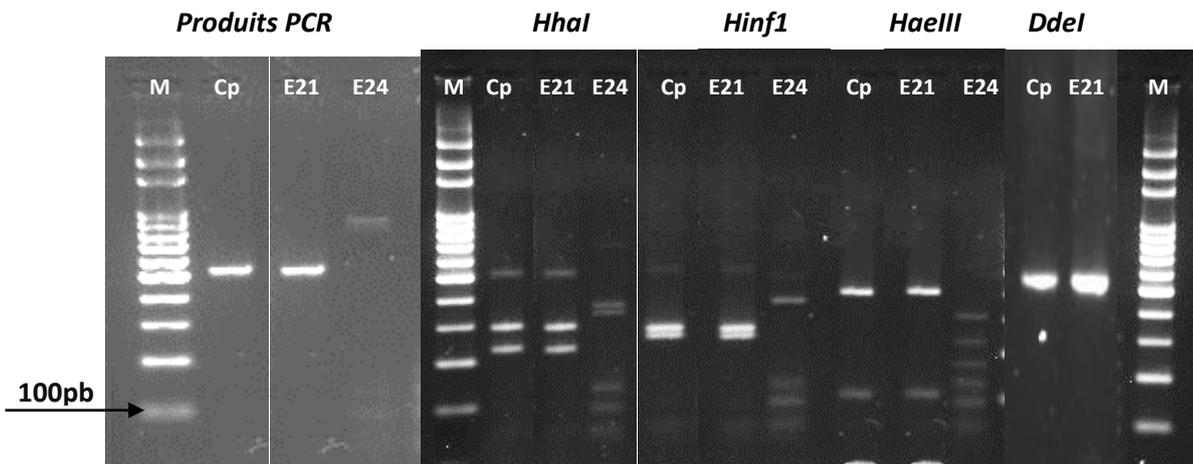
### III.1.1.5. Identité des levures à meilleure production d'alcool

La migration des fragments d'ADN des deux isolats à meilleure production d'alcool a présenté des tailles d'amplicons correspondant respectivement à 550 bp pour l'isolat E21 et 950 bp pour l'isolat E24. Ces amplicons et les fragments de digestions par les enzymes de restriction sont regroupés dans le **Tableau XXII** et la **Figure 20**.

**Tableau XXII:** Profil de différenciation des isolats de levures en fonction des tailles des produits de digestion enzymatique.

Codes des levures	Taille des produits de PCR	<i>HhaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>DdeI</i>
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 20019	550pb	230 , 300	290, 260	120, 430	550
<b>E21</b>	550pb	230 , 300	290, 260	120, 430	550
<b>E24</b>	950bp	350,380,120, 100	400,150, 100, 80	320, 220, 170 , 130, 100	-

- : non déterminé



**Figure 20.** Produits PCR des levures Cp, E21 et E24 amplifiés avec les amorces ITS1 et ITS4 et Produits de digestion enzymatique des levures codées Cp, E21 et E24 par les enzymes de restriction *HhaI* , *HinfI*, *HaeIII* et *DdeI*, M- Marqueur de taille.

La levure E21 a donc présenté le même profil pratique que celui de la souche de référence *Candida parapsilosis*. Ce qui supposerait qu'elle appartienne au même genre. De ce fait, étant potentiellement pathogène pour l'homme, cette dernière n'a pas été retenue pour la

caractérisation moléculaire car ne pouvant pas être d'un intérêt pratique dans l'optique de la production d'un starter.

Le fragment d'ADN amplifié de l'isolat E24 a été soumis au séquençage et traité comme dans le cas des BL. Il a ainsi été identifié comme *Saccharomyces cerevisiae* avec un pourcentage d'identité de 99,33%. Sa séquence brute est la suivante :

> ***Saccharomyces cerevisiae* (E24)**

```
TCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAC
CTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAAACA
TCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATACTCACTACCAAACAGAATGT
TTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGCGCAATGKGC GTT
CAAAGATTGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCAT
CGATGCGAGAACCAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTAAAATTTCCAGTTACGAAAAT
TCTTGTTTTTGACAAAAATTTAATGAATAGATAAAAATTGTTTGKGTGTTGTTACCTCTGGGCCCCGA
TTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAAAACCTCCACAGKKGKGTGTTGATTGAA AC
GGTTTTAATTGTCCTATAACAAAAGCACAGAAATCTCTCACCGTTTGGAAATAGCAAGAAAGAAAC
TTACAAGCTAGCAAGACCGCGCACTTA.GCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTG
CCCAGTAAAAGCTCTCATGCTCTTGCCAAAACAAAAAATCCATTTTCAAATTTATTAATTTTC
TTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAG
```

### **III.1.2. Familles de composés impliqués dans l'inhibition de la croissance des moisissures et paramètres du milieu influençant l'activité inhibitrice**

#### **III.1.2.1. Familles de composés antifongiques des moisissures**

L'activité antimicrobienne des BL étant attribuée aux différentes molécules excrétées dans le milieu extracellulaire par ces dernières, celles-ci ont été recherchées dans les surnageants de culture de deux isolats (*Lactobacillus farciminis* (Lab11.1) et *Weissella cibaria* (A19)) ayant présentés les taux d'inhibition élevés sur deux moisissures à savoir *A. carbonarius* et *P. citrinum*. La recherche de ces différentes familles de molécules a été réalisée d'une part par le dosage de certaines d'entre elles et d'autre part après inhibition de l'activité de ces molécules avant les essais du surnageant sur les cultures fongiques.

Trois types de molécules ont été recherchés à savoir : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les molécules protéiques.

#### **❖ Effet des acides organiques produits par les BL à meilleure activité antifongique**

Le **Tableau XXIII** présente les concentrations de quelques acides organiques présents dans les surnageants de culture des BL.

**Tableau XXIII:** Teneurs en acides organiques des surnageants des BL à meilleure activité antifongique.

Acides organiques (g/l)	<i>L. farciminis</i> (Lab 11.1)	<i>W. cibaria</i> (A19)
Acide lactique	19,47±0,02	13,43±0,01
Acide gluconique	0,00±0,00	1,05±0,01
Acide acétique	0,00±0,00	0,00±0,00
Acide citrique	0,00±0,00	0,00±0,00
Acide phenyllactique	0,00±0,00	0,00±0,00
Acide butanoïque	0,08±0,12	0,00±0,00
Acide octanoïque	1,00±0,65	0,00±0,00
Acide décanoïque	0,05±0,07	0,00±0,00
Acide carbonique	0,25±0,35	0,00±0,00
Acide pentanoïque	0,03±0,05	0,00±0,00

Il en ressort que le lactate est le principal acide organique synthétisé par les souches de bactéries lactiques avec des concentrations de 19,47 g/l et 13,43 g/l respectivement pour *L. farciminis* (Lab11.1) et *W. cibaria* (A19). Aucune de ces souches n'a produit de l'acide acétique, l'acide phenyllactique et de l'acide citrique, tous étant des acides reconnus pour leur forte activité antifongique et souvent produits par les BL.

Quant aux autres acides organiques à courtes chaînes, leur teneur n'excède pas 1g/l dans le surnageant. Il s'agit à cet effet de l'acide gluconique synthétisé par *W. cibaria* A19 et des acides butanoïque, octanoïque, décanoïque, carbonique et pentanoïque produit par *L. farciminis* Lab11.1.

#### ➤ **Effet de l'acide lactique sur la croissance des moisissures**

La forte teneur en lactate dans le surnageant a conduit à l'évaluation de la contribution de cet acide dans l'inhibition des 2 moisissures cibles, ceci à travers 2 tests : la détermination de la CMI du lactate et la détermination du degré d'inhibition du surnageant dont l'activité a été neutralisée par la soude. Les résultats de ces essais présentés dans le **Tableau XXIV** montrent à partir de la concentration en lactate produit par les isolats, qu'il n'est pas la seule molécule responsable de l'activité inhibitrice observée.

**Tableau XXIV:** Impact du lactate sur l'inhibition des moisissures.

	<i>P. citrinum</i> M8	<i>A. carbonarius</i> NRRL368
CMI Acide lactique (g/l)	18	39
Surnageants bruts	<i>L. farciminis</i> (Lab 11.1)	++
non neutralisés	<i>W. cibaria</i> (A19)	++
Neutralisation du	<i>L. farciminis</i> (Lab 11.1)	++
Ph	<i>Weissella cibaria</i> (A19)	++

+ Diamètre d'inhibition inférieur 20mm ; ++ Diamètre d'inhibition compris entre 20 et 30mm ; +++ Diamètre supérieur à 30mm.

En effet, avec des CMI d'acide lactique respectives de 18 et 39g/l pour *P. citrinum* et *A. carbonarius*, les concentrations en acide synthétisé par *W. cibaria* (13,43g/l) ont peu d'effet inhibiteur sur les moisissures ; ce qui se traduit par la conservation de l'inhibition des moisissures par les surnageants neutralisés de *W. cibaria* (A19). Quant à l'isolat *L. farciminis* (Lab11.1) dont la teneur en lactate du surnageant est de 19,47g/l, cette valeur est proche de la CMI de *P.citrinum* mais bien en dessous de celle d'*A. carbonarius*. Ce qui justifie la présence des auréoles d'inhibition observée après neutralisation du surnageant de cette souche.

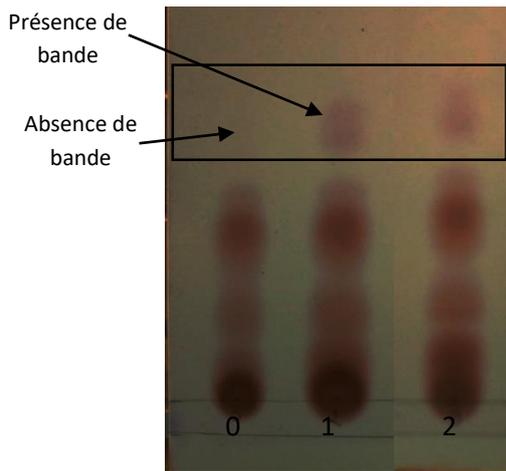
#### ❖ Effet des protéines produites par les BL sur la croissance des moisissures

Les données d'analyse des protéines totales des surnageants des cultures des isolats bactériens résumées dans le **Tableau XXV** montrent que ces teneurs diffèrent peu. Cette analyse ne pouvant différencier la qualité des protéines à laquelle est associée l'activité antimicrobienne, une chromatographie sur couche mince (CCM) ainsi qu'un fractionnement sur gel de sephadex de ces surnageants ont été réalisés.

**Tableau XXV:** Teneur en protéines totales et révélation de la CCM des surnageants bruts de BL.

	<i>L. farciminis</i> (Lab11.1)	<i>W. cibaria</i> (A19)
Masse en protéines des surnageants (g/l)	0,36 ±0,01	0,30±0,01
Nombre de nouvelles bandes	1	2
Distance des bandes par rapport au front (mm)	44	44 46
Rapport frontal (Rf=Db/Ds)	0,488	0,488 0,511

Il ressort de la CCM, la présence de nouvelles bandes caractéristiques de nouveaux peptides dans les surnageants des isolats lactiques dont 1 pour le surnageant de *L. farciminis* (Lab11.1) et 2 pour le surnageants de *W. cibaria* (A19) (**Figure 21**).



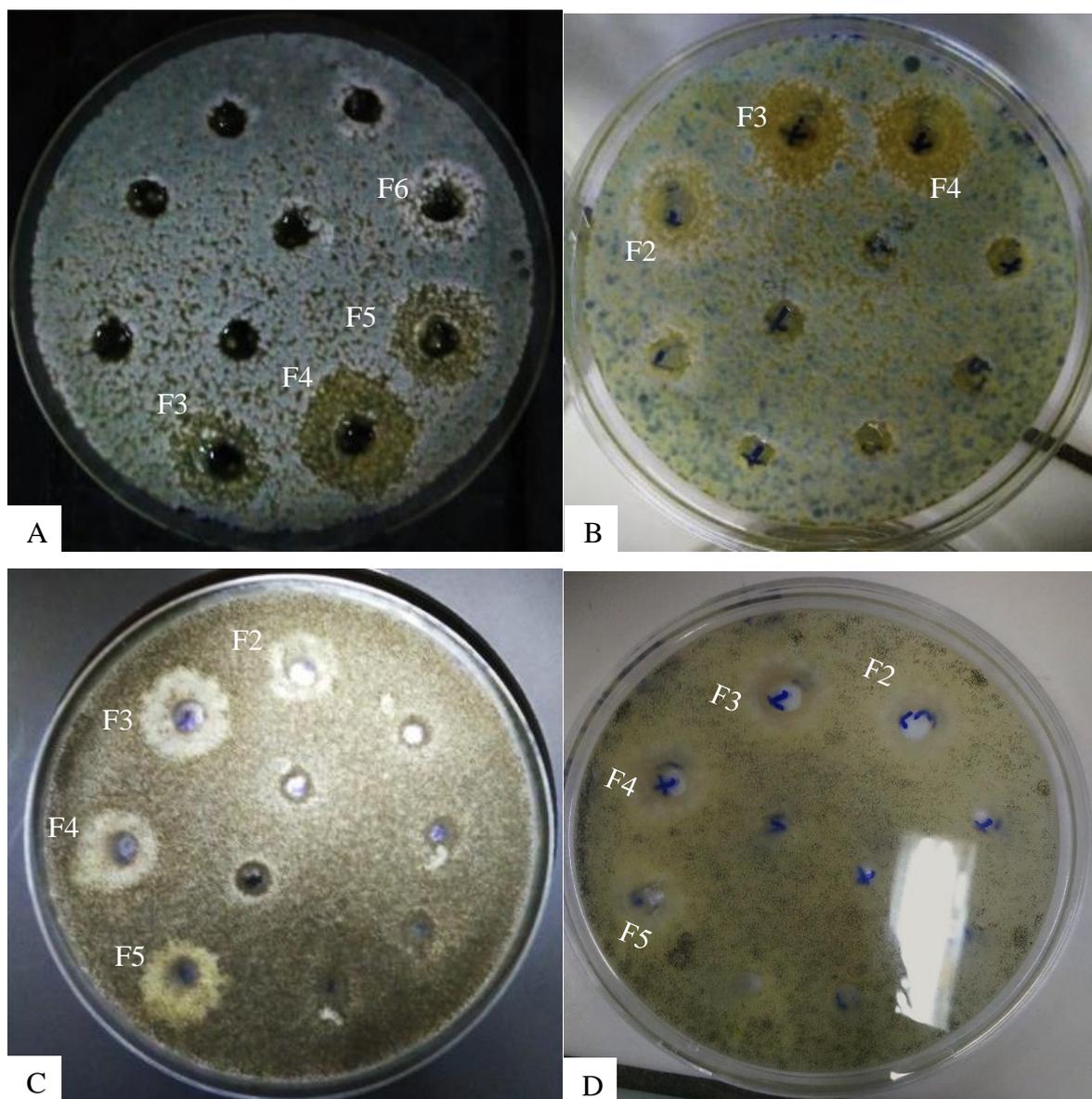
**Figure 21.** Migration des peptides produits par les bactéries lactiques sur CCM après révélation à la Ninhydrine (0-contrôle négatif constitué du milieu de culture MRS, 1- *Weissella cibaria* (A19), 2- *Lactobacillus farciminis* (Lab11.1)).

Quant aux données de la chromatographie sur colonne sur gel de séphadex, il apparaît du **Tableau XXVI** et de la **Figure 22** que les fractions dont les teneurs en protéines totales sont les plus élevées ont une activité plus importante vis-à-vis des moisissures.

**Tableau XXVI:** Teneurs en protéines totales et activité des fractions des surnageants lyophilisés des BL.

Souche	Fractions	Masse (g/l)±SD	Intensité de l'activité antifongique	
			<i>A. Carbonarius</i> NRRL368	<i>P. citrinum</i> M8
<i>Lactobacillus farciminis</i> Lab11.1	F3	0,17±0,02 <sup>b</sup>	+	++
	F4	0,19±0,01 <sup>b</sup>	++	++
	F5	0,17±0,01 <sup>b</sup>	++	++
<i>Weissella cibaria</i> A19	F6	0,13±0,01 <sup>a</sup>	+	+
	F2	0,13±0,01 <sup>a</sup>	+	+
	F3	0,16±0,01 <sup>b</sup>	+	++
	F4	0,16±0,01 <sup>b</sup>	+	++
	F5	0,13±0,00 <sup>a</sup>	+	+

F2 à F6 : Fraction 2 (Fraction obtenue à la 4<sup>ème</sup> minute) à Fraction 6 (Fraction obtenue la 7<sup>ème</sup> minute), + Diamètre d'inhibition inférieur 20mm ; ++ Diamètre d'inhibition compris entre 20 et 30mm. Dans la même colonne, les valeurs suivies de la même lettre sont statistiquement similaire (P≤0,05).



**Figure 22.** Activité antifongiques des fractions obtenues à partir des surnageants des BL sur *P. citrinum* M8 et *A. carbonarius* NRRL368. (A) Inhibition de *P. citrinum* M8 par les fractions de *L. farciminis* Lab11.1, (B) Inhibition de *P. citrinum* M8 par les fractions de *W. cibaria* A19, (C) Inhibition de *A. carbonarius* NRRL 368 par les fractions de *L. farciminis* Lab11.1, (D) Inhibition de *A. carbonarius* NRRL 368 par les fractions de *W. cibaria* A19.

La contribution de ces molécules dans l'inhibition par le surnageant a été mise en évidence par un traitement thermique d'une part et un traitement enzymatique d'autre part. Les résultats obtenus montrent une réduction des diamètres d'inhibition voir la suppression de cette inhibition après ces deux traitements (**Tableau XXVII**), confirmant en partie la nature protéique des molécules antifongiques produites par nos BL.

**Tableau XXVII:** Activité antifongique des surnageants des BL après traitement thermique et enzymatiques.

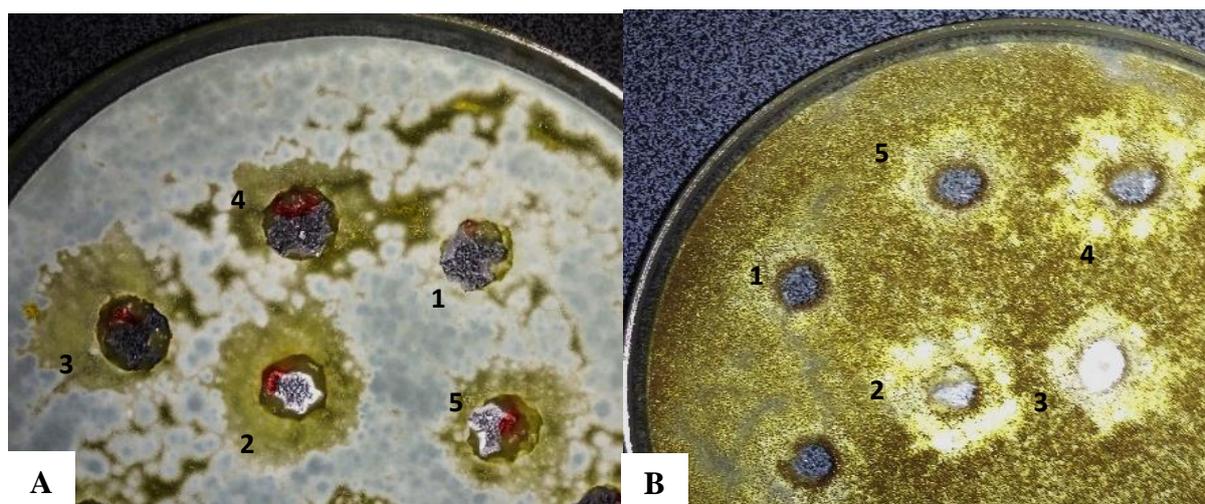
BL	<i>L. farciminis</i> (Lab11.1)	<i>W. cibaria</i> (A19)	<i>L. farciminis</i> (Lab11.1)	<i>W. cibaria</i> (A19)
Moisissures cibles	<i>Aspergillus carbonarius</i>		<i>Penicillium citrinum</i> M8	
Control negative (MRS)	-	-	-	-
Control positif (Surnageant de BL non traité)	++	++	+++	++
Surnageant traité à la protéinase K	+	+	++	+
Surnageant traité (121°C/15min)	+	-	++	+
Surnageant traité à la catalase	++	++	+++	++

- : Absence d'activité antifongique ; + Diamètre d'inhibition inférieur 20mm ; ++ Diamètre d'inhibition compris entre 20 et 30mm ; +++ Diamètre supérieur à 30mm.

En effet, l'activité des surnageants soumis au traitement thermique, et à l'action de la protéinase K, présentée dans le Tableau précédent montre que tous les surnageants ont perdu une partie de leur activité. Seuls les surnageants de *L. farciminis* (Lab 11.1) conservent une activité antifongique partielle après un traitement thermique à 121°C pendant 15 minutes vis-à-vis des deux cibles tandis que le surnageant de *W. cibaria* (A19) perd complètement son activité sur *A. carbonarius* après traitement thermique à 121°C pendant 15 minutes.

#### ❖ Effet du peroxyde d'hydrogène sur l'inhibition des moisissures

La comparaison de l'activité antifongique des surnageants traités à la catalase aux surnageants bruts non traités (**Tableau XXVII**) montre que les surnageants des deux souches ont conservé leur activité antifongique vis-à-vis des deux cibles excluant ainsi la responsabilité du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition des moisissures testées.



**Figure 23.** Activité antifongique des surnageants de *L. farciminis* (Lab11.1) et *W. cibaria* (A19) exprimée par des auréoles d'inhibition au niveau des puits: Présence d'auréoles d'inhibition vis-à-vis de *Penicillium citrinum* M8 après traitements thermiques du surnageant (A), Présence des auréoles d'inhibition vis-à-vis de *A. carbonarius* après traitements

thermiques du surnageant (B) (1-contrôle négatif MRS, 2-contrôle positif surnageant de *W. cibaria* A19 non traité, 3-surnageant traité à la catalase, 4-surnageant traité à la protéinase K, 5-surnageant soumis au traitement thermique).

### III.1.2.2. Effet des paramètres de culture des BL sur l'inhibition de *A. carbonarius*

Les conditions de cultures des microorganismes modulent leur croissance et leur activité. L'effet du pH, de la teneur en sucre et de la température du milieu de fermentation des fèves a été testé *in vitro* sur la croissance des BL, et leur pouvoir inhibiteur sur *A. carbonarius*. Les deux bactéries lactiques qui ont été retenues pour cette partie sont *Lactobacillus farciminis* (Lab11.1) choisie pour ses meilleures activités, et *Weissella cibaria* (A19) un des genres les plus représentés, choisie pour avoir présenté la plus faible activité parmi les 8 isolats de BL actifs.

#### ❖ Charge des BL obtenues dans les conditions testées

Les charges des BL obtenues dans les conditions expérimentales sont consignées dans le **Tableau XXVIII**. De façon générale, elles oscillaient entre 5,76 et 11,77 Log UFC/mL et 5,82 et 11,69 Log UFC/mL respectivement pour *L. farciminis* (Lab11.1) et *W. cibaria* (A19). Ces valeurs étaient en dessous de celles obtenues dans les conditions de culture témoin (MRS) qui étaient de l'ordre de 12 Log UFC/ ml.

**Tableau XXVIII:** Concentrations cellulaires des BL (Log UFC/ ml) obtenues dans les conditions expérimentales.

Conditions	pH	Concentration en sucre (%)	Température (°C)	Charge (Log UFC/ml)	
				<i>L. farciminis</i> (Lab 11.1)	<i>W. cibaria</i> (A19)
1	3,5	10	25	10,51±0,05 <sup>e</sup>	6,80±0,40 <sup>g</sup>
2	3,5	15	45	5,76±0,02 <sup>h</sup>	6,63±0,04 <sup>h</sup>
3	3,5	20	35	9,87±0,04 <sup>f</sup>	5,82±0,01 <sup>i</sup>
4	4,5	10	45	5,79±0,01 <sup>h</sup>	7,93±0,04 <sup>f</sup>
5	4,5	15	35	10,44±1,26 <sup>b</sup>	10,22±0,06 <sup>d</sup>
6	4,5	20	25	10,80±0,00 <sup>d</sup>	10,25±0,01 <sup>d</sup>
7	5,5	10	35	10,92±0,04 <sup>c</sup>	11,69±0,01 <sup>b</sup>
8	5,5	15	25	10,99±0,01 <sup>c</sup>	11,19±0,02 <sup>c</sup>
9	5,5	20	45	7,36±0,51 <sup>g</sup>	8,35±0,07 <sup>e</sup>
10	4,5	15	35	11,77±0,01 <sup>b</sup>	10,14±0,06 <sup>d</sup>
MRS	6,5	2	37	12,13±0,02 <sup>a</sup>	12,22±0,02 <sup>a</sup>

\*Dans la même colonne, les valeurs suivies de la même lettre sont statistiquement similaires ( $P \leq 0,05$ ).

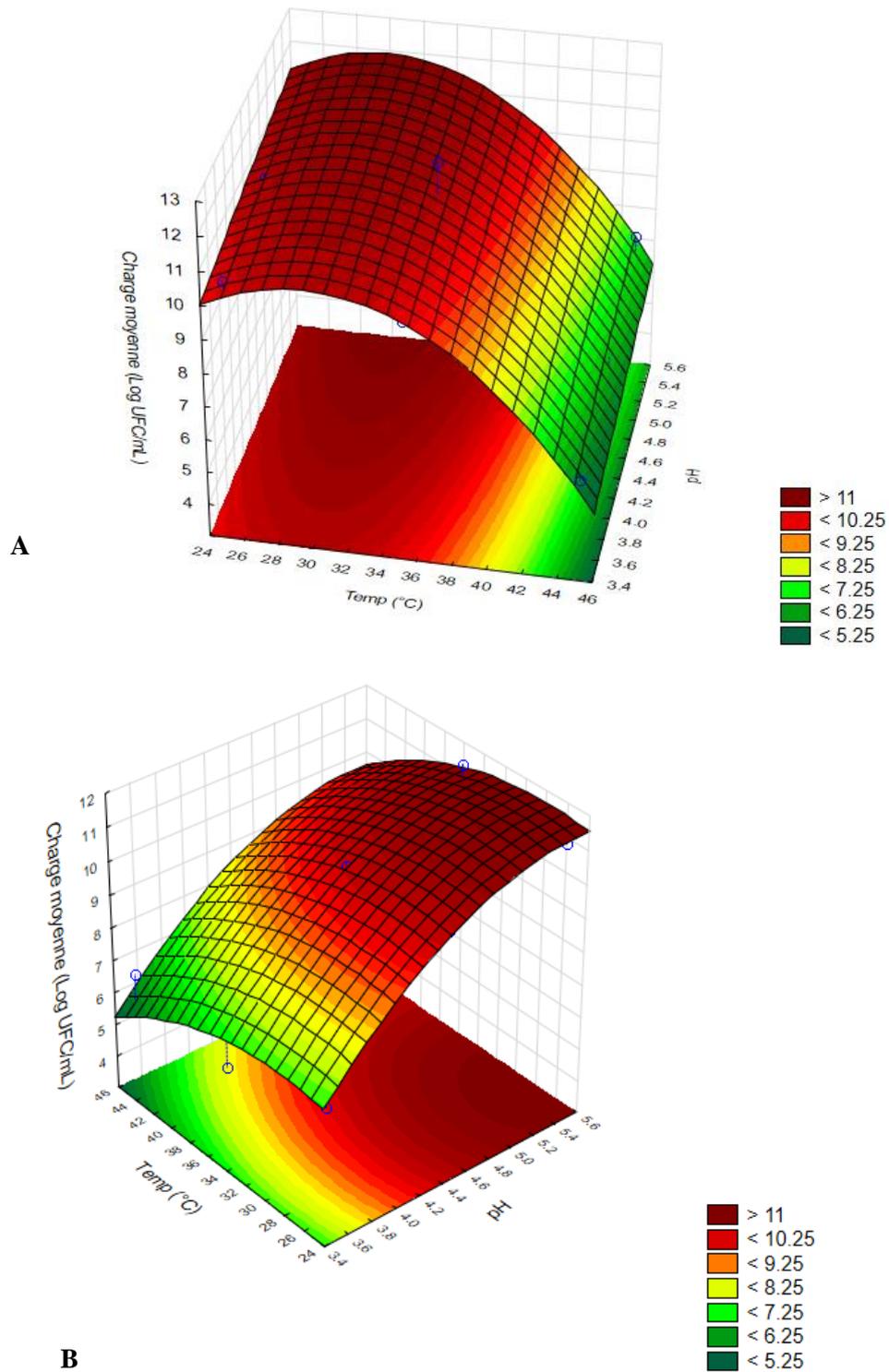
L'analyse statistique des charges obtenues après culture dans les différentes conditions testées a permis d'obtenir le **Tableau XXIX**. Il en ressort que des 03 facteurs testés, la température et le pH sont respectivement les facteurs ayant un effet significatif sur la croissance

de *L. farciminis* (Lab11.1) et de de *W. cibaria* (A19). En effet, 95,7% des résultats obtenus montrent un effet significatif linéaire négatif et quadratique de la température sur la croissance de *L. farciminis* (Lab11.1). Comme illustré par la **Figure 24**, les concentrations maximales ont été obtenues à 25 et 35°C mais sont minimales à 45°C. Dans le cas de *W. cibaria* A19, c'est un effet linéaire du pH sur la croissance qui a été noté pour 92,90% des résultats obtenus. On peut clairement observer sur cette figure (Figure 24B) l'augmentation de la charge associée au passage du pH de 3,5 à 5,5.

**Tableau XXIX: Effet des différentes variables du milieu sur la croissance des BL.**

Bactéries lactiques	<i>Lactobacillus farciminis</i> (Lab 11.1)			<i>Weissella cibaria</i> (A19)		
Facteurs	Effet	SE	P	Effet	SE	P
<b>Moyenne/Intersection</b>	<b>9,25991</b>	<b>0,257396</b>	<b>0,000047</b>	<b>8,73914</b>	<b>0,305874</b>	<b>0,000094</b>
(1)pH (L)	1,04242	0,651167	0,207725	<b>3,99025</b>	<b>0,773807</b>	<b>0,014141</b>
pH (Q)	0,07099	0,527505	0,901472	0,97749	0,626855	0,216809
(2)Sucre (L)	0,26873	0,651167	0,707553	-0,66525	0,773807	0,453163
Sucre (Q)	0,15760	0,527505	0,784613	0,79944	0,626855	0,291993
(3)Température (L)	<b>-4,46374</b>	<b>0,651167</b>	<b>0,006355</b>	-1,77972	0,773807	0,104992
Température (Q)	<b>2,17768</b>	<b>0,527505</b>	<b>0,025779</b>	0,64478	0,626855	0,379344
R <sup>2</sup>	0,957			0,929		

\*L : Linéaire ; Q : Quadratique ; R<sup>2</sup> : Coefficient de détermination ; SE : Erreur standard ; p : Seuil de significativité (Effet significatif pour p≤0,05) ; les valeurs en gras traduisent un effet significatif du paramètre (p≤0,05).

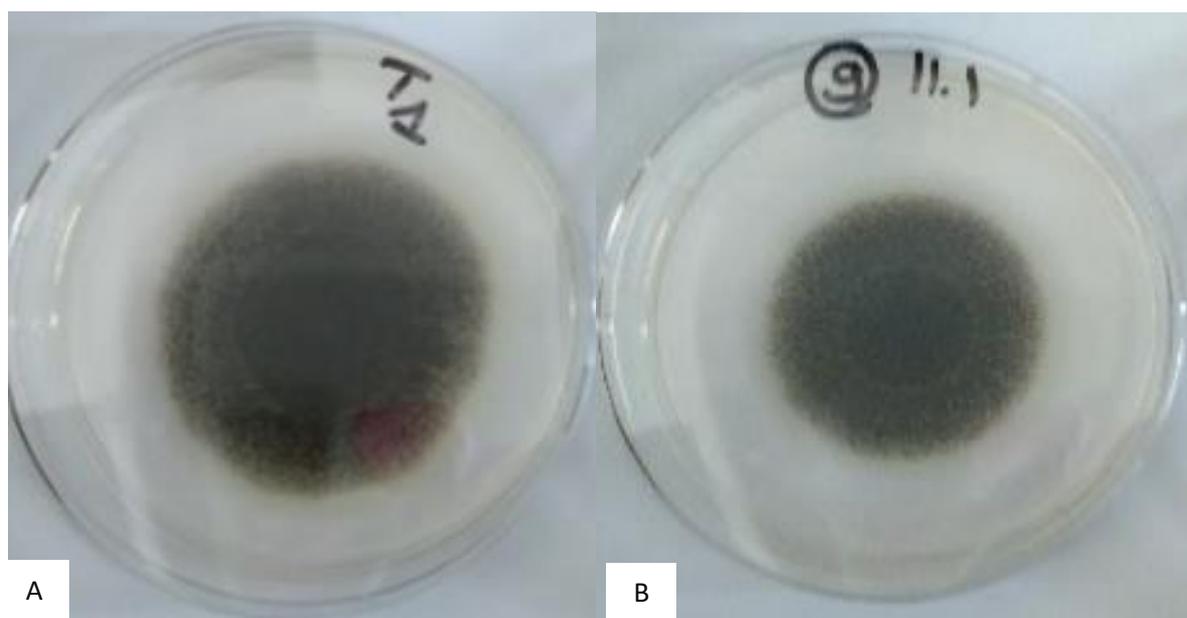


**Figure 24.** Variation de la charge des bactéries lactiques en fonction du pH et de la température : (A) *L. farciminis* (Lab11.1), (B) *W. cibaria* (A19).

\*Teneur en sucre fixée à 15%

❖ **Impact des paramètres de culture des BL sur l'inhibition d'*Aspergillus carbonarius* NRRL 368 par les surnageants des BL**

Les filtrats obtenus des différentes conditions de culture des 2 BL à activité antifongique sélectionnées ont été testés pour leur activité antifongique. La **Figure 25** montre un exemple d'inhibition de la croissance de *A. carbonarius* par le surnageant de *L. farciminis* obtenu dans la condition 9 en comparaison au témoin contenant un surnageant sans culture bactérienne.



**Figure 25.** Inhibition d'*A. carbonarius* NRRL 368 par les surnageants de culture de *L. farciminis* (Lab 11.1) (A) T1 : Témoin sans BL; (B) 9- culture en présence du surnageant issu de la condition 9.

Les résultats d'inhibition obtenus après 48 heures d'exposition aux filtrats dans les différentes conditions sont présentés dans le **Tableau XXX**. Ceux-ci variaient entre 16,67 et 33,33% aussi bien pour *L. farciminis* (Lab11.1) que pour *W. cibaria* (A19). Le filtrat obtenu du milieu MRS était l'un de ceux qui ont montré la meilleure activité antifongique après culture de *L. farciminis* (Lab11.1). Ceci n'était pas le cas avec *W. cibaria* (A19) quoiqu'aucune différence significative n'ait été observée avec les pourcentages d'inhibition obtenus dans les autres conditions testées.

**Tableau XXX:** Pourcentage d'inhibition d'*A. carbonarius* par les surnageants issus des cultures des BL.

Cond	Ph	Sucre (%)	Temp(°C)	Pourcentage d'inhibition (%I)	
				<i>L. farciminis</i> (Lab11.1)	<i>W. cibaria</i> (A19)
1	3,5	10	25	20,83±5,89 <sup>bc</sup>	20,83±5,89 <sup>a</sup>
2	3,5	15	45	29,17±5,89 <sup>ab</sup>	20,83±5,89 <sup>a</sup>
3	3,5	20	35	28,33±7,07 <sup>ab</sup>	29,17±5,89 <sup>a</sup>
4	4,5	10	45	16,67±0,00 <sup>c</sup>	23,57±16,67 <sup>a</sup>
5	4,5	15	35	33,33±0,00 <sup>a</sup>	33,33±0,00 <sup>a</sup>
6	4,5	20	25	28,33±7,07 <sup>ab</sup>	33,33±0,00 <sup>a</sup>
7	5,5	10	35	23,33±0,00 <sup>b</sup>	23,33±0,00 <sup>a</sup>
8	5,5	15	25	25,83±3,54 <sup>ab</sup>	25,83±3,54 <sup>a</sup>
9	5,5	20	45	18,33±2,36 <sup>c</sup>	25,00±11,79 <sup>a</sup>
10	4,5	15	35	31,67±2,36 <sup>a</sup>	28,33±7,07 <sup>a</sup>
MRS	6,5	2	37	33,33±0,00 <sup>a</sup>	25,00±4,71 <sup>a</sup>

\*Dans la même colonne, les valeurs suivies de la même lettre sont statistiquement similaires ( $P \leq 0,05$ ). Donc pas de différence significative entre les moyennes des différentes conditions au niveau 0,05 pour *W. cibaria* (A19).

L'analyse statistique de ces données (**Tableau XXXI**) a permis de relever que pour chacune des 2 souches, 92% des résultats obtenus indiquaient le pourcentage en sucre du milieu de croissance comme étant le facteur clé déterminant l'inhibition observée. Cet effet significatif s'est avéré quadratique pour *L. farciminis* (Lab 11.1) mais linéaire pour *W. cibaria* (A19). En effet, pour la première bactérie les pourcentages d'inhibition des filtrats des cultures faites dans les milieux à 15% de sucre étaient plus élevés que ceux obtenus avec les cultures à 10% et 20% de sucre (**Figure 26**). Avec la deuxième BL par contre c'est une augmentation de l'inhibition avec la teneur en sucre du milieu de culture qui apparaît.

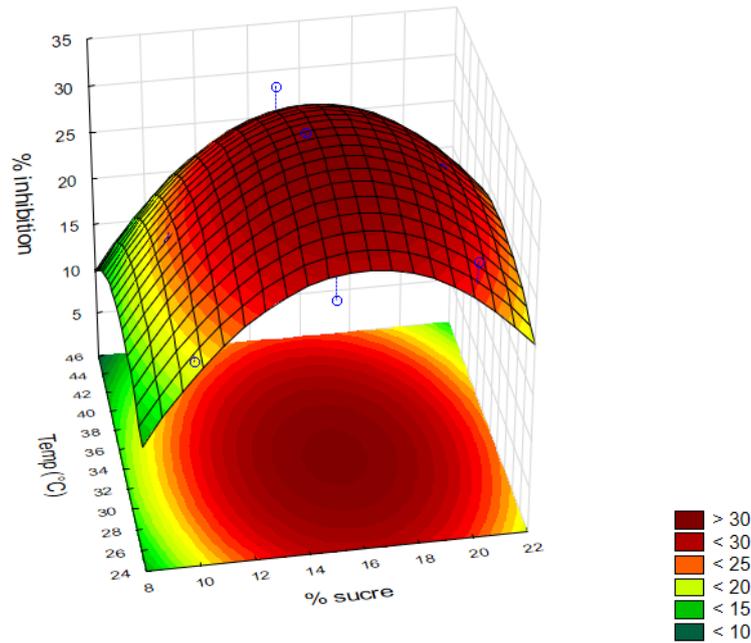
Il est à noter que pour ces deux BL, aucune corrélation significative n'apparaissait entre la charge cellulaire obtenue dans les différentes conditions de culture et les pourcentages d'inhibition des filtrats observés plus tard.

**Tableau XXXI:** Effet des différentes variables testées sur le pourcentage d'inhibition d'*A. carbonarius* par les surnageants des BL.

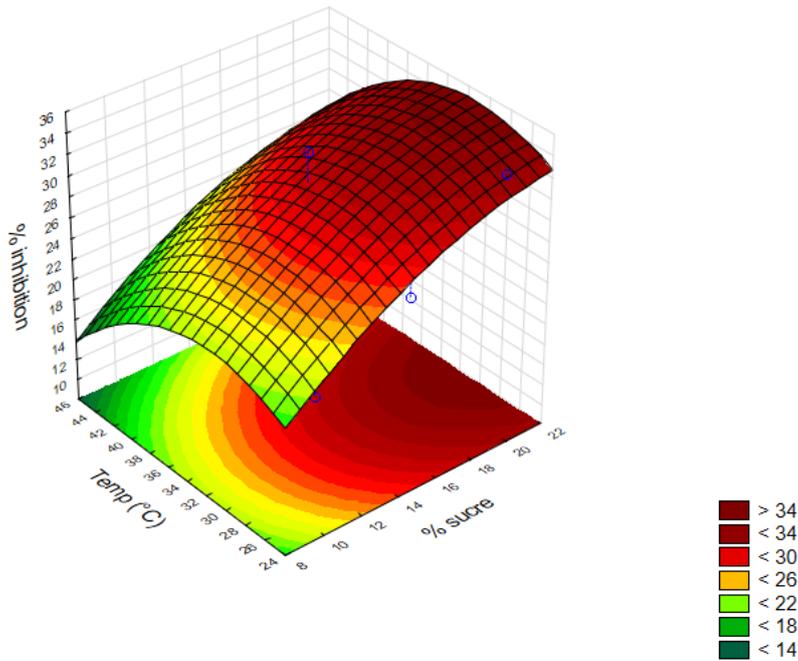
Bactéries lactiques	<i>Lactobacillus farciminis</i> (Lab 11.1)			<i>Weissella cibaria</i> (A19)			
	Facteurs	Effet	SE	P	Effet	SE	P
<b>Moyenne/Intersection</b>		<b>24,75694</b>	<b>0,881835</b>	<b>0,000099</b>	<b>25,12153</b>	<b>30,72240</b>	<b>0,000076</b>
(1) pH (L)		-3,61111	2,230886	0,203948	1,11111	2,068621	0,628462
pH (Q)		1,35417	1,807224	0,508076	2,86458	1,675774	0,185906
(2) Sucre (L)		4,72222	2,230886	0,124566	<b>8,88889</b>	<b>2,068621</b>	<b>0,023183</b>
Sucre (Q)		<b>6,35417</b>	<b>1,807224</b>	<b>0,039030</b>	1,19792	1,675774	0,526312
(3)Température (L)		-3,61111	2,230886	0,203948	-5,83333	2,068621	0,066743
Température (Q)		4,68750	1,807224	0,080811	4,11458	1,675774	0,091245
R <sup>2</sup>			0,92136			0,92883	

\*L : Linéaire ; Q : Quadratique ; R<sup>2</sup> : Coefficient de détermination ; SE : Erreur standard ; p : Seuil de significativité (Effet significatif pour  $p \leq 0,05$ ) ; les valeurs en gras traduisent un effet significatif du paramètre ( $p \leq 0,05$ ).

A



B



**Figure 26.** Variation du pourcentage d'inhibition d'*A. carbonarius* NRRL368 en fonction de la teneur en sucre et de la température du milieu de croissance de *L. farciminis* (Lab11.1) (A), *W. cibaria* (A19)(B).

Au regard des molécules impliquées dans le mécanisme d'antagonisme de la croissance des moisissures, il a été noté que le lactate était le principal acide impliqué dans ce mécanisme, en plus des composés protéiques et d'autres composés de faibles poids moléculaires non identifiés. Quant à l'influence des paramètres du milieu sur l'inhibition des moisissures, la charge des BL a été influencée par la température et le pH du milieu de croissance. Cependant, il n'y a pas eu de corrélation directe entre la charge des BL et l'inhibition des moisissures par

les surnageants des BL. Cette inhibition était plutôt dépendante de la teneur en sucre dans le milieu de croissance des BL.

### **III.1.3. Impact d'un starter mixte levure-bactéries sur la qualité des fèves**

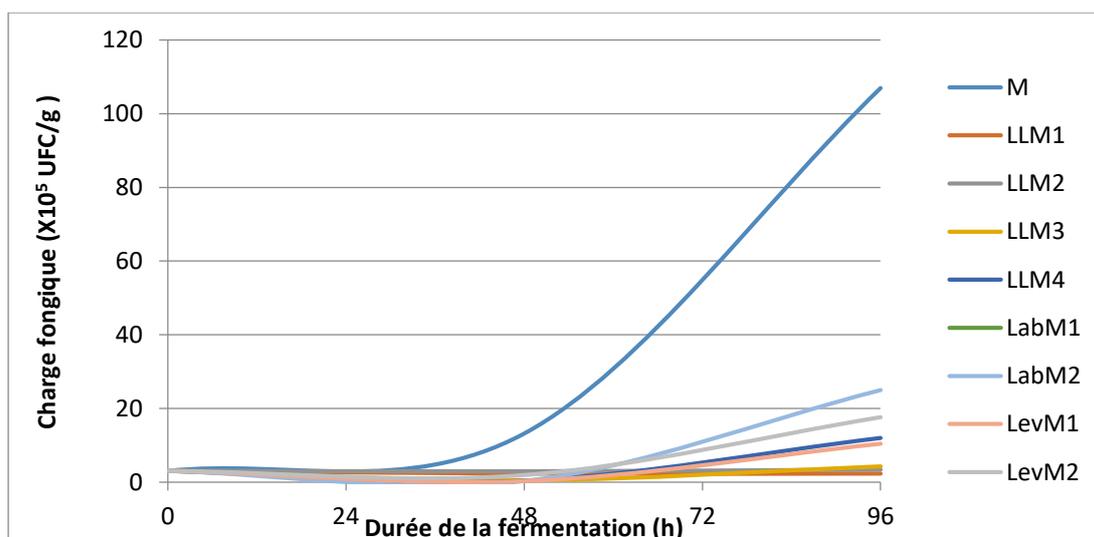
L'isolat *L. farciminis* (Lab11.1) ayant la plus importante activité inhibitrice sur la croissance des moisissures, elle a été associée à la levure *Saccharomyces cerevisiae* (E24) qui a présenté la meilleure production d'alcool pour la mise au point d'un starter adapté à la fermentation des fèves de cacao et l'amélioration de leur qualité.

La fermentation étant influencée par la concentration initiale des microorganismes, il était indispensable de maîtriser la teneur de chacun de nos isolats avant les essais de production.

#### **III.1.3.1. Concentrations des microorganismes du starter**

Les résultats de 5 paramètres suivis en présence de concentrations variables de levure et de BL sont présentés dans les lignes qui suivent en vue de la détermination des teneurs initiales des microorganismes du starter. Ces paramètres, à savoir : la croissance des moisissures, le pourcentage d'inhibition, la teneur en sucre de la pulpe, l'acidité de la pulpe et le grade des fèves, ont permis de déterminer la concentration en microorganismes du starter.

La **Figure 27** qui présente l'évolution d' *A. carbonarius* durant la fermentation montre une croissance de la moisissure à partir de la 36<sup>ème</sup> heure en absence de starter avec une concentration maximale de  $1,07 \times 7\text{Log UFC/g}$  de fèves après 96 heures dans le témoin ensemencé uniquement par la moisissure (M) partant d'une charge fongique de  $3,05 \times 5\text{Log UFC/g}$  de fèves. Par contre, en présence de l'un ou des deux microorganismes du starter, la croissance de la moisissure n'est observée qu'à partir de 60heures et n'excède pas  $6\text{Log UFC/g}$  de fèves.



**Figure 27.** Variation des moisissures durant la fermentation des fèves.

En effet, un examen du pourcentage d'inhibition de la moisissure dans chacune des combinaisons testées (**Tableau XXXII**) montre une meilleure inhibition de la moisissure (96,17%) dans la combinaison de nos deux isolats à des concentrations identiques de 6 Log UFC/g.

**Tableau XXXII:** Taux d'inhibition d'*A. carbonarius* en fonction des différentes concentrations en levures et BL.

Codes	Conditions	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. farciminis</i>	<i>A. carbonarius</i>	PI (%) moyen
		(E24)	(Lab11.1)		
M	1	0	0	6	0,00±0,00
LabM1	2	0	6	6	54,00±0,30
LabM2	3	0	7	6	87,22±0,27
LevM1	4	6	0	6	94,16±0,29
LevM2	5	7	0	6	84,58±0,30
<b>LLM1</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>96,17±0,36</b>
LLM2	7	7	7	6	87,43±0,33
LLM3	8	6	7	6	93,93±0,19
LLM4	9	7	6	6	92,91±0,37

De manière générale, la présence de chaque isolat seul dans cette fermentation supplémentée permettait de réduire la croissance des moisissures mais combinés le taux d'inhibition était meilleur. Car, l'inhibition de la moisissure augmente en présence de levures et de bactéries lactiques. En effet, l'essai ayant des charges égales de 6 Log UFC/g de fèves inhibant le mieux la croissance d'*A. carbonarius* (96%). Tandis que l'essai en présence de la BL seule a présenté le plus faible taux d'inhibition (54%). Toutefois, les levures contribuent

fortement à augmenter ce pourcentage d'inhibition. Ce qui montre l'intérêt d'une association des deux microorganismes pour une meilleure activité du starter.

### ❖ Durée de fermentation

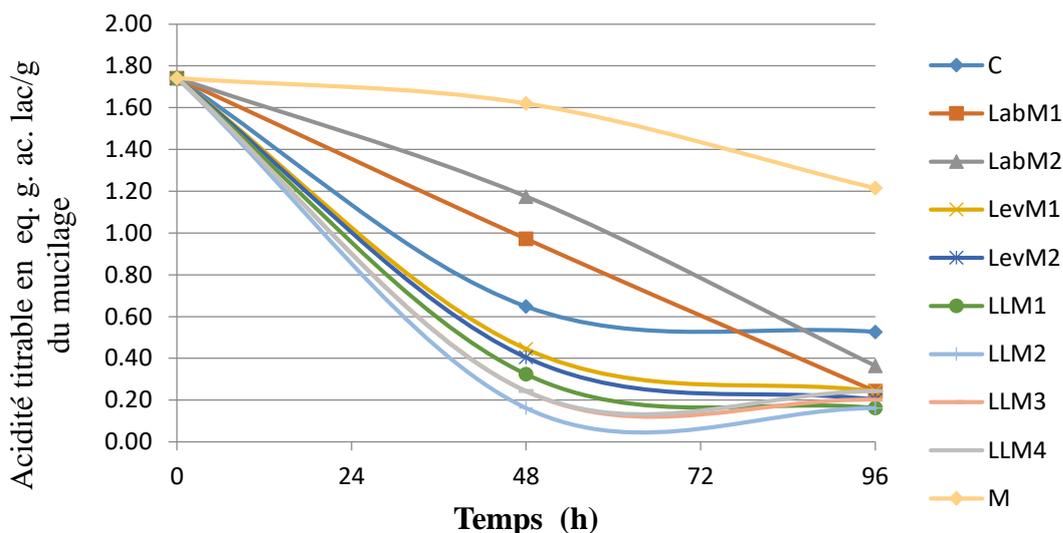
La longue durée de la fermentation alcoolique observée durant la production des fèves favorisant le développement des moisissures d'une part, et la basification du mucilage des fèves influençant la qualité de ces dernières ; il a également été évalué l'impact des concentrations variables des germes de ces 2 paramètres afin d'apprécier la durée de la fermentation en présence des concentrations variables des germes du starter.

Les résultats obtenus montrent un épuisement des sucres fermentescibles (**Tableau XXXIII**) après 48h sur les fèves en présence d'un ou des deux microorganismes et ceci aux concentrations utilisées. Ceci n'était pas le cas avec les fèves issues de la fermentation spontanée dont l'épuisement en sucre s'est observé après 96 heures, 25% de sucre étant encore dans cette fermentation spontanée après 48 heures.

**Tableau XXXIII:** Concentration en sucres réducteurs du mucilage.

Code	Levure (Log Cell/g)	BL(Log UFC/g)	moisissure (Log spore/g)	Teneur en sucres (eq.g.glucose/g de fèves)		
				0 h	48 h	96 h
M	0	0	6	0,57±0,02	0,03±0,02	0,00±0,00
LabM1	0	6	6	0,57±0,02	0,01±0,00	0,00±0,00
LabM2	0	7	6	0,57±0,02	0,01±0,00	0,00±0,00
LevM1	6	0	6	0,57±0,02	0,03±0,00	0,00±0,00
LevM2	7	0	6	0,57±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
LLM1	6	6	6	0,57±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
LLM2	7	7	6	0,57±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
LLM3	6	7	6	0,57±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
LLM4	7	6	6	0,57±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
C	0	0	0	0,57±0,02	0,14±0,01	0,02±0,01

La variation de l'acidité au cours du temps montre une diminution de la teneur en acide dans le mucilage (**Figure 28**). Elle relève une rapide baisse de ce paramètre dans le mucilage des fèves fermentées en présence des levures après 48 heures, les valeurs comparables en présence des BL toutes seules étant obtenues au bout de 96 heures. La valeur d'acidité du mucilage des fèves issues de la fermentation spontanée varie peu après 48 heures.



**Figure 28.** Variation de l'acidité de la pulpe en fonction du temps de fermentation.

### ➤ Qualité des fèves fermentées

Le test à la coupe étant le paramètre le plus exploité dans l'évaluation de la qualité des fèves, celui-ci a été évalué sur les fèves après 96 heures ; temps au bout duquel les teneurs en sucres réducteurs et l'acidité sont comparables en présence des différentes concentrations des microorganismes.

Les résultats obtenus (**Tableau XXXIV**) montrent que trois conditions (LLM1, LLM3 et LevM2) permettent d'obtenir des fèves de 1<sup>er</sup> grade, dont deux en présence de culture mixte de levure et de BL. De ces conditions, celle ayant présentée la plus forte inhibition d'*A. carbonarius* associée à une meilleure qualité a été retenue pour les essais à différentes échelles de grandeurs.

**Tableau XXXIV:** Grade des fèves de cacao obtenues dans les conditions expérimentales.

Code	Levure (Log Cell/g)	BL(Log UFC/g)	moisissure (Log spore/g)	Pourcentage				Grade
				M	D	NF	BF	
M	0	0	6	0	0	10	90	HS
LabM1	0	6	6	0	0	5	95	GII
LabM2	0	7	6	0	0	7	93	GII
LevM1	6	0	6	0	0	5	95	GII
LevM2	7	0	6	0	0	0	100	GI
LLM1	6	6	6	0	0	0	100	GI
LLM2	7	7	6	0	0	5	95	GII
LLM3	6	7	6	0	0	0	100	GI
LLM4	7	6	6	0	0	7	93	GII
C	0	0	0	0	0	10	90	HS

M : Moisie ; NF : Non Fermenté (violet ou ardoisé); D : Défectueuses ; BF : Fèves Bien Fermentées ; HS : Hors Standard ; GII : Grade II ; GI : Grade I.

Il ressort de la synthèse des analyses microbiologiques et physicochimiques que les fermentations menées en présence de la BL *L. farciminis* (Lab11.1) et de la levure *S. cerevisiae* (E24) à la charge de 6Log/g chacune permettent d'obtenir une meilleure réduction de la croissance d'*A. carbonarius* et des fèves de bonne qualité. Ainsi, la **Figure 29** présente l'aspect des fèves obtenues pendant la fermentation dans cette condition.



**Figure 29.** Aspect visuel des fèves de cacao obtenues des différentes combinaisons de starters : (A) Control, (B) LevM1, (C) LevM2, (D) LabM1, (E) LabM2, (F) LLM1, (G) LLM2, (H) LLM3, (I) LLM4, (J) Moisissures.

Les observations réalisées pendant les fermentations menées en présence du starter constitué de *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24) à des charges respectives de 6 Log/g montrent au jour 3 dans le témoin naturel non inoculé, une moisissure non inoculée en développement mais celle-ci n'est pas présente dans les fermentations contenant les starters (**Figure 30**). Parallèlement, l'inhibition de la moisissure *A. carbonarius* NRRL368 est évidente dans la fermentation menée en présence des isolats (**Figure 31**). Ces observations sont les preuves visuelles de l'inhibition des moisissures par le starter utilisé.





J3



J4

Contrôle  
Naturel  
(C)



J3



J4

Levure -  
BL (LL)

**Figure 30.** Aspect des fermentations des fèves dans la condition LL (levure à 6Log, BL à 6Log) en comparaison au témoin naturel aux différents jours de fermentation.



**J1**

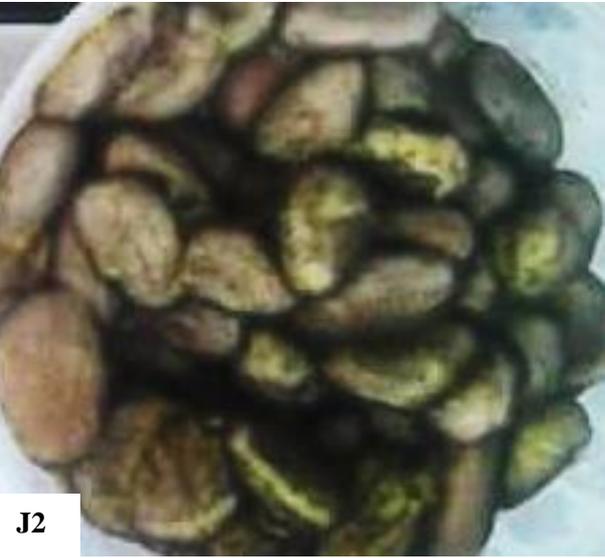


**J2**

**Levure-  
BL-  
Moissure  
(LLM)**



**J1**



**J2**

**Moissure  
(M)**



**Figure 31.** Aspect des fermentations des fèves dans la condition LLM1 (levure à 6Log, BL à 6Log et Moisissure à 6Log) en comparaison à la conditionensemencée de moisissure (M).

### III.1.3.2. Qualité des fèves fermentées à différentes échelles par le starter

La meilleure combinaison des concentrations microbiennes des deux microorganismes retenus pour le starter a été expérimentée dans la fermentation des fèves à différentes échelles afin d'évaluer son efficacité sur la qualité des fèves et vérifier la stabilité du starter. Les **Annexes 6 et 7** présentent quelques étapes de ces productions.

A cet effet, les fèves de cacao reparties en lot de 1Kg et 10kg ont été fermentées en Laboratoire, et les lots de 25 Kg fermentés en milieu rural (avec les producteurs de cacao) et ce en utilisant le starter constitué de *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24) inoculé avec les charges précédemment retenues.

### ❖ Profil microbiologique des fèves au cours des fermentations

Le suivi de la charge des microorganismes d'intérêt durant la fermentation présenté dans le **Tableau XXXV** montre que l'évolution des levures à différentes échelles de fermentation présente un même profil dans les différents essais. On observe dans tous les essais inoculés par le starter une importante croissance des levures durant les 48 premières heures, temps au bout duquel la concentration en levures est maximale de 8 Log. Cette concentration maximale en levures est atteinte dans les 3 ou 4 jours de culture dans les essais non fermentés par le starter montrant ainsi la réduction de la durée de fermentation alcoolique assurée par les levures en présence du starter.

L'évolution des BL quant à elle diffère peu de celle des levures. Les concentrations bactériennes maximales étant atteintes après 48 heures dans les essais inoculés par le starter et seulement après 96-120 heures en absence de starter. Malgré cette similitude, la concentration bactérienne maximale des essais fermentés sans starter demeure inférieure à celle en présence du starter traduisant ainsi la lente colonisation du milieu par les BL en absence d'un apport exogène de ces germes dans le milieu.

**Tableau XXXV:** Variation de la croissance des levures et des BL au cours de la fermentation à différentes échelles.

		Levures (Log UFC/g de fèves)				
		0h	48h	72h	96h	120h
1kg	C	0,60	5,30	-	8,64	8,01
	LL	6,60	8,65	-	8,85	7,80
	LLM	6,60	8,65	-	8,76	7,79
	M	0,60	5,01	-	7,70	3,48
10kg	C	0,70	7,51	8,34	-	7,24
	LL	6,70	7,71	7,57	-	7,70
	LLM	6,70	7,83	7,63	-	7,30
	M	0,70	6,26	7,57	-	7,44
25kg	C	1,42	7,33	8,05	-	5,22
	LL	7,42	8,25	8,64	-	7,31
	LLM	7,42	8,12	8,01	-	7,24
	M	1,42	6,85	7,13	-	6,37
		Bactéries lactiques (Log UFC/g de fèves)				
		0h	48h	72h	96h	120h
1kg	C	0,70	5,85	-	6,31	6,28
	LL	6,70	8,61	-	8,58	7,95
	LLM	6,70	8,76	-	7,53	7,24
	M	1,70	2,32	-	4,65	4,48
10kg	C	0,68	4,67	6,73	-	7,70
	LL	6,68	9,51	8,82	-	8,76
	LLM	6,68	9,57	8,25	-	7,74
	M	0,68	4,84	7,34	-	7,48
25kg	C	1,58	7,24	7,52	-	6,52
	LL	7,58	9,56	8,92	-	8,00
	LLM	7,58	9,55	9,03	-	8,12
	M	1,58	7,14	7,02	-	6,63

- : non déterminé, **C** : témoin non inoculé, **LL** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24), **LLM** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1), *S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*, **M** : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*.

Le **Tableau XXXVI** montre l'évolution des moisissures durant la fermentation qui représente un critère d'appréciation du déroulement de la fermentation en présence ou en absence du starter. Il montre, pour les essais contaminés par *A. carbonarius*, une importante réduction de cette dernière de 6 à des valeurs inférieures ou égales à 1 Log UFC/g de fève par le starter (LLM). Cette réduction de la croissance est observée durant les 48 premières heures, temps au bout duquel la teneur en moisissures reste stable.

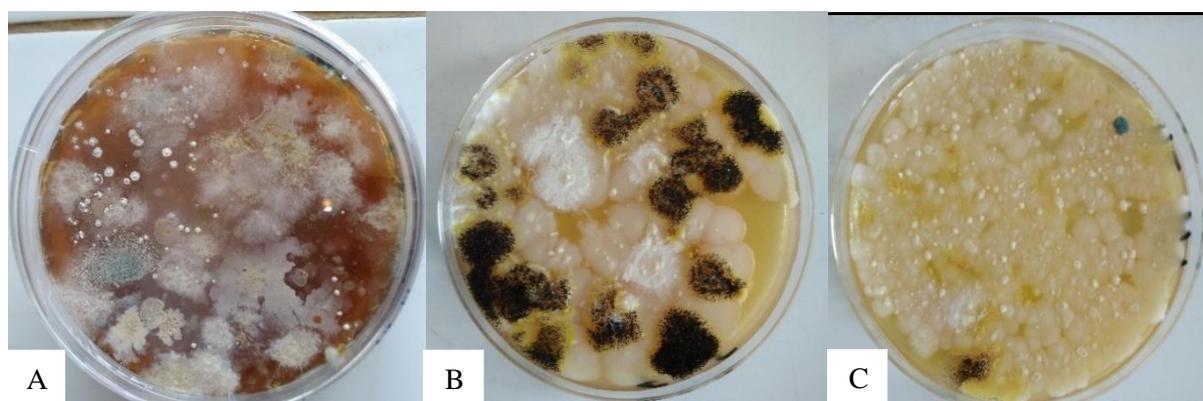
Les résultats similaires sont obtenus sur le témoin non contaminé par une moisissure mais exposé à la contamination fongique de l'environnement (**Figure 32**). Il apparaît en effet dans tous les essais fermentés par ce starter (LL) des taux de contamination en moisissures à la limite du seuil de détection, contrairement aux fèves par la flore naturelle (Essai C) dont la

concentration en moisissures excède les 3 unités logarithmiques par gramme à partir du 3<sup>ème</sup> jours.

**Tableau XXXVI :** Variation de la croissance des moisissures au cours de la fermentation à différentes échelles.

Essais		Moisissures (Log UFC/g de fèves)				
		0h	48h	72h	96h	120h
1kg	C	< LD	< LD	-	3,18	3,30
	LL	< LD	< LD	-	< LD	< LD
	LLM	6,20	0,33	-	0,48	0,36
	M	6,20	7,08	-	8,95	8,25
10kg	C	< LD	LD	4,38	-	4,51
	LL	< LD	< LD	< LD	-	< LD
	LLM	5,15	0,93	0,53	-	0,38
	M	5,15	5,97	6,96	-	7,90
25kg	C	< LD	< LD	3,86	-	4,58
	LL	< LD	< LD	< LD	-	0,25
	LLM	6,15	1,14	1,20	-	1,21
	M	6,15	7,15	7,96	-	7,85

- : non déterminé, **C** : témoin non inoculé, **LL** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24), **LLM** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1), *S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*, **M** : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*.



**Figure 32.** Aspect des boîtes de Petri présentant les moisissures pendant la fermentation (A) dans la condition contrôle non inoculée (C), (B) dans la condition contrôle positif contenant la moisissure seule (M), (C) dans la condition contenant la levure, la bactérie lactique et la moisissure (LLM).

Une évaluation du pourcentage d'inhibition de cette moisissure par le starter sur les essaisensemencés par cette moisissure (**Tableau XXXVII**) a permis de relever un taux d'inhibition supérieur à 80% ; ceux-ci variant de 84% pour les essais réalisés en milieu rural (25Kg) à 95% pour les essais en laboratoire (1 et 10Kg).

**Tableau XXXVII:** Taux d'inhibition obtenu avec la condition LLM des fermentations à différentes échelles.

		Temps (Heures)			
		48	72	96	120
Taux d'inhibition (%)	1kg	95,45±0,25	-	94,67±0,52	95,58±0,29
	10kg	84,34±0,50	92,41±0,25	-	95,15±0,19
<b>LLM</b>	25kg	84,05±4,38	84,90±5,15	-	84,58±4,15

- : non déterminé, C : témoin non inoculé, LL : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24), LLM : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1), *S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*, M : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*.

#### ❖ Caractéristiques du mucilage des fèves au cours de la fermentation

La mauvaise fermentation étant l'un des facteurs favorisant la croissance des moisissures sur les fèves et par conséquent l'altération de leur qualité, plusieurs paramètres physico-chimiques ont été analysés aussi bien sur la fève que dans la fève.

Le mucilage étant l'une des principale source de nutriments de la croissance microbienne favorisant la croissance des moisissures sur les fèves et par conséquent l'altération de leur qualité, deux de ces composantes ont été analysées à savoir le pH, reflet de l'acidité du milieu et la teneur en sucres. Il a ainsi pu être noté une augmentation des valeurs du pH du mucilage au cours du temps (Tableau XXXVIII). Ceux-ci étant d'autant plus importante que la quantité des fèves est élevée avec des valeurs allant de 3,7 en début de fermentation à 4,26 ; 5,18 et 5,75 respectivement pour les essais de 1, 10 et 25 kg.

Les teneurs en sucres totaux quant à elles sont pratiquement épuisées après 48 heures dans l'ensemble des essais inoculés par les souches microbiennes du starter et de la moisissure, contrairement aux essais de fermentation naturelle. Leurs teneurs variant de 15 % (p/p) à moins de 0,5%. Cet épuisement des sucres totaux n'est observé dans les fermentations naturelles (condition C) qu'après 96 heures. Le mucilage des fèves dans ces essais contenant encore 5 % de sucres après 48 heures de fermentation dans l'essai d'1 kg.

**Tableau XXXVIII** : Variation du pH et de la teneur en sucres du mucilage au cours des différentes fermentations.

		<b>pH</b>				
		0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1 kg	C	3,76	3,68	3,65	4,10	4,12
	LL	3,76	3,90	4,09	4,13	4,25
	LLM	3,76	3,82	4,12	4,51	4,77
	M	3,76	3,53	3,90	3,95	3,93
10 kg	C	3,76	3,81	4,18	-	5,12
	LL	3,76	3,85	4,42	-	5,63
	LLM	3,76	3,82	4,22	-	5,55
	M	3,76	3,50	4,02	-	4,44
25 kg	C	3,70±0,00	-	4,00±0,00	-	5,55±0,07
	LL	3,70±0,00	-	4,53±0,04	-	6,68±0,04
	LLM	3,70±0,00	-	4,30±0,00	-	6,55±0,07
	M	3,70±0,00	-	3,55±0,07	-	4,25±0,35
		<b>Sucres totaux (g/100g)</b>				
		0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1 kg	C	16,00±0,00	5,00±0,00	1,00±0,00	< LD	< LD
	LL	16,00±0,00	< LD	< LD	< LD	< LD
	LLM	16,00±0,00	< LD	< LD	< LD	< LD
	M	16,00±0,00	< LD	< LD	< LD	< LD
10 kg	C	15,00±0,00	2,00±0,00	< LD	-	< LD
	LL	15,00±0,00	< LD	< LD	-	< LD
	LLM	15,00±0,00	< LD	< LD	-	< LD
	M	15,00±0,00	< LD	< LD	-	< LD
25 kg	C	16,00±0,00	-	1,52±0,02	-	< LD
	LL	16,00±0,00	-	0,53±0,04	-	< LD
	LLM	16,00±0,00	-	0,50±0,00	-	< LD
	M	16,00±0,00	-	0,99±0,02	-	< LD

- : non déterminé, **C** : témoin non inoculé, **LL** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* Lab11.1 et *S. cerevisiae* E24, **LLM** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* Lab11.1, *S. cerevisiae* E24 et *A. carbonarius* ; **M** : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*, < **LD** : inférieur à la limite de détection.

Le profil de température variant peu dans les faibles masses fermentaires, uniquement celui des lots de 10 et 25 kg ont été suivis. Il ressort du **Tableau XXXIX**, une augmentation progressive de cette température allant de la température ambiante à des valeurs supérieures à 40°C. Le profil obtenu respecte le profil d'augmentation observé dans la plupart des fermentations naturelles à grandes échelles bien qu'il n'ait pas atteint les 50°C généralement indiqué pour des masses plus importantes des fèves. Par ailleurs, l'augmentation de température de cette étude est plus rapide et plus importante dans les lots de 25 Kg en comparaison aux lots de 10 kg. Et plus important en cas d'utilisation du starter qu'en absence de l'utilisation de ce dernier.

**Tableau XXXIX:** Variation de profil de température pendant les fermentations.

		Profil de Température des fèves (°C)				
		0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
10 kg	C	26,00	31,10	39,90	-	41,50
	LL	26,00	37,20	42,00	-	42,00
	LLM	26,00	29,20	42,32	-	42,32
	M	26,00	29,20	39,80	-	40,90
25 kg	C	28,00±0,00	-	40,00±0,00	-	44,50±0,00
	LL	28,00±0,00	-	45,30±0,04	-	46,50±0,71
	LLM	28,00±0,00	-	45,25±0,35	-	47,00±0,00
	M	28,00±0,00	-	39,50±0,71	-	44,50±0,71

- : non déterminé, **C** : témoin non inoculé, **LL** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24), **LLM** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1), *S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*, **M** : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*.

#### ❖ Caractéristiques physicochimiques des fèves de cacao au cours de la fermentation

La qualité finale de fèves dépendant des modifications de son contenu tout au long de la fermentation, trois paramètres ont été évalués durant cette opération unitaire à savoir le pH, l'indice de fermentation et la teneur en polyphénols totaux (**Tableau XXXX**).

Le pH des fèves diminuait dans l'ensemble des essais de 6 à 4. Cette baisse apparaissait plus rapide dans les essais fermentés en présence du starter dont les valeurs minimales de pH étaient obtenues dès la 72<sup>ème</sup> heure. Contrairement au témoin naturel et le témoin moisissure dont ce pH n'est atteint qu'au bout de 120 heures.

Concernant l'indice de fermentation qui évalue la modification de la coloration de la fève apprécié en chocolaterie, il augmente progressivement dans tout les essais au cours du temps. Toutefois, ses valeurs sont proches du standard recommandé 1 au bout à la 72<sup>ème</sup> heures de fermentation dans les essais en présence du starter contrairement à ceux en absence de starter qui ne s'en rapprochent qu'au bout de 120 heures. A ce 5<sup>ème</sup> jour, l'indice de fermentation se trouve plus important dans les essais en présence du starter qu'en absence de celui-ci quelque soit la taille des lots.

La teneur en polyphénols totaux quant à elle décroît plus rapidement dans les essais en présence du starter pour atteindre une valeur inférieure à 1g/100g de fèves contrairement aux essais en présence des moisissures qui ont des valeurs supérieures quelque soit la taille des lots considérés.

**Tableau XXXX:** Variation du pH, de l'indice de fermentation et de la teneur en Polyphénols des fèves au cours de la fermentation à différentes échelles.

		<b>Ph</b>				
		0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1 kg	C	6,00	5,50	5,10	5,00	4,5
	LL	6,00	5,80	4,80	4,50	4,21
	LLM	6,00	5,50	4,50	4,00	4,45
	M	6,00	5,50	5,10	4,50	4,00
10 kg	C	6,00±0,00	-	4,80±0,00	-	4,00±0,00
	LL	6,00±0,00	-	3,90±0,00	-	4,50±0,00
	LLM	6,00±0,00	-	4,20±0,00	-	4,12±0,00
	M	6,00±0,00	-	5,00±0,00	-	4,00±0,00
25 kg	C	6,00±0,00	-	5,05±0,07	-	5,50±0,00
	LL	6,00±0,00	-	4,48±0,04	-	4,81±0,01
	LLM	6,00±0,00	-	4,30±0,00	-	4,50±0,00
	M	6,00±0,00	-	4,60±0,00	-	4,20±0,00
		<b>Indice de fermentation</b>				
		0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1 kg	C	0,40	0,62	0,82	0,93	1,01
	LL	0,40	0,88	0,98	1,18	1,18
	LLM	0,40	0,89	0,99	1,11	1,17
	M	0,40	0,54	0,74	0,88	0,95
10 kg	C	0,39±0,00	0,43±0,00	0,80±0,02	-	0,85±0,00
	LL	0,39±0,00	0,52±0,02	0,95±0,01	-	1,20±0,00
	LLM	0,39±0,00	0,43±0,03	0,98±0,01	-	1,20±0,00
	M	0,39±0,00	0,41±0,00	0,70±0,02	-	0,81±0,00
25 kg	C	0,40±0,00	0,61±0,01	0,74±0,06	-	0,93±0,04
	LL	0,40±0,00	0,69±0,02	0,98±0,04	-	1,20±0,00
	LLM	0,40±0,00	0,65±0,00	0,99±0,01	-	1,21±0,01
	M	0,40±0,00	0,61±0,01	0,74±0,04	-	0,88±0,04
		<b>Polyphénols (g/100g)</b>				
		0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1 kg	C	6,40±1,13	3,84±0,17	-	2,00±1,39	0,97±0,02
	LL	6,40±1,13	3,33±0,21	-	0,83±0,01	0,78±0,04
	LLM	6,40±1,13	3,31±0,27	-	0,98±0,02	0,86±0,01
	M	6,40±1,13	4,03±0,15	-	2,06±1,05	1,32±0,28
10 kg	C	6,85±0,49	4,84±0,17	3,17±0,49	-	1,07±0,07
	LL	6,85±0,49	3,88±0,10	2,14±0,02	-	0,79±0,01
	LLM	6,85±0,49	4,02±0,19	2,70±0,08	-	0,91±0,09
	M	6,85±0,49	5,55±0,57	3,57±0,10	-	1,35±0,06
25 kg	C	6,65±0,21	-	3,17±0,49	-	0,94±0,02
	LL	6,65±0,21	-	2,14±0,02	-	0,73±0,01
	LLM	6,65±0,21	-	2,40±0,36	-	0,81±0,01
	M	6,65±0,21	-	3,57±0,10	-	1,07±0,07

- : non déterminé, **C** : témoin non inoculé, **LL** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24), **LLM** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1), *S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*, **M** : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*.

❖ **Qualité finale des fèves fermentées**

➤ **Grade des fèves de cacao**

Le **Tableau XXXXI** présente les différents grades des fèves de cacao des différents essais de fermentation à l'issue du test à la coupe qui permet de classer ces dernières en fonction de leur qualité. Il en ressort que l'ensemble des fèves fermentées par le starter aussi bien au laboratoire (1 kg et 10 kg) qu'en milieu rural (25 kg) sont de qualité supérieure et classées de premier Grade (GI). Ces derniers confirment l'efficacité de l'inhibition de la souche de moisissure testée avec le starter, environ 2% de fèves moisies étant observées en présence du starter.

Les fèves fermentées naturellement par la flore endogène de l'environnement sont quant à elles de mauvaise qualité avec un pourcentage moyen de fèves non fermentées de l'ordre de 10 %. Ce qui le classe dans la catégorie hors standard (HS).

Quant aux fèves issues des essais contaminés par les moisissures et fermentées par la flore naturelle, celles-ci sont caractérisées par un pourcentage élevé de fèves moisies (8-10%) et des fèves non fermentées (12-30 %) caractérisées par leur aspect violet et ardoisé.

**Tableau XXXXI** : Caractéristiques des fèves de cacao obtenues du test à la coupe.

	Echantillon	Pourcentage (%)				Grade
		M	D	N F	B F	
1 kg	C	0	0	10	90	HS
	LL	0	0	2	98	GI
	LLM	0	0	3	97	GI
	M	8	0	12	80	HS
10 kg	C	0	0	15	85	HS
	LL	0	0	3	97	GI
	LLM	1	0	3	96	GI
	M	10	0	30	60	HS
25 kg	C	1	0	9	90	HS
	LL	0	0	5	95	GI
	LLM	2	0	3	95	GI
	M	8	0	15	77	HS

M : Moisie ; NF : Non Fermenté (fèves de cacao violettes ou ardoisées) ; D : Défectueuses ; BF : Fèves Bien Fermentées ; HS : Hors Standard ; GII : Grade II ; GI : Grade I.

C : témoin non inoculé, LL : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24), LLM : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1), *S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*, M : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*.

➤ **Teneur en OTA des fèves**

La croissance des moisissures étant généralement associée à la production des mycotoxines, la teneur en OTA produite par *A. carbonarius* a été évaluée dans les fèves des différents essais de fermentation et après 60 jours de stockage.

Les teneurs de cette mycotoxine présentées dans le Tableau **XXXXII** révèle la production de l'OTA par *A. carbonarius* durant la fermentation des fèves contaminées par ce champignon avec une valeur initiale oscillante autour de 3µg/kg. Cette concentration en OTA en deça des valeurs de détection dans les fèves fermentées par le starter ou par la flore naturelle en fin de fermentation demeure indétectable dans les fèves fermentées par le starter après 60 jours de stockage. Contrairement à ces dernières (fèves fermentées par le starter), les teneurs croissantes en OTA ont été obtenues dans les autres essais après 60 jours de conservation. C'est ainsi que les fèves issues des essais de fermentation naturelle contaminés par *A. carbonarius* présentent les taux les plus élevés de l'ordre de 13µg/kg tandis que les fèves de fermentation naturelle non contaminées avaient des teneurs autour de 0,02µg/kg.

**Tableau XXXXII :** Quantité d'OTA (µg/kg de fèves fermentés et séchées) dans les différentes conditions.

Taille des tas	Conditions	Quantité d'OTA (µg/kg) après stockage	
		0 jour	60 jours
1 Kg	C	< LD	0,02±0,00 <sup>a</sup>
	LL	< LD	< LD
	LLM	< LD	< LD
	M	3,08±0,23 <sup>a</sup>	13,41±0,26 <sup>b</sup>
10 kg	C	< LD	0,02±0,00 <sup>a</sup>
	LL	< LD	< LD
	LLM	< LD	< LD
	M	2,98±0,21 <sup>a</sup>	12,41±0,26 <sup>b</sup>
25 Kg	C	< LD	0,03±0,00 <sup>a</sup>
	LL	< LD	< LD
	LLM	< LD	< LD
	M	3,31±0,25 <sup>a</sup>	13,50±0,29 <sup>b</sup>

Dans la même colonne, les valeurs suivies de la même lettre sont statistiquement similaires ( $P \leq 0,05$ ). **C** : témoin non inoculé, **LL** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24), **LLM** : Fermentation inoculée par le mélange *L. farciminis* (Lab11.1), *S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*, **M** : Fermentation inoculée par *A. carbonarius*.

L'ensemble des données obtenues des essais de fermentation des fèves en présence d'une monoculture de levure ou de BL ou d'une co-culture d'un isolat de BL et de levure a permis de montrer une meilleure activité d'une coculture comme starter de la fermentation des fèves de cacao. La formulation de ce dernier a révélé que les concentrations équitables de 6

Log/g avaient une meilleure activité inhibitrice sur *A. carbonarius* et permettraient d'obtenir des fèves de qualité supérieure aussi bien en conditions de laboratoire qu'en milieu rural. La qualité des fèves fermentées par ce starter a été maintenue dans le temps, l'OTA n'ayant pas été détecté après 60 jours de stockage.

## III.2. DISCUSSION

Principale source de revenus pour de nombreux pays, le cacao est malheureusement sujet à une dépréciation de sa qualité marchande à cause de la présence des moisissures contaminants les fèves à différents stades de leur production que celles-ci soient productrices ou non de mycotoxines. Ce qui justifie les nombreux travaux entrepris dans la lutte contre la contamination fongique des fèves de cacao (**Essia et al., 2015, Fossi et al., 2016**). Outre la croissance des moisissures, la production des fèves est également limitée par la longue durée de la fermentation dont l'impact sur la qualité organoleptique des dérivés du cacao est bien connu amenant les cacaoculteurs à ne pas la respecter.

Parmi les méthodes de lutte antifongiques utilisées pour y parvenir, les méthodes biologiques demeurent les plus appropriées en raison de leurs nombreux avantages portant sur le respect de la santé et de l'environnement. Divers travaux ont montré le potentiel antifongique des bactéries lactiques isolées des milieux fermentaires (**Dalié et al., 2010 ; Matei et Cornea, 2015 ; Ouattara et al., 2017**). Par ailleurs, la quantité et la spécificité des germes intervenant durant l'opération unitaire de fermentation ayant un impact sur sa durée et par conséquent sur la productivité, nous avons porté notre intérêt sur la recherche de microorganismes capables de répondre à cette double préoccupation pour la production des fèves de cacao de qualité.

Les bactéries lactiques intervenant dans la fermentation des fèves de cacao étant également connues pour leur activité antimicrobienne (**Fossi et al., 2016**), un criblage d'isolats ayant une activité antifongique a été entrepris dans cet écosystème des fèves de cacao. A cet effet, 28 isolats de BL ont été obtenus à partir des fermentations naturelles des fèves et leur activité antifongique évaluée sur 10 souches de moisissures contaminants des fèves et appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (**Moujouenpou, 2008 ; Essia et al., 2015 ; Fossi et al., 2016 ; Visintin et al., 2016**).

Les pourcentages d'inhibition des différentes moisissures varient entre 6 et 100% en fonction des isolats de BL, seuls les isolats ayant un pourcentage d'inhibition moyen supérieur ou égale à 40% ont été retenus. Il s'agit à cet effet des 8 isolats classés par ordre croissant d'activité ci-après : Lab11.1, A21, Ped2, Lab 9, Lab10, Ped3, Lab11.2, et A19. De tous ces isolats Lab11.1 et A19 ont été respectivement le plus actif et le moins actif des isolats à meilleurs activités antifongiques avec des pourcentages d'inhibition moyen de 67 et 41%. Quant aux moisissures, les plus sensibles étaient les souches de *Penicillium citrinum* (M7 et M8) qui ont été totalement inhibées par l'isolat Lab11.1 et A21, tandis que les plus résistantes

étaient *A. carbonarius* NRRL 368 et *A. tamarisii* M21. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Gerez et al. (2010)**, **Matei et Cornea (2015)** et **Ouattara et al. (2017)** qui ont rapporté que les espèces de *Penicillium* sont plus sensibles aux molécules bactériennes actives que les moisissures du genre *Aspergillus*. En analysant l'activité antifongique des BL, il a été constaté une variation de sensibilité des moisissures au sein d'une même espèce pouvant s'expliquer par la présence de plusieurs morphotypes ayant des caractéristiques différentes, comme décrit par **Tareb et al. (2015)**, **Ayo-Olalusi (2017)** et **Sharma et al. (2018)**.

Les isolats de BL à forte activité antifongique soumis à la caractérisation biochimique ont montré leur capacité à métaboliser le glucose, le fructose, le saccharose, le maltose, le lactose, et le cellobiose. Aucun des isolats n'a produit de sulfure d'hydrogène. En revanche, des différences entre ces isolats ont été observées pour la production d'acide à partir de la fermentation du glycérol, de l'arabinose, du thréhalose, du raffinose, du mélibiose, du ribose, de l'esculine et du dioxyde de carbone provenant de la fermentation du glucose. Ces caractéristiques sont conformes à celles rapportées par **Fusco et al. (2015)** pour *Weissella cibaria*, par **Tsuda et al. (2012)** pour *Lactobacillus farciminis*, par **Baradaran et al. (2012)** pour *Pediococcus pentosaceus*, par **Manero et Blanch (1999)** pour *Enterococcus faecium* et par **Gandevia et al. (2017)** pour *Lactobacillus brevis*. Cette caractérisation biochimique a été confirmée par l'identification moléculaire qui a révélé que les isolats à activité antifongique correspondent effectivement aux espèces *Weissella cibaria* (Lab10, A19 et Ped2), *Pediococcus pentosaceus* (Lab 9), *Lactobacillus brevis* (A21), *Lactobacillus farciminis* (Lab11.1) et *Enterococcus faecium* (Lab11.2 et Ped3). La présence de ces espèces est conforme aux résultats d'autres travaux qui ont trouvé les microorganismes des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Enterococcus* dans la fermentation des fèves de cacao au Ghana, au Nigeria, en Côte d'Ivoire et au Cameroun (**Camu et al., 2007** ; **Visintin et al., 2016** ; **Ouattara et al., 2017**). Certains d'entre eux ayant également trouvés dans le milieu de fermentation des fèves, des bactéries lactiques aux propriétés antimicrobiennes et antifongiques.

L'isolat Lab11.1 à forte activité antifongique correspondant à *Lactobacillus farciminis* vient confirmer les travaux de **Laref et al. (2013b)** ayant rapporté l'activité de cette espèce contre *Aspergillus sp.*, *Fusarium roseum*, *Trichoderma sp.* et *Penicillium sp.* Cette espèce ayant déjà été exploitée dans la lutte biologique et trouvant plusieurs applications dans les domaines alimentaire et médicale comme probiotique (**Lamine, 2004** ; **Ait-Belgnaoui et al., 2006**), a été retenue pour la mise au point du starter de fermentation des fèves de cacao.

Concernant la durée de fermentation des fèves dont on sait qu'elle est initiée par la fermentation alcoolique assurée par les levures (**Ho et al., 2014 ; Almeida et al., 2019**), un criblage des levures à forte production d'alcool a été mené. A cet effet, 29 levures ont été isolées et testées pour leur aptitude fermentaire. Ces isolats ont présenté des vitesses variables de production d'éthanol au cours de l'évaluation de leur aptitude fermentaire avec les masses en gaz carbonique obtenues variantes de 0,73g à 1,78g. Deux d'entre eux ont présenté les meilleures aptitudes avec des pertes en masse en CO<sub>2</sub> respectives de 1,5g et 1,7g pour les isolats E21 et E24. La caractérisation moléculaire de ces isolats a permis d'identifier l'isolat E21 comme *Candida parapsilosis* et l'isolat E24 comme *Saccharomyces cerevisiae*, deux des différents genres fréquemment rencontrés dans la fermentation des fèves que sont: *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Candida* et *Kloeckera* (**Schwan et Wheals, 2004 ; Jespersen et al., 2005**). Bien que *Hanseniaspora guilliermondii* ait été indiquée comme présente dans les 24 premières heures de la fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia membranifaciens* demeurent les plus abondantes dans toutes les fermentations après 36 à 48 h, (**Nielsen et al., 2007; Lagunes-Gálvez et al., 2007**). Cette prédominance de *Saccharomyces cerevisiae* observée au cours de la fermentation des fèves dans les pays producteurs de fèves de cacao (Brésil, Ghana, Mexique, Malaisie) est due à sa capacité à produire et à tolérer des concentrations élevées d'éthanol et de sucres dans un milieu acide, à sa capacité à s'adapter aux changements de pH et de température, à ses faibles besoins nutritionnels et à son activité pectinolytique (**Papalexandratou et al., 2011 ; Pereira et al., 2013 ; Moreira et al., 2013 ; Papalexandratou et al., 2013 ; Batista et al., 2016**).

Dans la deuxième partie de ce travail, il était question de déterminer les mécanismes d'antagonisme de la croissance des moisissures par les bactéries lactiques. L'activité inhibitrice des BL a été attribuée à divers métabolites parmi lesquels le peroxyde d'hydrogène, les acides organiques, les composés protéiques (**Schnurer et Magnusson, 2005 ; Aunbjerg et al., 2015 ; Le Lay et al., 2016 ; Tatsadjieu et al., 2016 ; Fossi et al., 2016**). Toutefois, si le mécanisme de l'activité antibactérienne des BL a fait l'objet de nombreux travaux, il n'en est pas de même pour leur activité antifongique, ce que nous avons tenté d'élucider dans les essais d'inhibition d'*A. carbonarius* NRRL 368 et *P. citrinum* M8 par *L. farciminis* (Lab 11.1) et *W. cibaria* (A19).

L'acide lactique étant le principal métabolite des BL, l'impact de cet acide organique dont la concentration dans le surnageant de *L. farciminis* (Lab 11.1) testé était de 19,47 g/l, a

été évalué sur les moisissures. Les résultats obtenus ont permis de déterminer que la CMI (18 g/l) de cet acide sur *P. citrinum* M8, était proche de la teneur en acide lactique du milieu. Par contre la CMI de cet acide vis-à-vis d'*A. carbonarius* était plus importante (39 g/l), confirmant ainsi que l'inhibition en partie des souches fongiques par les BL pourrait également être associée à d'autres acides dans le milieu (Dalié *et al.*, 2010 ; Ouattara *et al.*, 2017).

La perte partielle de l'activité du surnageant après neutralisation par le NaOH confirmerait la synthèse d'autres molécules et l'action synergique de celles-ci dans l'action antimicrobienne des BL. De même, la persistance de l'inhibition des souches fongiques par les surnageants bactériens neutralisés par la soude confirme les résultats des travaux de Garneau *et al.* (2002), Diep et Nes (2002), Dalié *et al.* (2010) ; Laref (2014) ayant montré que le lactate et les acides organiques ne sont pas les seules molécules antifongiques produites par les BL.

Plusieurs molécules antimicrobiennes de nature protéique produites par les BL ont également été décrites dans la littérature, ce qui a justifié leur recherche de notre part. Leur détection sur plaque de CCM et par fractionnement démontre la synthèse de ces molécules par les BL et leur excretion dans le milieu de culture. Bien que ces molécules n'aient pas été identifiées, le nombre de bandes protéiques détectées sur CCM correspondaient au nombre de dipeptides (dont 1 pour *L. farciminis* (Lab11.1) et 2 pour *W. cibaria* (A19)) ayant une activité antifongique caractérisée dans le surnageant de *L. plantarum* et *P. pentosaceus* (Lavermicocca *et al.*, 2000; Magnusson, 2003 ; Valerio *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la réduction du diamètre d'inhibition des souches fongiques par les surnageants ayant subi un traitement thermique ou enzymatique préalable confirme la contribution des molécules protéiques dans l'inhibition des moisissures par *L. farciminis* (Lab 11.1). Aussi, la présence résiduelle de l'activité inhibitrice des surnageants soumis à un traitement thermique mettrait en évidence l'existence de molécules thermostables comparables à celles décrites par Magnusson (2003). L'activité antifongique du surnageant n'a pas été modifiée sous l'action de la catalase excluant le rôle du peroxyde d'hydrogène dans cette activité.

Cependant une large gamme d'autres composés pouvant être impliqués dans l'action synergique de cette inhibition n'a pas pu être recherchée (Aunsbjerg *et al.*, 2015). Wang *et al.* (2012) ont décrit qu'un grand nombre de composés antifongiques produits par les BL sont encore non identifiés à cause de leur faible production dans le milieu extracellulaire. Ceci en incluant le fait que certaines molécules puissent être produites seulement lorsque la souche d'intérêt et la souche cible sont en contact dans le même milieu.

La recherche des paramètres qui influencent l'inhibition des moisissures par les bactéries lactiques a également été menée. Ainsi, sachant que les conditions de l'environnement modulent la production de métabolites antifongiques par les BL (**Batish et al., 1990 ; Sathe et al., 2007 ; Hayek et Ibrahim, 2013**), il était nécessaire d'évaluer l'influence des conditions d'un mucilage synthétique sur la croissance des BL et sur l'inhibition de *A. carbonarius* par les surnageants des BL (*L. farciminis* (Lab11.1) et *W. cibaria* (A19)). En effet, la pulpe de cacao étant un milieu riche en sucres fermentescibles (glucose, fructose et saccharose), protéines, vitamines et les minéraux et possédant un faible pH de 3,5-5, principalement en raison de la présence d'acide citrique ; il constitue un milieu favorable pour la croissance fongique (**Ardhana et Fleet, 2003 ; Schwan et Wheals, 2004, Lefeber et al., 2010**).

Les résultats obtenus ont montré que la température et le pH étaient les paramètres ayant eu un effet significatif respectivement sur la croissance de l'isolat *L. farciminis* (Lab11.1) et *W. cibaria* (A19). Tandis que, la concentration en sucre du milieu de culture était le paramètre déterminant l'inhibition d'*A. carbonarius* par les surnageants des BL. Les résultats obtenus dans la croissance des BL pourraient s'expliquer par le fait que les conditions optimales de température et de pH de croissance des BL soient respectivement situées entre 30 et 40°C, et 5,5 et 7 (**Lamine, 2004 ; Ait-Belgnaoui et al., 2006**). En effet, les charges de *L. farciminis* (Lab11.1) obtenues après 48h d'incubation à 45°C dans le mucilage synthétique étaient proches de la charge initiale. Le même constat est fait concernant *W. cibaria* (A19) mais avec en plus l'effet du pH. Ces résultats vont dans le même sens que les travaux d'**Aspri et al. (2020) et Slizewska et Chlebicz-Wójcik (2020)** qui ont décrit la température et le pH comme des paramètres déterminants de la croissance des BL. Bien que les isolats concernés aient tout de même montré une capacité à croître à des températures élevées. Ce qui confirme le fait qu'une combinaison de plusieurs facteurs de stress entraîne une limitation de la croissance. Quant aux pourcentages d'inhibition enregistrés, les différents paramètres pris ensemble n'ont pas eu un effet sur eux. Cependant, pris séparément la teneur en sucre est le paramètre qui a eu un effet significatif sur le taux d'inhibition. La valeur moyenne favorable à cette activité étant la concentration en sucre de 15% généralement rencontrée sur les fèves en début de fermentation. Ceci s'expliquerait par le fait que les BL en utilisant les sucres comme source de carbone peuvent produire des acides organiques, comme l'acide lactique pour les homofermentaires, molécule reconnue pour ses propriétés antifongiques et nécessaire pour la qualité finale des fèves (**Copetti et al., 2012 ; Eyamo et al., 2016**).

Ayant déterminé la capacité des BL à produire des molécules antifongiques dans le milieu extracellulaire, il a été question au cours de la dernière partie de ce travail, de déterminer la concentration idéale de levure et de BL sélectionnées capable de réduire la croissance de *A. carbonarius*, une moisissure ochratoxinogène et permettant d'obtenir de fèves de bonne qualité en laboratoire et en condition rurale. Pour cela, les fèves ont été fermentées avec des concentrations variables en levures et BL dans des conditions de température simulant le profil des fermentations naturelles. Et à l'issue de ces fermentations, la qualité microbiologique et physicochimique des fèves a été évaluée. Ainsi, il a été observé une inhibition d'*A. carbonarius* durant la fermentation des fèves dans les essais monoculture (levure seule et bactérie lactique seule) et dans les essais en coculture de bactérie lactique et de levure. Cette inhibition pour le cas des BL serait essentiellement due à la synthèse des substances antifongiques pouvant agir indépendamment les unes des autres ou de façon synergique comme décrit dans la deuxième partie du travail (Yang *et al.*, 2010 ; Aunsbjerg *et al.*, 2015 ). En parallèle, l'inhibition en présence de *S. cerevisiae* (E24) seul serait liée à la compétition pour l'utilisation des nutriments présents dans la masse fermentaire (Armando *et al.*, 2013 ; Salas *et al.*, 2017). En effet, certains travaux ont montré que l'inhibition des autres microorganismes par les levures dépend de la disponibilité en éléments nutritif de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Toutefois, certaines souches de levure auraient la capacité de produire certaines molécules appelées « mycocines » ou protéines killer qui auraient l'aptitude d'inhiber d'autres microorganismes et même la synthèse de l'OTA (Armando *et al.*, 2013 ; Salas *et al.*, 2017), mais cet aspect n'a pas été exploré dans ce travail. Ainsi l'utilisation des levures à grande activité fermentaire durant la fermentation du cacao pourrait à la fois réduire le temps de fermentation et préserver la qualité des fèves obtenues par inhibition des moisissures.

Les cocultures levure- BL ont présenté des taux d'inhibition allant de 88,78 à 96,17%. Le taux le plus élevé (96,17%) et les meilleures paramètres de fermentation (en terme de vitesse de réduction des sucres) ayant été obtenus avec les concentrations identiques de *S. cerevisiae* et *L. farciminis* à charge de 6Log UFC/g de fèves.

En effet, au bout de 48 heures, la quantité de sucres réducteurs du mucilage est complètement épuisée dans les fermentations en présence de starters (Levures et BL) contrairement aux fermentations naturelles (non inoculées). Cet épuisement des sucres demeure toutefois plus rapide que celui observé par Moreira *et al.* (2017), dont la teneur en sucres était indétectable après 72heures de fermentation.

Cet épuisement rapide en sucres dans le milieu fermentaire serait dû à l'importante charge des microorganismes initialement inoculés qui les utilisent pour leur croissance et pour

la synthèse des métabolites tels que l'éthanol et l'acide lactique mais aussi des métabolites secondaires tels que les aldéhydes et les cétones (**Moreira et al., 2013 ; 2017**). En effet, en début de fermentation naturelle, la concentration en levures varie entre  $10^4$  et  $10^5$  cellules/g de fèves **Cempaka et al. (2014)**, tandis que les concentrations en levures connues pour initier la fermentation oscillent entre une concentration de levure de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  cellules/g de fèves (**Ardhana et Fleet, 2003**). Un ajout de  $10^6$  cellules de levures par gramme de fèves en début de fermentation (à travers l'utilisation du starter) augmente par conséquent la concentration microbienne initiale capable d'initier la fermentation, contribuant ainsi à accélérer le processus de fermentation des fèves

Ces données de réduction de la durée de fermentation par notre coculture contenant *Saccharomyces cerevisiae* confirment d'une part les travaux de **Cempaka et al. (2014)** qui ont montré que l'utilisation de *S. cerevisiae* var chevalier pouvait améliorer le processus de fermentation et par conséquent améliorer la qualité des fèves obtenues. Elles vont également dans le sens de ceux de **De Vuyst et Weckx (2016)** montrant que l'utilisation des starters durant la fermentation des fèves de cacao pourrait réduire la durée de fermentation, cette réduction étant essentiellement due à l'augmentation de la vitesse de dégradation des nutriments présents dans la pulpe.

L'acidité du mucilage a considérablement baissé au cours de la fermentation. Cette dernière était moins rapide dans les conditions en présence de BL seules qu'en présence des monocultures de levures et des cocultures BL-levure. Cette observation serait due au fait que les BL sont capables de produire l'acide lactique dans le milieu fermentaire, lequel acide prend un peu plus de temps pour migrer à l'intérieur de la fève.

Les résultats des analyses physicochimiques effectuées montrent que les fèves fermentées avec les starters dans les différentes conditions sont au moins de grade II (qualité acceptable) qui se caractérise par la couleur brune des fèves. Mais l'essai mené avec la combinaison levure –BL à  $6 \text{ Log}$  a présenté des fèves de qualité supérieure (GI). Ceci n'était pas le cas des fèves du contrôle et de la condition inoculée de *A. carbonarius* qui sont classés Hors standard à cause d'une part de la présence des moisissures et d'autre part de la couleur ardoisée et violette des fèves. En effet, la disparition de la couleur violette et l'apparition de la couleur brune dans les fèves fermentées par ce starter s'explique par l'hydrolyse des anthocyanines et par les réactions exothermiques de dégradation des sucres provoquées par les microorganismes initialement inoculés dans la masse fermentaire. Ces réactions auraient comme conséquence l'augmentation de la température dans la masse fermentaire (**Apriyanto et al., 2016**) qui provoquerait l'oxydation de la cyanidine, des polyphénols libres et la formation

des complexes sucres-protéines au cours de la réaction de Maillard (**Eyamo et al., 2016**). Le profil de température variant de la température ambiante à des valeurs supérieures à 46°C serait indispensable à l'activation des enzymes endogènes entrant dans les réactions d'oxydation dont la conséquence est la coloration brune, caractéristique des fèves de bonne qualité (**De Vuyst et Weckx, 2016**). En effet, d'après **Misnawi et al. (2002)** l'optimum de température de la polyphénol oxydase, enzyme responsable de l'oxydation et de la diminution des polyphénols dans les fèves est compris entre 42 et 45°C. Le profil de température ayant été suivi dans les fermentations à différentes échelles, l'augmentation de celle-ci de 26 à 47°C durant cette étude a été considérée comme satisfaisante pour un processus de fermentation réussi car les températures optimales ont été atteintes. Ce qui expliquerait aussi la bonne qualité finale des fèves obtenues. Ceci concorde avec les données de **Camu et al. (2007, 2008)** et celles rapportées par **Papalexandratou et al. (2011)** et **Moreira et al. (2013)** qui ont trouvé une température maximale moyenne de 46,8 °C après 144 heures de fermentation.

Ce starter ayant servi à mener des fermentations à différentes échelles en laboratoire et en milieu rural a confirmé les effets observés lors de la formulation de ce dernier en permettant d'avoir un pourcentage d'inhibition des moisissures supérieur à 80%. Tout au long de la fermentation, la concentration des levures et des bactéries lactiques est restée assez importante prouvant que lorsque les microorganismes ont atteint leur charge maximale dans les premières 48 heures de la fermentation, leur taux de mortalité est amoindri à la fin de la fermentation. Ce résultat ne corrobore pas celui de **Schwan (1998)** qui a obtenu une décroissance des souches naturelles à des teneurs allant jusqu'à 10 cellules viables par gramme de fèves environ à la fin de la fermentation.

Les valeurs des paramètres tels que le pH des fèves, la teneur en polyphénols totaux, l'indice de fermentation et le grade des fèves obtenus dans les conditions menées en présence de starters étaient meilleurs que celles du contrôle naturel et de l'essai mené en présence de la moisissure uniquement. Elles montraient que, l'efficacité du processus de fermentation dépend des microorganismes initialement présents, de leur concentration et probablement de la durée de la fermentation comme décrit par **Kresnowati et Febriami (2015)**. En effet, des mécanismes de synergie entre ces deux microorganismes expliqueraient l'aptitude de ces derniers à améliorer l'efficacité de la fermentation et par conséquent la qualité des fèves. En effet, les levures créent des conditions favorables au développement des bactéries lactiques durant les premières heures de la fermentation par l'hydrolyse des macromolécules, la consommation du dioxygène et la synthèse de l'éthanol (**Almeida et al., 2019**). Les conditions ainsi créées donnent lieu à la colonisation des fèves par les bactéries lactiques qui à leur tour,

vont synthétiser des molécules dont la diffusion dans les fèves améliore la qualité de celles-ci (Copetti *et al.*, 2012, Eyamo *et al.*, 2016).

Enfin, la concentration en OTA a été en dessous des valeurs de détection dans les fèves fermentées par le starter même après 60 jours de stockage. En comparaison au contrôle naturel qui a une valeur proche de 0,02µg/kg et des essais inoculés par la moisissure seule dont cette teneur est montée jusqu'à 13,41±0,26 µg/kg, valeur largement au dessus de celle de la réglementation européenne (EC) N° 1881/2006 qui fixe la teneur en OTA limite dans les produits similaires comme le café à 5,0 µg/kg (AFSSA, 2009). Cette dernière observation encourage l'utilisation de ce starter pour limiter la croissance des moisissures dans les fèves de cacao et la production de l'ochratoxine A.



**CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES**

## CONCLUSION

Dans la filière cacao, la contamination des fèves par les moisissures constitue un problème pour la santé de l'Homme et des animaux de par la synthèse des mycotoxines qui doivent être limitées dans les produits destinés à l'alimentation. L'approche de la lutte biologique qui se veut soucieuse de l'environnement et des exigences du marché a été évisagée comme voie à explorer pour réduire la contamination des fèves par les moisissures et par conséquent améliorer la qualité des fèves. Ce travail avait donc pour principal objectif de réduire la croissance des moisissures ochratoxinogènes par l'utilisation de bactéries lactiques aux propriétés antifongiques et de levures à forte aptitude fermentaire au cours de la fermentation des fèves de cacao. Au terme de celui-ci nous avons pu noter que :

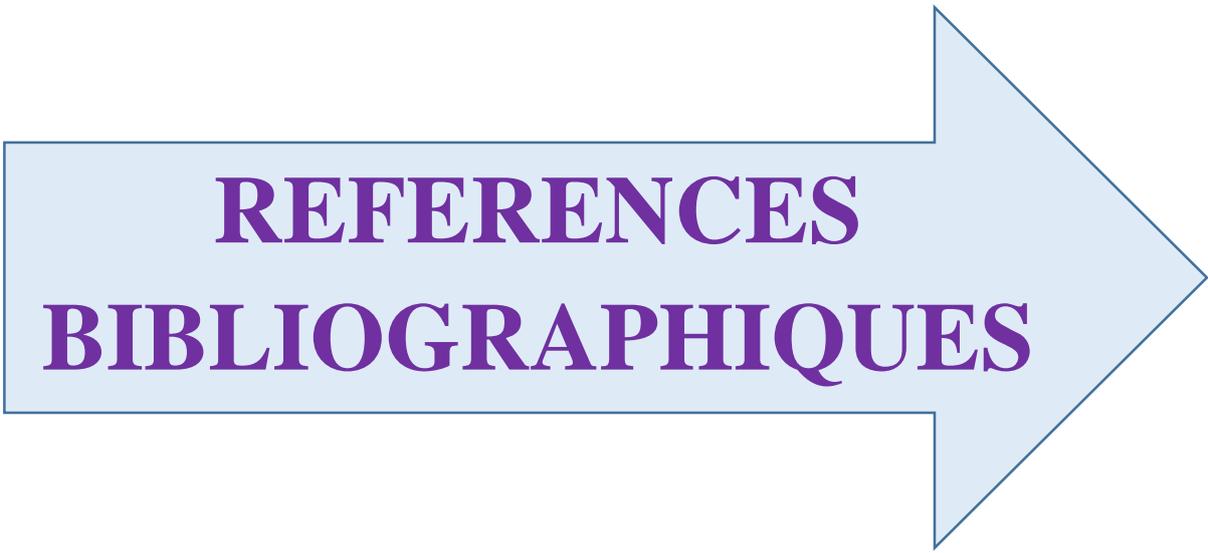
- Le milieu de fermentation des fèves de cacao contient des souches d'intérêt à savoir des bactéries lactiques à activité antifongique et des levures à fort potentiel de production d'alcool. Ainsi, l'isolat de BL *Lactobacillus farciminis* (Lab11.1) a été retenue comme ayant la meilleure activité antifongique, suivi des autres isolats à savoir *Weissella cibaria* (A19, Lab10 et Ped2), *Enterococcus faecium* (Ped3 et Lab11.2), *Pediococcus pentosaceus* (Lab9) , et *Lactobacillus brevis* (A21). L'isolat de levure *Sacharomyces cerevisiae* ( E24) a présenté la meilleure aptitude de dégradation des sucres du mucilage avec production d'éthanol (1,78g/l).
- La recherche des familles de composés antifongiques des BL a montré que l'inhibition de la croissance des moisissures était lié à la présence de l'acide lactique, des peptides, des composés de faibles poids moléculaires et des protéines thermostables produits par les dites BL dans le milieu extracellulaire. Par ailleurs l'étude des conditions optimales de production des molécules antifongiques a permis de dégager l'impact des facteurs du milieu de fermentation des fèves sur l'inhibition d'*A. carbonarius* NRRL368. De façon générale, la température et le pH ont respectivement influencé la croissance des isolats de BL *L. farciminis* (Lab11.1) et de *W. cibaria* (A19), et seule la teneur en sucre a eu un effet significatif sur le pourcentage d'inhibition de la moisissure.
- Le starter constitué de l'isolat de BL *Lactobacillus farciminis* (Lab11.1) et de l'isolat de levure *Sacharomyces cerevisiae* (E24) à des charges de 6 Log UFC/g chacun a permis d'inhiber la croissance de *A. carbonarius* NRRL 368 à plus de 84 %, et de réduire de 5 à 3 jours la durée de fermentation en condition de laboratoire comme en milieu rural. Il a également permis d'obtenir des fèves de qualité supérieure (Grade I)

en comparaison aux différents témoins. En plus, les fèves obtenues à partir du starter n'ont pas présenté d'Ochratoxine A après 60 jours de stockage à température ambiante.

## **PERSPECTIVES**

Dans l'optique de poursuivre ce travail et de proposer un starter adapté dans la lutte biologique contre les moisissures dans l'amélioration de la qualité des fèves de cacao, il conviendrait d'élargir les recherches en :

- ✓ Evaluant l'influence de l'utilisation du starter sur la qualité des fèves obtenues des différentes méthodes de fermentation couramment utilisées dans différentes localités ;
- ✓ Caractérisant les précurseurs aromatiques des fèves de cacao obtenues en présence du starter proposé dans les différentes méthodes de fermentation couramment utilisées ;
- ✓ Evaluant les propriétés sensorielles et la composition nutritionnelle du chocolat obtenu à partir des fèves fermentées par les starters.



**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- Adabe K.E., Ngo-Samnick L., *Production et transformation du cacao*. Collection Pro-AGRO, p.44, (2014).
- AFNOR (Association Française de Normalisation. *Recueil des normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes, Jus de fruits*. 1<sup>ère</sup> édition, Paris la défense (France), (1982).
- Afoakwa, E. O., Budu, A. S., Mensah-brown, H., Felix, J. *Changes in biochemical and physico-chemical qualities during drying of pulp preconditioned and Fermented Cocoa (Theobroma cacao) Beans*. *International Food Research Journal*, 20 (4), 1843-1853, (2014).
- AFSSA (Agence Française de sécurité sanitaire des aliments), *Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*. Rapport final, mars, p.308, (2009).
- Ait-Belgnaoui A., Han W., Lamine F., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L., Theodorou V. *Lactobacillus farciminis treatment suppresses stress-induced visceral hypersensitivity: a possible action through an interaction with epithelial cells cytoskeleton contraction in rats*. *Gut*; 55 (8), 1990-1994, (2006).
- Almeida S.F.O., Silva L.R.C., Junior G.C.A.C., Oliveira G., Silva S.H.M., Vasconcelos S., Lopes A.S., *Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon*. *Acta Amazonica*, 49, 64-70, (2019).
- Amani C., *Cacao : obtenir les fèves de qualité*, Agroivoire, p.23, (2014).
- ANOR, *Catalogue des normes Camerounaise*, Avril, p. 60, (2015).
- AOAC, *Analytical methods of the office international du cacao et du chocolat*. Niklausstrasse 4. Zurich, Switzerland, p.9, (1970).
- Ardhana M.M., Fleet G.H., *The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia*. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 87-99, (2003).
- Armando M.R., Dogi C.A., Poloni V., Rosa C.A.R., Dalcero A.M., Cavaglieri L.R., *In vitro study on the effect of Saccharomyces cerevisiae strains on growth and mycotoxin production by Aspergillus carbonarius and Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 182–188, (2013).
- Apriyanto M., Sutardi, Supriyanto, Harmayani E., *Study on effect of fermentation to the quality parameter of cocoa bean in Indonesia*. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 35, 160-163, (2016).
- Apriyanto M., Sutardi, Supriyanto, Harmayani E., *Amino acid analysis of cocoa fermented by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. *Asian Journal Dairy and Food Research*, 36 (2), 156-160, (2017).
- Aspri M., Papademas P., Tsaltas D., *Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products*, *Fermentation*, 6 (30), 2-20, (2020).

Assoumou J., *L'économie du cacaoyer. Histoire du cacao au Cameroun*, 4<sup>ème</sup> Edition, 1-3, (2011).

Atoui A.K., *Approche de la mycotoxinogénèse chez Aspergillus Ochraceus et Aspergillus carbonarius: Études moléculaires et physiologique*. Thèse de doctorat: Toulouse-France, p.245, (2006).

Aunbjerg S.D., Honoré A.H., Marcussen J., Ebrahimi. P., Vogensen. F.K., Benfeldt. C., Skov. T., Knochel S., *Contribution of volatiles to the antifungal effect of Lactobacillus paracasei in defined medium and yogurt*. Journal of Food microbiology, 194, 46–53, (2015).

Ayo-olalusi C.I., *Isolation and identification of probiotics Pediococcus pentosaceus 2 and Pediococcus pentosaceus 1 from the gut of Tilapia guineensis for use in aquaculture production*. International Journal Of research Studies in microbiology and biotechnology, 3, 15-20, (2017).

## **B**

---

Baradaran A., Ling F.H., Sieo C.C., Rahim R.A., *Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from Polygonum minus*. Romanian Biotechnological Letters, 17, 7245-7252, (2012).

Barel M., *De la cabosse à la tablette*, Editions quae, p.2, (2009).

Batish V.K.S., Lai R., Grover S., *Studies on environmental nutritional factors on production of antifungal substance by Lactobacillus acidophyllus*. Food Microbiology, 7 (3), 199-206, (1990).

Batista N.N., Ramos C.L., Dias D.R., Pinheiro A.C.M., Schwan R.F., *The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate*. Journal of Food Sciences Technology, 53 (2), 1101–1110, (2016).

Berbiye Y.I., *Raw Cocoa (Theobroma cacao L.) Quality Parameters - with special Reference to West Africa*. Dissertation submitted for the award of the Doctorate Degree at the Biology Department, Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, University of Hamburg, Ghana, p.23, (2014).

Bevan E.A., Makover M., *The physiological basis of the killer character in yeast*. In: Genetics Today, XI International Congres of Genetic, Pergamon Press, Oxford, 202-203, (1963).

Bogdan M., Salzat J., Diguță C.F., Cornea P.C., Luță G., Utoiu E.R., Matei F., *lactic acid bacteria strains isolated from kombucha with potential probiotic effect*, Romanian Biotechnological Letters, 20 (10),1-7, (2018).

Bradford, M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" Anal of Biochemistry, 72, 248 – 254, (1976).

Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J., *Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage*. Applied and Environmental Microbiology, 73, 5547–5552, (2007).

Bull C.T., Wadsworth M.L., Sorensen K.N., Takemoto J.Y., Austin R.K., Smilanick J.L., *Syngomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons*. Biological Control, 12 (2), 89-95, (1998).

## C

Camu M.N., De Winter T., Verbrugghe K., Cleenwerck I., Vandamme P., Takrama J.S., Vancanneyt M., De Vuyst L., *Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana*. Applied and Environment. Microbiology, 73, 1809–1824, (2007).

Camu M.N., Gonzalez A., De Winter T., Van Schoor A., De Bruyne K., Vandamme P., Takrama J.S., De Vuyst L., *Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria populations involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana*. Applied and Environmental Microbiology, 74, 86–98, (2008).

CAOBISCO/ECA/FCC, *Cocoa Beans: Chocolate and Cocoa Industry Quality Requirements*. End M.J. and Dand R. Editors, September, ISBN: 978-2-9601817-0-8, (2015).

Carvalho C.M., Rocha A., Estevinho M.L.F., Choupina A., *Identification of Honey Yeast Species based on RFLP Analysis of the ITS Region*. CYTA Journal of Food, 5(1), 11-17, (2005).

Cempaka L., Aliwarga L., Purwo S., Kresnowati M., Tri A.P., *Dynamics of cocoa bean pulp degradation during cocoa bean fermentation: effects of yeast starter culture addition*. Journal of Mathematical and Fundamental Sciences, 46 (1), 14-25, (2014).

Chen W. B., Han Y. F., Jong S. C., Chang S-C., *Isolation, purification, and characterization of a killer protein from Schwanniomyces occidentalis*. Applied and environmental Microbiology, 66, 5348-5352, (2000).

Ciani M., Fatichenti F., *Killer toxin of Kluyveromyces phaffii DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apicute wine yeast*. Applied and Environmental Microbiology, 67, 3058-3063, (2001).

CIRAD, *Les mondes du cacao*, Salon international de l’Agriculture, Nestlé, Paris – Portes de Versailles, 15-16, (1999).

CNUCED, *Cacao : Un profil de produit de base*. Wwww.unctad.org/commodities (2016).

Copetti M.V., Iamanaka B.T., Mororó R.C., Pereira J.L., Frisvad J.C., Taniwaki M.H., *The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by Aspergillus species*. International Journal of Food Microbiology, 155, 158–164, (2012).

Copetti M.V., Iamanaka B.T., Nester M.A., Efraim P., Taniwaki M.H., *Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture*. Food chemistry, 136, 100–104, (2013).

Corsetti A., Gobetti M., Rossi J., Damiani P., *Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by Lactobacillus sanfrancisco CBI*. Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 253–256, (1998).

Coulibaly A., Dagnogo K., Sidibe D., Silue N., Dembele A., Biego G.H., *Daily Intake of Aflatoxins from Cocoa (Theobroma cacao) Product in Cote D'Ivoire*. International Journal of Science and Research, 5(5), 2319-7064, (2016).

Cros E., *Influence de la fermentation et du séchage sur la qualité du cacao*. Marchés Tropicaux et Méditerranéens, 2571, 370-372, (1995).

Crowley S., Mahonya J., Van S.D., *Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives*. Trends in food science and technology, 33, 93-109, (2013).

## D

---

Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F., *Lactic acid bacteria - potential for control of mould growth and mycotoxins: A review*. Food Control, 21(4), 370–380, (2010).

Davidson M.P., *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*. In Doyle M.P., Beuchat L.R., and Montville I.J. (Eds.), Food microbiology: Fundamentals and frontiers Washington: ASM press, 385–392, (2001).

De Vuyst L., Weckx S., *The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development*. Journal of Applied Microbiology, 121, 5-17, (2016).

Diep D.B., Nes I.F., *Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram+ bacteria*. Currents Drug Targets, 3, 107-122, (2002).

Diguta C.F., Vincent B., Guilloux-Benatier M., Alexandre H., Rousseaux S., *PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes*. Food Microbiology 28, 1145-1154, (2011).

D'Mello J.P.F., MacDonald A.M.C., *Mycotoxins*. Animal Feed Science and Technology, 69, 155-156, (1997).

Dongo L., Kumar M., Ojiambo P.S., Bandyopadhyay, *Occurrence of ochratoxine A in Nigerian ready for sale cocoa beans*. Agricultural Journal, 3, 4-9, (2008).

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical chemistry, 28, 350-360, (1956).

## E

---

Essia N.J.J., Yadang G., Sado Kamdem S.L., Kouebou C.P., Youté F.S.A., Tsochi K.D.L., Tsoungui A., Etoa F-X., *Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin a producing fungi during cocoa fermentation*, Biocontrol Science and Technology, 25(3), 245-259, (2015).

Eyamo E.V.J., De Taeye C., Niemenak N., Youmbi E., Collin S., *Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations*. LWT- Food Science and Technology, 68, 514-522, (2016).

## F

---

Fahrurrozi, *Microbiological and biochemical investigations of cocoa bean fermentation*. Thesis for the degree of Doctor of Natural Sciences, University of Hamburg, p.225, (2015).

Fossi B.T., Achidi A.U., Tiencheu B., Bille E.Y., Takop G.N., Akwanwi C.M., Wanji S., *Optimisation of inhibitory activity of lactic acid bacteria against Ochratoxin A producing moulds isolated from cocoa using response surface methodology*. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 4(12), 17–26, (2016).

Fusco V., Quero G.M., Cho G-S, Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., Franz C.M.A.P., *The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential*. Frontiers in Microbiology, 6, 1-22, (2015).

## G

---

Gajbhiye M.H., Kapadnis B.P., *Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants*. Biocontrol science and technology, 26(11), 1451–1470, (2016).

Gandevia H.A., Rana N.D., Desai B.A., *Screening, production and antibacterial activity of bacteriocin from lactobacillus spp.* BMR Microbiology, 3, 1-8, (2017).

Garcia-Diez J., Saraiva C., *Use of starter culture in food from animal origin to improve their safety*. International Journal of environmental Research and public health, 18, 2544, (2021).

Garneau S., Martin N.I., Vederas J.C., *Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. Biochemistry, 84, 577– 592, (2002).

Gerez C.L., Carbajo M.S., Rollán G., Torres M.J., Font de Valdez G., *Inhibition of citrus fungal pathogens by using lactic acid bacteria*. Journal of food science, 75, 354–359, (2010).

Gimeno A., *Micotoxinas, Introduction*. XVII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura. <http://www.engormix.com>, (2000).

Graham G.S., *The production of secondary metabolites with flavour potential during brewing and distilling wort fermentations: Review*, Fermentation- MDPI, 3, 63; (2017),

Gresele P., Cerletti C., Guglielmini G., Pignatteli P., De Gaetano, Violi F., *Effects of resveratrol and wine polyphenols on vascular function: An update*. Journal of Nutrition Biochemistry, 22, 201-211, (2011).

Gourama H., Bullerman L.B., *Inhibition of growth and aflatoxin production of Aspergillus flavus by lactobacillus species*. Journal of Food Protection, 58, 1249- 1256, (1995).

Guehi T.S., N'dri D., Yao, Niamien P., Manizan K.R.N., Koffi L.B., Yao M.K., *Comparison of the degree of fermentation and fungal profiles of raw cocoa beans sourced from three ivoirian main producing regions*, African Journal of Food Science, 2, 112-118, (2008).

## H

---

Hamid A., Lopez A.S., *Quality and weight changes in cocoa beans stored under two warehouses' conditions in East Malaysia*. The planter, Kuala Lumpur, 76, 619-637, (2000).

Harwich V.N., *Histoire du chocolat*. Edition Desjoncquères, p.22, (2008).

Hayek S.A., Ibrahim S.A., *Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review*. Food and Nutrition Sciences, 4, 73-87, (2013).

Hennig A., Finks-Gremmels J., Leistner L., *Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation, in mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. Bartsch H., editor, IARC Science, 115, 255-260, (1991).

Hii C.L., Law C.L., Cloke M., *Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa*. Journal of Food Engineering, 90, 191-198, (2009).

Ho V., Zhao T., Fleet G., *Yeasts are essential for cocoa bean fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 174, 72-87, (2014).

Holzappel W.H., Franz C.M.P.A., Ludwig W., Back W., Dick L.M.T., *The genera pediococcus and tetragenococcus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer, E. Stackebrandt (eds.), The prokaryotes, A handbook on the biology of bacteria 3rd edts, p. 387, (2006).

Hutz-adams F., Huber C., Knoke I., Morazan P., Murlabach M., *Renforcer la compétitivité de la producton du cacao et augmenter le revenu des producteurs de cacao en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale*. Sudwind, p.174, (2017).

## I

---

ICCO (2001), Quarterly bulletin of cocoa statistics, Volume XLI, n°2, cocoa year 2000/2001.

ICCO (2018), Quarterly bulletin of cocoa statistics, Volume XLIV, n°3, cocoa year 2017/2018.

ICCO (2021), Quarterly bulletin of cocoa statistics, Volume XLVII, n°2, cocoa year 2020/2021.

## J

---

Jarvis B.B., Miller J.D., *Mycotoxins as harmful indoor air contaminants*. Applied Microbiology and Biotechnology, 66, 367–372, (2005).

Jespersen L., Lielsen D.S., Hønholt S., Jakobsen M., *Occurence and diversity of yeasts involved in fermentation of west african cocoa beans*. Fems Yeast Research, 5, 441–453, (2005).

Jiang C., Junling S., Vanlin L., Chengyong Z. *Inhibition of Aspergillus carbonarius and fungal contamination in table grapes using Bacillus subtilis*. Food Control, 35, 41- 48, (2014).

Jonfia-Essien W., Shlomo N., Villers P., *Hermetic storage: A novel approach to the protection of cocoa beans*. African Crop Science Journal, 18, 59 – 68, (2010).

## K

---

Kejjab, *Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété chamlal : évaluation de l'activité avant et après glycosylation*. Mémoire de Master en Sciences Biologiques option Biochimie appliquée aux Bio-industries, Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, p.171, (2014).

Kedjebo K.B.D., Guehi, T.S., Kouakou B., Durand N., Aguilar P., Fontana A., Montet D., *Effect of post-harvest treatments on the occurrence of Ochratoxin A in raw cocoa beans*. Food additives and contaminants - part a chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment, 33 (1), 157–166, (2015).

Koen I., De Vuyst L., Papalexandratou Z., Weckx S., *Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa beans fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity*. Plos one, 7 (5), 1-11, (2012).

Kokkomen M., Jestoi M., Rizzo A., *The effect of substrate on mycotoxin production of selected penicillium strains*. International Journal of Food Microbiology, 99, 207-214, (2005).

Kone S. *Aliments et breuvages aromatiques à partir du cacao*. Traduit du Texte original en anglais de Werner Baensch. InfoGate. <https://www.gtz.de/gate/>, (2000).

Kongor J.E., Hinneh M., De Walle, Van, Afoakwa E.O., Boeckx P., Dewettinck K., *Factors influencing quality variation in cocoa (Theobroma cacao) bean flavour profile - A review*. International Food Research, 82, 44–52, (2016).

Kostinek M., Ban-Koffi L., Ottah-Atikpo M., Teniola D., Schillinger U., Holzappel W.H., Franz C.M.A.P., *Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria*. Current Microbiology, 56, 306–314, (2008).

Kozaki M., Uchimura T., Okada S., *Experimental manual of lactic acid bacteria*. Tokyo, Japan : Asakurasyoten, 34–37, (1992).

Kresnowati P., Febriami H., *Mapping the effects of starter culture addition on cocoa bean fermentation*. Asean Engineering Journal, 5, 2286-7694, (2015).

## L

---

Lagunes-Gálvez S.G., *Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao*. DEA, Ecole Doctorale Science et Procédés Biologiques et Industriels. Université de Montpellier II, p.34, (2002).

Lagunes-Gálvez S., Loiseau G., Paredes J.L., Barel M., Guiraud J.P., *Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic*. International Journal of Food Microbiology, 114, 124–130, (2007).

- Laitila A., Alakomi H.L., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Haikara A., *Antifungal activities of two lactobacillus plantarum strains against fusarium moulds in vitro and in malting of barley*. Journal of Applied Microbiology, 93, 566–576, (2002).
- Lamine F., *Lactobacillus farciminis une bactérie produisant du monoxyde d'azote dans le tube digestif : mise en évidence de potentialités thérapeutiques*. Thèse de Doctorat, École doctorale : S.E.V.A.B, Spécialité : Sciences agronomiques, Institut National Polytechnique de Toulouse, p. 110, (2004).
- Laranjo M., Potes M.E., Elias M., *Role of starter culture on the safety of fermented meat products*. Frontiers in Microbiology, 10, 1-11, (2019).
- Laref N., Guessas B., Kihal M., *Antifungal compounds production in different temperatures, pH and on modified MRS agar by lactobacillus strains*, Journal of Biological Sciences, 13 (2), 94–99, (2013a).
- Laref N., Guessas B., *Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria*. Innovative Romanian of Food Biotechnology, 13, 80–88, (2013b).
- Laref N., *L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'Aspergillus sp.* Thèse doctorat de 3ème cycle LMD, Spécialité : Contrôle microbiologique et hygiène alimentaire, Université d'Oran, p. 62, (2014).
- Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J., *Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus Penicillium*. Applied and Environmental Microbiology, 67, 3630-3635, (2001).
- Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M., *Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough lactobacillus plantarum strain 21b*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4084–4090, (2000).
- Larvermicocca P., Valerio F., Visconti A. *Antifungal activity of phenyl lactic acid against Molds Isolated from Bakery Products*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 634-640, (2003).
- Le-Bars J., *Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes, dans Conservation et Stockage des grains et graines, et produits dérivés*. Technique et Documentation Lavoisier, Multon J.L. Editor, Paris, France, 376 – 391, (1988).
- Le Lay C., Mounier J., Vasseur V., Weill A., Le Blay G., Barbier G., Coton E., *In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds*. Food control, 60, 247–255, (2016).
- Lefeber T., Janssens M., Camu N., De Vuyst L., *Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation*. Applied and Environmental Microbiology, 76 (23), 7708–7716, (2010).

Lefeber T., Papalexandratou Z., Gobert W., Camu N., De Vuyst L., *On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof*. Food Microbiology, (30), 379-392, (2012).

Louis E., Grivetti, Howard-yana, Shapiro, *Chocolate: History, Culture, and Heritage*. John Wiley and Sons, p. 975, (2009).

## M

Magan N., Hope R., Cairns V., Aldred D., *Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain*. European Journal of Plant Pathology, 109, 723-730, (2003).

Magliani W., Conti S., Gerloni M., *Yeast killer systems*. Clinical Microbiology Reviews, 10, 369-400, (1997).

Magnusson J., *Antifungal activity of lactic acid bacteria*. Ph.D. Thesis, Agraria 397, Swedish University of agricultural sciences, Uppsala, Sweden, Doctor's dissertation, ISSN 1401-6249, p.43, (2003).

Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J. *Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 219, 129-135, (2003).

Makhloufi K.M., *Caracterisation d'une bacteriocine produite par une bactérie lactique leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza*. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Spécialité : Microbiologie, Biochimie, p.229, (2012).

Manda P., Dano D.S., Kouadio J.H., Diakite A., Sangare-Tigori B., Ezoulin M.J.M., Soumahoro A., Dembele A., Fourny G. *Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans*. Food addition Contaminant, 26, 1081–1088, (2009).

Manero A., Blanch A., *Identification of enterococcus spp. with a biochemical key*. Applied and environmental Microbiology, 65, 4425–4430 (1999).

Marigo G., *Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux*. Analysis, 2, 106-110, (1973).

Masoud W., Kaltoft C., *The effects of yeasts involved in the fermentation of coffea arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by Aspergillus ochraceus*. International Journal of Food Microbiology, 106, 229-234, (2006).

Matei A., Cornea C.P., *Evaluation of antifungal activity of selected lactic acid bacteria strains against spoilage mould Penicillium expansum*. Scientific bulletin, Series food Biotechnology, 19, 292-297, (2015).

Mbuk E.U., Kwaga J.K.P., Bale J.O.O., Umoh J.U., *Molecular identification of Yeasts associated with raw cow milk from peri-urban farms in Kaduna state, Nigeria*. Journal of Yeast and Fungal Research, 7, 39-46, (2016).

- Mehrez A., *Effets du radio-traitement par les rayonnements gamma sur la décontamination et la cytotoxicité d'une mycotoxine : l'ochratoxine A*. Mémoire de master en sciences de l'environnement. Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7 novembre p. 145, (2008).
- Méndez, Agueda M., *Una relación conflictiva: la inquisición novohispana y el chocolate*, Cahiers du monde hispanique et luso-brésilien, 7, 9- 21, (1998).
- Michalcakova S., Sulo P., Slavikova E., *Killer yeasts of Kluyveromyces and Hansenula genera with potential application in fermentation and therapy*. Acta Biotechnologica, 13(4), 341- 350, (1993).
- Mikani A., Alizadeh A., Etebarian H. R., Sholberg P. L., O'Gorman D.T., Stokes S., *Biological control of apple gray mold caused by Botrytis mali with Pseudomonas fluorescens strains*. Postharvest Biology and Technology, 48(1), 107-112, (2008).
- Misnawi, Jinab S., Nazamid S., Jamilah B. *Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation*. Food Chemistry, 78, 407–417, (2002).
- Miyazawa M., Shimabayashi H., Hayashi S., Hashimoto S., Nakamura S., Kosaka H., Kameoko H., *Synthesis and biological activity of alpha-methylene-gamma-lactones as new aroma chemicals*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 5406-5410, (2000).
- Moreira I., Pedrozo M., Duarte W., Dias D., Schwan R., *Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids*. Food Research International, 54, 9–17, (2013).
- Moreira I.M.V., De Vilela L., Pedroso C.M., Santos C., *Impact of a Microbial Cocktail used as a starter culture on Cocoa fermentation and chocolate flavor*. Molecules, 22(5), 766-771, (2017).
- Mounjouenpou P., *Aspergillus noirs producteurs d'ochratoxine A dans le cacao : Biodiversité et Incidence des traitements post-récolte au Cameroun*. Thèse de Doctorat Ph. D, 146-163, (2008).
- Muhalidin B.J., Zaiton H., Sajaa K., Sadon N., Aqilah Z.A., Azfar A., *Effect of pH and heat treatment on antifungal activity of Lactobacillus fermentum Te007, Lactobacillus pentosus G004 and Pediococcus pentosaceus Te010*. Innovative Romanian Food Biotechnology, 8, 41-53, (2011).
- Muhalidin B.J., Hassan Z., Bakar F.A., Saari N.M., *Identification of antifungal peptides produced by Lactobacillus plantarum IS10 grown in the MRS broth*. Food Control, 59, 27-30, (2016).

## N

- Ndagano D., Lamoureux T., Dortu C., Vandermoten C., Thonart P., *Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of Weissella genus isolated from food*. Journal Of food science, 76, 305-311, (2011).

- Nesci A.V., Bluma R.V., Etcheverry M.G., *In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of Aspergillus section Flavi and aflatoxin production*. European Journal of Plant Pathology, 113, 159-171, (2005).
- Nestlé, *Les mondes du cacao*. Salon international de l'agriculture, février- mars 1999 Paris – Portes de Versailles, p.15, (1999).
- Nielsen P. V., De Boer E., *Food preservatives against fungi*. In Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C, Filtenborg O. (Eds.), *Introduction to food-and airborne fungi*, 357–363, (2000).
- Nielsen D.S., Hønholt S., Tano-Debrah K., Jespersen L., *Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*. Yeast, 22, 271–284, (2005).
- Nielsen D.S., Teniola O.D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T., Holzapfel W.H., *The microbiology of ghanaiian cocoa fermentations analyzed using culture dependent and culture independent methods*. International journal of food microbiology, 114, 168–186, (2007).
- Niku P.M.L., Laitila A., Mattila S.T., Haikara., *New types of antimicrobial compounds produced by Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology, 86, 29-35, (1999).
- Nkoudou Z.N., Essia N.J.J., *Cyanides reduction and pasting properties of cassava (Manihot Esculenta Crantz) flour as affected by fermentation*. Food and Nutrition Sciences, 8, 326-333, (2017).

## O

---

- Olsen M., Jonsson N., Magan N., Banks J. *Prevention of Ochratoxin A in Cereals* . Advances in Experimental Medicine and Biology, 571, 317-342, (2006).
- Ouattara H.G., Ban-Koffi L., Karou G.T., Sangare A., Niamke S.L., Diopoh J.K., *Implication of bacillus sp. In the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 1753-1760, (2008).
- Ouattara H.G., Goualie B.G., Kouame L.M., Niamke S.L., *Biochemical and functional properties of lactic acid bacteria isolated from Ivorian cocoa fermenting beans*. Journal of Applied Biosciences, 77, 6489– 6499, (2014).
- Ouattara D.H., Ouattara H.G., Drouxb M., Reverchonb S., Nasserb W., Niamkea S.L. *Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production*. International Journal of Food Microbiology, 256, 11-19, (2017).

## P

---

- Palumbo J.D., Baker J.L., Mahoney N. E., *Isolation of bacterial antagonists of Aspergillus flavus from almonds*. Microbiological Ecology, 52, 45-52, (2006).

- Park D.L., Njapau h., Boutrif E., *Minimising risks posed by mycotoxins utilising the HACCP concepts*. Food Nutrition and Agriculture 22, 49-56, (1998).
- Papalexandratou Z., Vrancken G., De Bruyne Katrien, Vandamme P., De vuyst L, *Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria*. Food microbiology, 28, 1326-1338, (2011).
- Papalexandratou Z., Lefeber T., Bahrim B., Lee O.S., Heide-Marie D., De Vuyst L., *Hanseniaspora opuntiae, Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus fermentum, and Acetobacter pasteurianus predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process*. Food Microbiology, 35(2), 73-85, (2013).
- Pereira E., Santos A., Reis F., Tavares R.M., Baptista P., Lino-Neto T., Almeida-Aguiar C., *A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi*. Microbiological research, 168 (1), 1–5, (2013).
- Pareira G.V.M., Soccol V.T., Brar S.K., Neto E., Soccol C.R., *Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 13, 2775-2788, (2017).
- Pfohl-Leszkowicz A., Castegnaro M., *L'ochratoxine A. In: les Mycotoxines dans l'alimentation: évolution et gestion des risques*. Pfohl-Leszkowicz A., Editor Lavoisier: Paris, France, 249 – 277, (1999).
- Pitt J.I., Basílico J.C., Abarca M.L., Lopez C., *Mycotoxins and toxinogenic fungi*. Medical Mycology, 38, 41-46, (2000).
- Pitt J.I, Hocking A.D., *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professionnal, 2nd edition, London, 431-501, (1997).
- Polonelli L., Conti S., Gerloni M., Magliani W., Chezzi C., Morace G., *Interfaces of the yeast killer phenomenon*. Critical Reviews in Microbiology, 18, 47-87, (1991).
- Pontillon J., *Cacao et chocolat : production, utilisation et caractéristiques*. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Editions Lavoisier, p.638, (1997).
- Prabhakaran N., *L'agronomie et l'économie des grandes cultures arboricoles du monde en développement*. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64818-8>, (2010).
- Prakash H., Bittenbender H., O'doherty D., *Farm and forestry production and marketing profile for cacao (Theobroma cacao)*, Craig Elevir, Specialty Crops for pacific Island Agroforestry, <https://www.agroforestry.net/scps>, (2011).

---

## Q

- Quillien J.F., *Les mycotoxines*. Institut National de Recherche Agronomique de France, p.24, (2002).

---

## R

- Ritchie L.E., Burke K.F., Garcia-Mazcorro J.F., Steiner J.M., Suchodolski J.S.. *Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for Lactobacillus and Bifidobacterium spp.* Veterinary Microbiology 144, 140–146, (2010).
- Ringot D., Chango A., Schneider Y.J., Larondelle Y., *Toxicokinetics and toxicodynamics of ocgratoxin A, an Update.* Chemical Biology interaction, 159(1), 18-46, (2006).
- Ryan L.A.M., Zannini E., Bello F.D., Pawlowska A., Koehler P., Arendt E.K., *Lactobacillus amylovorus DSM19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products.* International Journal of Food Microbiology, 146(3), 276-283, (2011).

## S

---

- Sahoré D.A., Ban-Koffi L., Abouattier L., Nemlin G.J., *Some cocoa beans posts-harvests treatments.* Journal of global biosciences, 2(6), 236–240, (2013).
- Saitou N., Nei M., *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.* Molecular Biology and Evolution, 4, 406-425, (1987).
- Salas M., Mounier J., Valence F., Coton M., Coton A. *Antifungal microbial agents for food biopreservation—A Review.* Microorganisms, 5(3), 5-37, (2017).
- Samson R.A. *Identification of food –borne Penicillium, Aspergillus and Fusarium species.* ACIAR, 36, 39-45, (1991).
- Sandoval A.J., Barreiro J.A., *Water sorption isotherms of non fermented cocoa beans (Theobroma cacao).* Journal of Food Engineering, 51, 119-123, (2002).
- Sathe S.J., Nawani N.N., Dhakephalkar P.K., Kapadnis B.P., *Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables.* Journal of Applied Microbiology, 103, 2622–2628, (2007).
- Schmitt M.J., Reiter J., *Viral induced yeast apoptosis: Review,* Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1783(7), 1413-1417, (2008).
- Schnurer J., Magnusson J., *Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives: Review.* Trends in Food Science and Technology, 16, 70–78, (2005).
- Schwan R.F., Rose A.H., Board R.G., *Microbial fermentation of cocoa beans , with emphasis on enzymatic degradation of the pulp.* Journal of Applied Bacteriology-Symposium Supplement, 79, 965-1075, (1995).
- Schwan R.F., *Cocoa fermentation conducted with defined microbial cocktail inoculum.* Applied and Environmental Microbiology, 64, 1477–1483, (1998).
- Schwan R.F., *Microbiology of cocoa fermentation: a study to improve quality.* In proceeding of the 12<sup>th</sup> International Cocoa- Research Conference, Salvador, Bihar, November, cocoa producer’s Alliance , Lagos, Nigeria, (1996).

- Schwan R.F., wheals A.E., *The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality fermentation and its role in chocolate quality*. Critical reviews in food science and nutrition, 44, 1–17, (2004).
- Schwan R.F., Fleet G.H., *Cocoa and Coffee fermentations*. Taylor et Francis group, 1<sup>st</sup> edition, p.633, (2014).
- Sharma P., Maherchandania S., Shringia B.N., Kashyapa S.K., Sundar K.S.G., *Temporal variations in patterns of escherichia coli strain diversity and antimicrobial resistance in the migrant egyptian Culture*. Infection Ecology and epidemiology, 8(1), 1-11, (2018).
- Silva M., Lidon f., *Food preservatives—an overview on applications and side effects*. Emirates Journal of Food and Agriculture, 28 (6), 366-373, (2016).
- Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer J., Kenne L., *Antifungal 3- hydroxy fatty acids from lactobacillus plantarum milab 14*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 7554-7557, (2003).
- Slizewska K., Chlebicz-Wójcik A., *Growth kinetics of probiotic Lactobacillus strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium*. Biology, 423 (9), 1-13; (2020).
- Smid E.J., Erkus O., Spus M., Alexeeva S., Kleerebezem M., *Functional implication of the microbial community structure of undefined mesophilic starter culture*. Microbial Cell Factories, 13, 1-9, (2014).
- Statista, *Leading importers of Cocoa beans worldwide in 2020*. By Shahbandeh M. du 3 Juin 2021, <https://www.statista.com>.
- Stiles M.E, Holzapfel W.H., *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*, International Journal of Food Microbiology, 36 (1), 1-29, (1997).
- Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J., *Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and phenylacetic acid*. Applied Environmental Microbiology, 68, 4322-4327, (2002).
- Ström K., Schnürer J., Melin P., *Co-cultivation of antifungal Lactobacillus plantarum MiLAB 393 and Aspergillus nidulans, evaluation of effects on fungal growth and protein expression*. Federation of European Microbioloy Society, 246 (1), 119–124, (2005).
- Sule S.-E., Seda K.-Y., Yesim O.Z., *Molecular identification of some Yeast strains isolated from various sugary foods*. Annals of Microbiology, 62, 1501-1516, (2012).
- Sulistyo J., Cahyaningsih H.O.E., Sri B., Jenny L., *Application of lactic acid bacteria to control microbial contaminants during fermentation of*. International Journal of Research in Agriculture and Food Sciences, 2 (5), 16–24, (2014).

## T

- 
- Tabuc C. *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines*. Thèse de Doctorat : Toulouse-France, p.190, (2007).

- Tamura K., Nei M., Kumar S. *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. Proceeding of national academy of sciences 101, 11030-11035, (2004).
- Tankou C.M, *The Cameroon cocoa story*. Faculty of Agronomy and agricultural sciences. Glogal Report, p. 47, (2016).
- Tatsadjieu L.N., Tchikoua R., Moses C.F.M., *Antifungal activity of lactic acid bacteria against molds isolated from corn and fermented corn paste*. American Journal of Microbiology Research. 4, 90-100, (2016).
- Tareb R., Bernardeau M., Horvath P., Vernoux J-P., *Rough and smooth morphotypes isolated from Lactobacillus farciminis CNCM I-3699 are two closely-related variants*. International Journal of Food Microbiology, 193, 82-90, (2015).
- Thompson S.S., Miller K.B., Lopez A.S., *Cocoa and coffee*. Food microbiology fundamentals and frontier, 721–736, (2001).
- Trček J., Barja F., *Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16s–23s rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by maldi-tof mass spectrometry*. International Journal of Food Microbiology, 44, 137–196, (2015).
- Tsuda H., Kubota K., Matsumoto T., Ishimi Y. *Isolation and identification of lactic acid bacteria in traditional fermented sushi funazushi, from japan*. Food science And Technological Research, 18, 77 – 82, (2012).
- Tusseau D., Benoit C., *F.V. O.I.V.*, 1986, N°s 800 et 813; Journal of Chromatography. 395, 323-333, (1987).
- Tzu-Hsing L., Tzu-Ming P., *Characterization of an antimicrobial substance produced by lactobacillus plantarum NTU 102*. Journal of microbiology, Immunology and infectiology, 52, 409-417, (2019).

## U

---

## V

---

- Valerio P., Leite F., Marivalda M., Pereira, Alfredo M., *The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production*. Biomaterials, 25, 2941–2948, (2004).
- Venturini M.E., Blanco D., Oria, R., *In vitro antifungal activity of several compounds against Penicillium expansum*. Journal of Food Protection, 65, 934–939, (2002).
- Visintin S., Alessandria V., Valente A., Dolci P., Cocolin L., *Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa*. International Journal of Food Microbiology. 216, 69-78, (2016).

Visintin S., Ramos C.L., Batista N.N., Dolci P., Schwan R.F., Cocolin L., *Impact of Saccharomyces cerevisiae and Torulaspora delbrueckii starter cultures on cocoa beans fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 257, 31-40, (2017).

---

## W

Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W., *Production and characterization of antifungal compounds produced by Lactobacillus plantarum IMAU10014*. PLoS ONE, 7(1), 1-7, (2012).

WCF (World cocoa foundation), Compiled by the world cocoa foundation from published reports and resources, p.6, (2010).

Wickner R.B. *Double-stranded RNA replication in yeast: the killer system*. Annual Review of Biochemistry, 55, 373-395, (1986).

Wickner R.B., *Double-stranded RNA viruses of Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Review, 60, 250-265, (1996).

Wilson C.L., Wisniewski M.E., *Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: an emerging technology*. Annual Review of Phytopathology, 27, 425-441, (1989).

---

## X

Xinhua., CAMEROUN: ECONOMIE, Cameroun - Cacao: le marché camerounais dominé par trois multinationales. w.w.w.camer.be. (30 MAI 2011).

---

## Y

Yang E.J.; Chang H.C. *Purification of a new antifungal compound produced by lactobacillus plantarum afl isolated from Kimchi*. International Journal of Food microbiology, 139, 56-63, (2010).

Yang E.J., Kim Y.S., *Purification and characterization of antifungal d- dodecalactone from Latobacullus plantarum AF1 isolated from Kimchi*, Journal of Food protection, 74 (4), 651-657, (2011).

Yao K.M., Kambiré O., Kouassi K.C., Koffi-Névry R., Guéhi T.S., *Risk prevention of fungal contamination of raw cocoa beans in Cote d' Ivoire: Case of polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMGH)*. Food and public health, 7 (2), 40-50, (2017).

Yimin C., Sumio K., Masuhiro O., Voshimi B., Takashi N., *Characterization and identification of pediococcus species isolated from forage crops and their application for silage preparation*. Applied and Environment Microbiology, 65, 2901-2906, (1999).

---

## Z

Zacharof M.P., Lovitt R.W., *Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article*. Apcbee Procedia, 2, 50-56, (2012).

Zahouli G.I.B., Guehi S.T., Fae A.M., Nemlin J.G., *Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material*. Advanced Journal of Food sciences and Technology, 2 (4), 184–190, (2010).

Zainal B., Abdah M.D., Taufiq Y., Roslida A.H. and Rosmin K., *Theobroma cacao: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds*. Tropical life sciences research, 27(1), 21–42, (2016).



ANNEXES

## ANNEXES

### Annexe 1 : Quelques matériels utilisés

#### ❖ Milieux de culture

Plusieurs milieux de cultures dont les compositions se trouvent en **Annexe 1** ont été utilisés dans le cadre de ce travail, parmi lesquelles :

- La gélose De Man, Rogosa and Sharpe (MRS Gelose, DIFCO 882, USA) pour l'isolement, le dénombrement des bactéries lactiques (BL) ;
- Le bouillon MRS (MRS broth, LF610025, Italie) pour la revivification et l'étude des mécanismes d'action des bactéries lactiques ;
- La gélose PDA (Potato Dextrose Agar, CM0139, Oxoid, UK) pour la culture, la revivification et le dénombrement des moisissures,
- La gélose Sabouraud au chloramphénicol (Sabouraud Dextrose Agar, Titan Biotech, TM 387, Inde) pour l'isolement des levures et le bouillon Sabouraud pour leur revivification ;
- Du milieu de Kliger reconstitué pour le test biochimique.

#### ❖ Réactifs

Les réactifs utilisés dans le cadre de ce travail ont principalement été les suivants :

- Les inhibiteurs de croissance fongique (Fluconazole) et bactérien (Chloramphénicol) acheté en pharmacie ;
- Les réactifs de PCR à savoir : EMQ (Eau ultra pur pour PCR), 10X DreamTaq Green Buffer (Tampon vert, 20 mM), MgCl<sub>2</sub>, dNTP (10 mM), les amorces pour bactéries lactiques (LacF et LacR), les amorces pour souches fongiques (ITS1 et ITS4) et Taq polymérase (Promega Corp, USA) ;
- Le kit d'extraction d'ADN bactérien « QIAamp cador Pathogen kit » (Qiagen, Allemagne), et le Kit d'extraction d'ADN fongique « E.N.Z.A Fungal DNA kit » (Omega Bio-Tek, USA) ;
- Les enzymes de restriction (*Hha*I, *Hinf*I, *Hae*III et *Dde*I) de chez Fermentas (France);
- Le Kit de dosage d'Ochratoxine A (LSY-10034 Ochratoxin A ELISA Test Kit, Shenzhen Lvshiyuan Biotechnhology Co., Ltd., Chine) ;
- Du glycérol 87% GE Healthcare (Sigma-Aldrich, GE17-1325-01 St. Louis, MO, USA);

- Des sucres : glucose, Fructose, Maltose, Lactose, Sucrose, Galactose (D-)Arabinose, (L-) Rhamnose, (D+) Raffinose, Inositol, Amidon, Cellobiose, Glycerol, Melibiose, Mannitol, Ribose, Xylose, Trehalose et Esculin (Sigma Aldrich, USA) ;
- Les acides chloridrique (pureté 35-38%), citrique (pureté  $\geq 99,5\%$ ), acétique (99%), lactique (99%), gluconique (99%), phenyllactique (99%), butanoïque (98%), octanoïque (99%), carbonique (99%), pentanoïque (98%), decanoïque (98%) provenaient de Merck (Allemagne), les acides gallique et ascorbique de Sigma-Aldrich, USA) ;
- L'eau oxygénée (Prolabo, France) ;
- Les réactifs de Gram (violet de Gentiane, Lugol, Safranine), le bleu de méthylène ; le rouge methyl, la liqueur de Fehling (Merck, Darmstadt, Allemagne).

#### ❖ Equipements

Les équipements ci-dessous cités ont été utilisés pour mener à bien ce travail :

- pH mètre (Consort C535 pH meter, Consort , Turnhout, Belgique) ;
- Spectrophotomètre JENWAY7305 UV-Visible (Royaume uni) ;
- Bain-marie thermostable HH. S21-6 (Chine) ;
- Thermomètre électronique PCE-T395 Data logger (Taiwan) ;
- Centrifugeuse LSE<sup>TM</sup>Series (USA) ;
- Thermocycleur Multigene (MyCycler thermal cycler, BIO RAD, Hercules, USA);
- Balance de marque SHIMADZU 98545 ;
- Hotte à Flux laminaire BioAir Series euroclone (Italie) ;
- Autoclave CFS-V Series (USA);
- Dispositif d'électrophorèse ThermoFisher (USA);
- Incubateurs de marque ZHUJIANG LRH – 250-G (Chine);
- Microscope optique XS – 18, 993675 201 ;
- Cellule de comptage de Malassez (marque KARL HECHT),
- Dispositif de filtration membranaire ;
- Membranes filtrantes de 0,45 micromètre de diamètre de pores (marque AHLSTROM ReliaPrep<sup>TM</sup>).

A ceux-ci ont été ajoutés le matériel de collecte et de transport du matériel végétal (machettes, cuvettes, glacières), et un pied à coulisse pour la mesure des diamètres d'inhibition.

❖ **Composition du Milieu POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)** Potato Dextrose Agar, CM0139, Oxoid, UK.

Extrait de pomme de terre	200g
Saccharose	15g
Agar	15g
Volume final à l'eau distillée	1l
pH	5,6

Le milieu PDB (Potato Dextrose Broth) a la même composition que le PDA mais sans ajout d'Agar.

❖ **Composition du MRS Agar** (De Man, Rogosa and Sharpe, MRS Gélose, DIFCO 882, USA) et du bouillon MRS (MRS broth, LF610025, Italie).

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Glucose	20g
Tween 80	1,08g
Phosphate de potassium	2g
Acetate de sodium	5g
Citrate de sodium	5g
Sulphate de magnésium	0,2g
Sulphate de Manganèse	0,05g
Agar	15g
Volume final à l'eau distillée	1l
pH	6,8

Le milieu MRS Broth a la même composition que le MRS Agar mais sans ajout d'Agar.

❖ **Composition du Milieu de KILGER.**

Peptone	15g
Extrait de levure	3g
Extrait de viande	3g
Glucose	1g
Lactose	10g
Rouge phenol	25mg
Chlorure de Sodium	5g
Sulphate ferreux	0.2g
Thiosulphate de sodium	0.3g
Agar	11g
Volume final à l'eau distillée	1l
pH	7,5

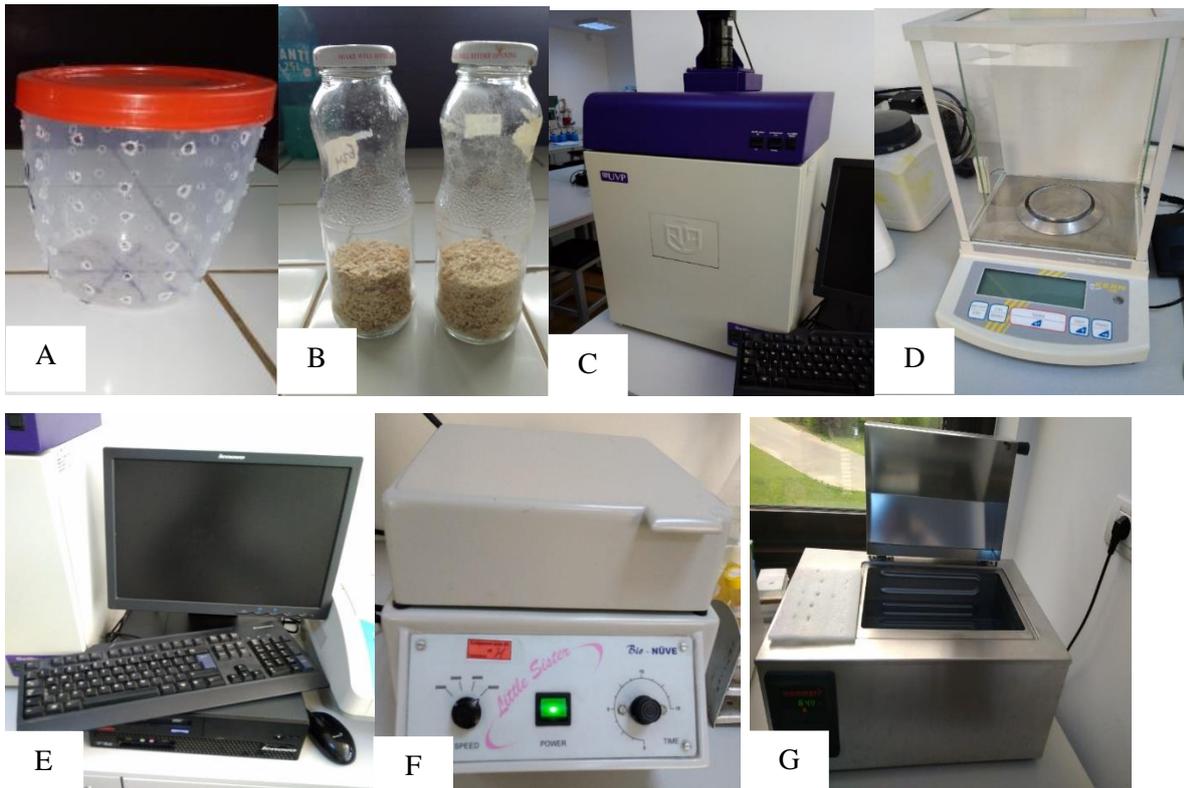
❖ **SABOURAUD DEXTROSE AGAR (CM0041) Titan Biotech, TM 387, Inde.**

Peptone	10g
Glucose	40g
Agar	15g
Volume final à l'eau distillée	1l
pH	5,6

❖ **Composition du Milieu de base de caractérisation biochimique des BL.**

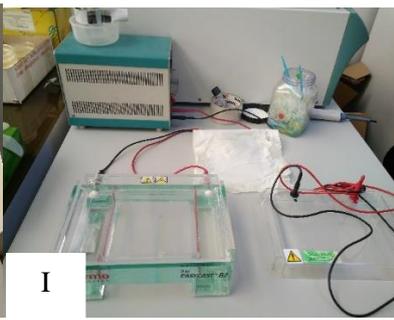
Peptone	10g
NaCl	5g
Rouge Phénol	0.18g
Source d'hydrate de carbone	10g
Volume final à l'eau distillée	1l
pH	6,5

- ❖ (A) Bocaux plastiques utilisés pour les fermentations au laboratoire, (B) Farine de ferment, (C) Révélateur UV, (D) Balance électronique, (E) Ordinateur pour lecture des révélations, (F) Centrifugeuse, (G) Bain Marie, (H) Thermocycleur, (I) Dispositif d'électrophorèse, (J) Préparation pour séquençage, (K) Lyophilisateur, (L) Surnageant de BL lyophilisé, (M) Boîte du Kit d'extraction d'ADN, (N) Réactifs du Kit d'extraction d'ADN bactérien, (O) Enzymes de restriction, (P) Minispectrophotomètre, (Q) solutions standards d'OTA.

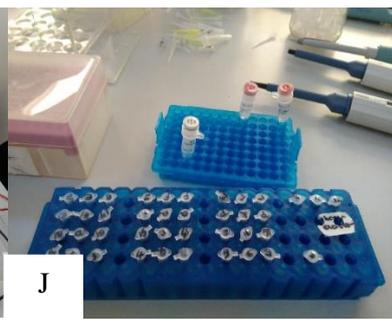




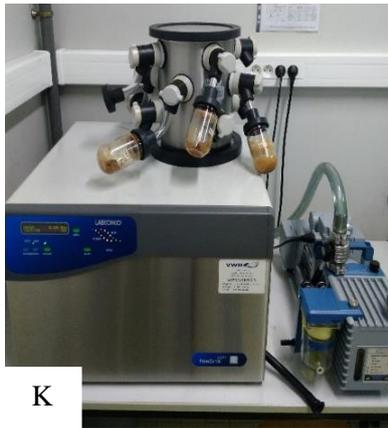
H



I



J



K



L



M



N



O



P



Q

### ❖ Coloration de Gram

Elle se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à :

1. Fixer le frottis à la flamme ;
2. Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet. Laisser agir une minute ;
3. Rejeter le colorant. Laver à l'eau ;

4. Recouvrir la préparation de Lugol. Laisser agir une minute ;
5. Rejeter le lugol et laver à l'eau ;
6. Décolorer à l'alcool 95° ;
7. Rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de la solution de Fuchsine diluée. Laisser agir quelques secondes ;
8. Rejeter la fuchsine et laver abondamment, égoutter, sécher.

Résultats : Après observation au microscope optique avec de l'huile à immersion (Objectif \* 100), les bactéries gram positif sont colorées en violet et les bactéries gram négatif franchement colorées en rose.



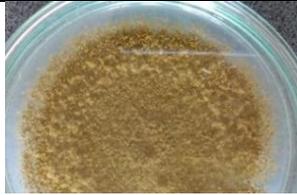
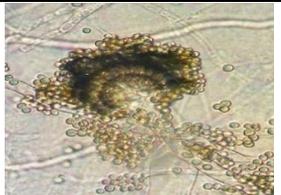
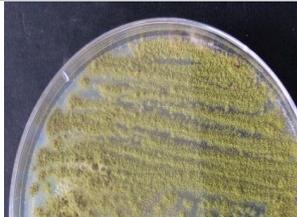
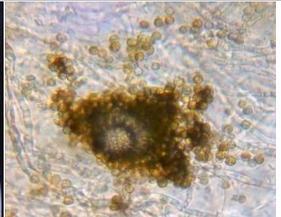
Aspect de *L. farciminis* Lab11.1 à l'issue de la coloration de Gram

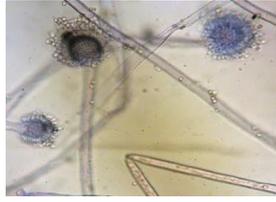
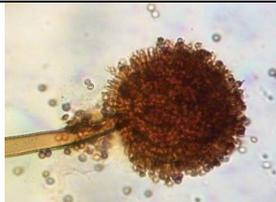
❖ **Mise en évidence de la catalase:**

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme. En effet, pendant la respiration aérobie, les microorganismes produisent du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). L'accumulation de ce composé entraîne la destruction de la bactérie. Pour se protéger, la bactérie dégrade ce peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène à l'aide de certaines enzymes parmi lesquelles la catalase.

## Annexe 2: Moisissures cibles utilisées dans les tests d'antagonisme.

(*Aspergillus carbonarius* NRRL 368 (codé AC) et *Aspergillus niger* NRRL 612 (codé AN) offertes par l'ARS Culture Collection - BFPM Research Unit National Center for Agricultural Utilization Research (USA), *Aspergillus flavus* codé AF, *Aspergillus fumigatus* M11, *Aspergillus oryzae* M13, *Aspergillus versicolor* M14, *Aspergillus tamarisii* M21, *Aspergillus versicolor* M22, *Penicillium citrinum* M7 et *Penicillium citrinum* M8).

Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Couleurs revers boîte de Petri	Aspect mycélium	Croissance	Aspect	Nom du genre ou de l'espèce
		Jaune	Vert olive	Moyenne	Poudreux	<i>Aspergillus fumigatus</i> M11
		Jaune	Noir	Rapide	Poudreux	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 612
		Blanc	Gris	Lente	Lisse	<i>Penicillium citrinum</i> M7
		Blanc	Gris	Lente	Lisse	<i>Penicillium citrinum</i> M8
		Marron	Marron	Rapide	Poudreux	<i>Aspergillus oryzae</i> M13
		Vert	Vert	Rapide	Poudreux	<i>Aspergillus versicolor</i> M14

		Vert	Vert	Rapide	Poudreux	<i>Aspergillus tamarii</i> M21
		Vert	Vert	Rapide	Poudreux	<i>Aspergillus versicolor</i> M22
		Marron	Marron	Rapide	Poudreux	<i>Aspergillus flavus</i> AF
		Blanc	Noir	Rapide	Poudreux	<i>Aspergillus carbonarius</i> NRRL 368

### Annexe 3: Protocole d'extraction des ADN et Protocoles des mélanges réactionnels PCR

❖ **Instructions du fabricant du kit d'extraction de l'ADN des bactéries *QIAamp cador Pathogen kit* (Qiagen, Allemagne).**

- Pipetter 20 µl de la protéinase K à mettre dans un tube à centrifuger ;
- Ajouter 200 µl de l'échantillon (Culot cellulaire) ;
- Ajouter 100 µl de Tampon VXL et vortexer ;
- Incuber à 20-25°C pendant 15minutes ;
- Centrifuger à 800 rpm pour retirer les dépôts sur le couvercle du tube ;
- Ajouter 350 µl de Tampon ACB et vortexer
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute pour retirer les dépôts sur le couvercle du tube ;
- Transférer le lysat dans la colonne du kit préalablement placé dans un tube de collecte de 2 ml. Fermer, centrifuger à 8000 rpm pendant 1minute. Transférer la colonne du kit dans un nouveau tube de collecte et jeter le filtrat ;

- Ajouter 600 µl de Tampon AW1 et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Transferer la colonne du kit dans un nouveau tube de collecte et jeter le filtrat ;
  - Ajouter 600 µl de Tampon AW2 et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Transferer la colonne du kit dans un nouveau tube de collecte et jeter le filtrat ;
  - Centrifuger la colonne à 14000 rpm pendant 2 minutes;
  - Placer la colonne du kit dans un eppendorf de 1,5 ml. Rejeter le liquide précédent. Ajouter 50-150 µl de Tampon d'éluion au centre de la membrane. Fermer, incubé pendant 1 minute à température ;
  - Centrifuger à 14000rpm pendant 1 minute pour récolter l'ADN et le conserver à -4°C pour les analyses ultérieurs.
- ❖ **Instructions du fabricant du kit d'extraction d'ADN fongique E.N.Z.A (Omega Bio-Tek, USA):**
- Transferer 100 mg d'échantillon (culot cellulaire congelé) dans un tube de 2ml
  - Ajouter immédiatement 500 µl de Tampon CSPL et vortexer, ajouter 10µl de β-mercaptoéthanol et vortexer ;
  - Incuber au bain marie à 65°C pendant 15 minutes et mixer ;
  - Ajouter 800 µl de mélange chloroforme : isoamyl alcool (24 :1) et mixer ;
  - Centrifuger à 8000 rpm pendant 5 minutes ;
  - Aspirer avec soin le surnageant (300 µl) de la phase aqueuse à introduire dans un nouveau tube de 1,5 ml sans prélever la fraction organique ;
  - Ajouter 150µl de Tampon CXD et 300 µl d'éthanol 100%, vortexer ;
  - Transferer entièrement l'échantillon dans la colonne DNA HiBind ;
  - Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute ;
  - Transferer la colonne DNA dans un nouveau tube de 2 ml, y ajouter 650 µl de Tampon de lavage d'ADN (ce tampon doit préalablement être dilué avec de l'éthanol 100% ) ;
  - Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Transferer la colonne du kit dans un nouveau tube de collecte et jeter le filtrat ;
  - Répéter les 2 étapes précédentes avec du tampon de lavage d'ADN ;
  - Centrifuger la colonne à la vitesse maximale pendant 2 minutes pour bien sécher la colonne ;
  - Transferer la colonne DNA HiBind dans un nouveau tube de 1,5 ml ;
  - Ajouter 100µl de Tampon d'éluion chauffé à 65°C pendant 5 minutes ;
  - Centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 minute ;

- Repeter les étapes (o) et (p) pour une seconde élution pour recueillir l'ADN et le conserver à -4°C pour les analyses ultérieures.

❖ **Quantités de réactifs pour un mélange réactionnel de 50 µl avec Taq polymérase (Promega)**

	<b>Ci</b>	<b>Vi</b>	<b>Cf/tube</b>
<b>EMQ</b>		28,75 µl	
<b>10X DreamTaq Green Buffer avec 20 mM MgCl<sub>2</sub> inclus</b>		5 µl	
<b>dNTP (10 mM)</b>		1 µl	0,2 mM
<b>Amorce 1</b>	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
<b>Amorce 2</b>	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
<b>Taq polymérase Promega</b>	5 U/µl	0,25 µl	0,025 U/µl
<b>ADN</b>	100-150ng/µl	10 µl	20-30 ng/µl
<b>Vf/ réaction</b>		<b>50 µl</b>	

❖ **Tableau mélange PCR de 25 µl (Concentration finale par tube 0,5 µM amorces ; 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)**

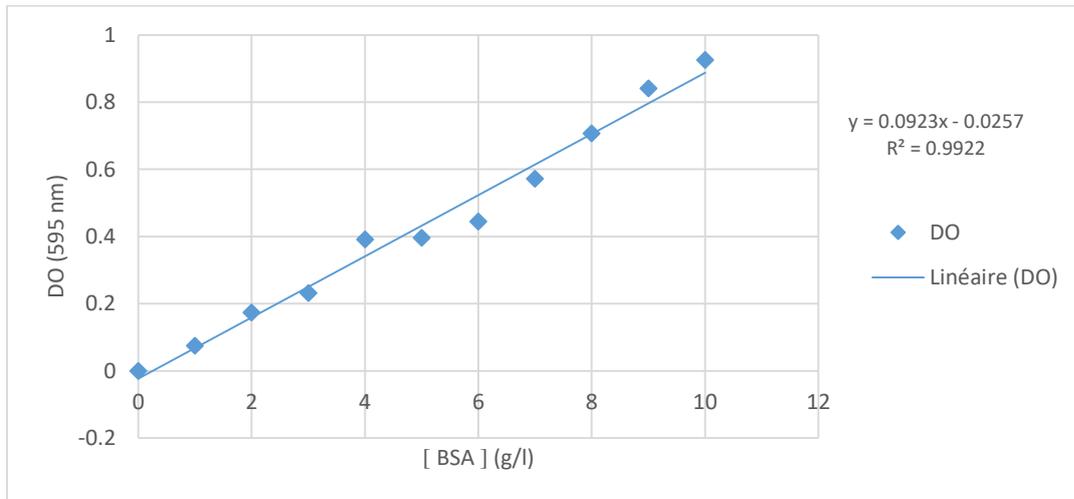
Echantillons (Nombre)	H <sub>2</sub> O pour 5 µl de matrice	Tampon 10X + MgCl <sub>2</sub> 20mM	dNTP 10mM (chaque)	Amorce 1 10 µM	Amorce 2 10 µM	DreamTaq
4	57,5	10	2	5	5	0,5
6	86,25	15	3	7,5	7,5	0,75
8	115	20	4	10	10	1
10	143,75	25	5	12,5	12,5	1,25
12	172,5	30	6	15	15	1,5
14	201,25	35	7	17,5	17,5	1,75
16	230	40	8	20	20	2

❖ **Tableau mélange PCR pour digestion par les enzymes de restriction de 18 µl (Concentration finale par tube 0,5 µM amorces ; 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)**

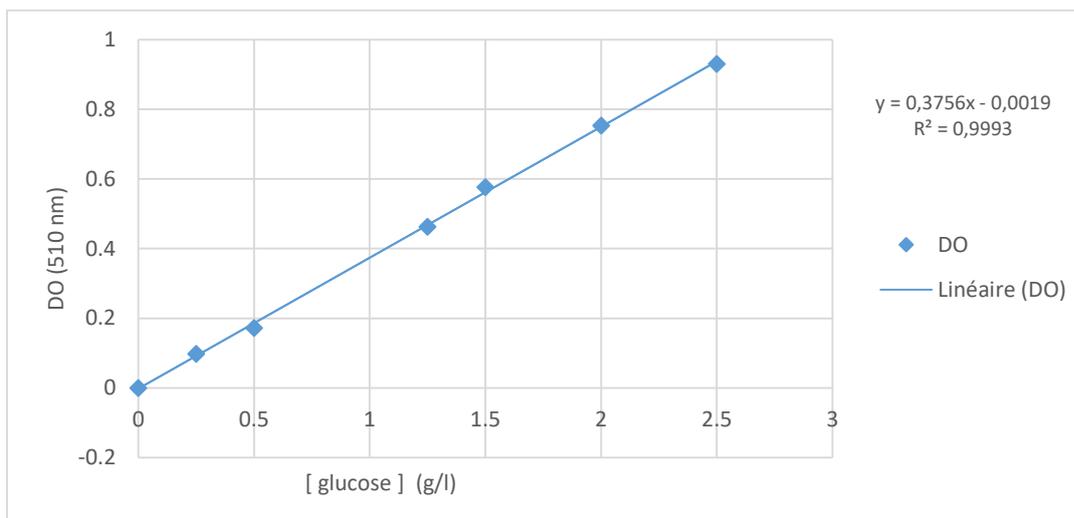
	<b>Vi</b>
<b>Produit de PCR</b>	10 µl
<b>Eau ultra pure</b>	5 µl
<b>Tampon enzymes</b>	2 µl
<b>Enzymes</b>	1 µl
<b>Vf/ réaction</b>	<b>18 µl</b>
Incuber au bain Marie 37°C pendant 2heures	

## Annexe 4: Courbes d'étalonnages.

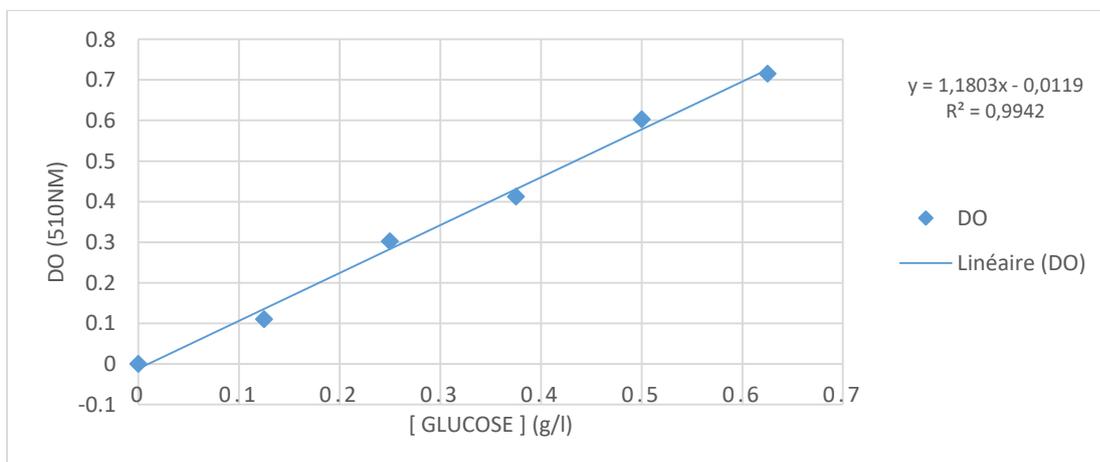
### ❖ Courbe d'étalonnage des protéines



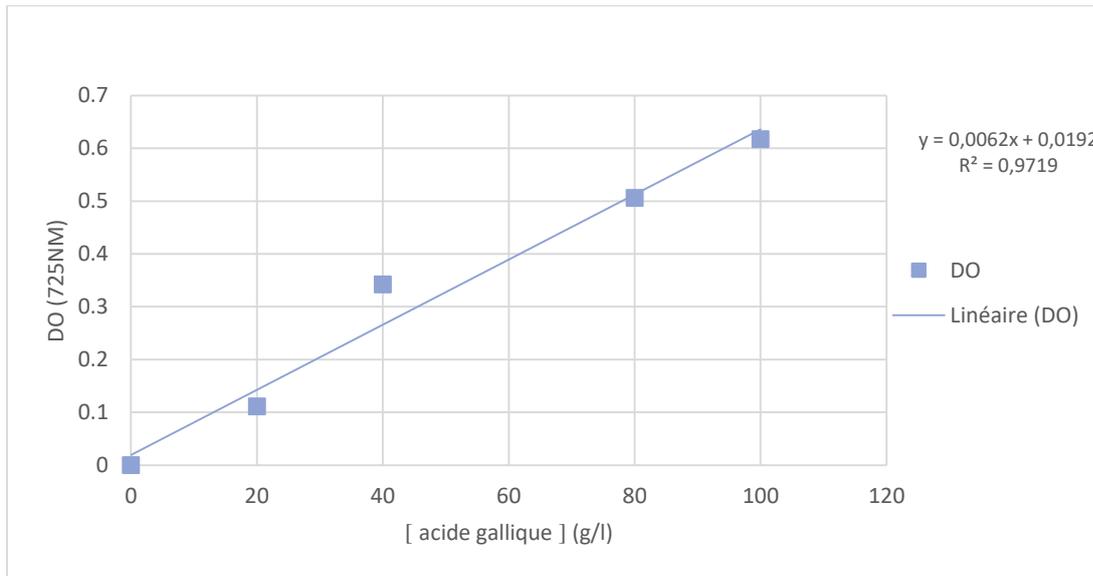
### ❖ Droite d'étalonnage du glucose



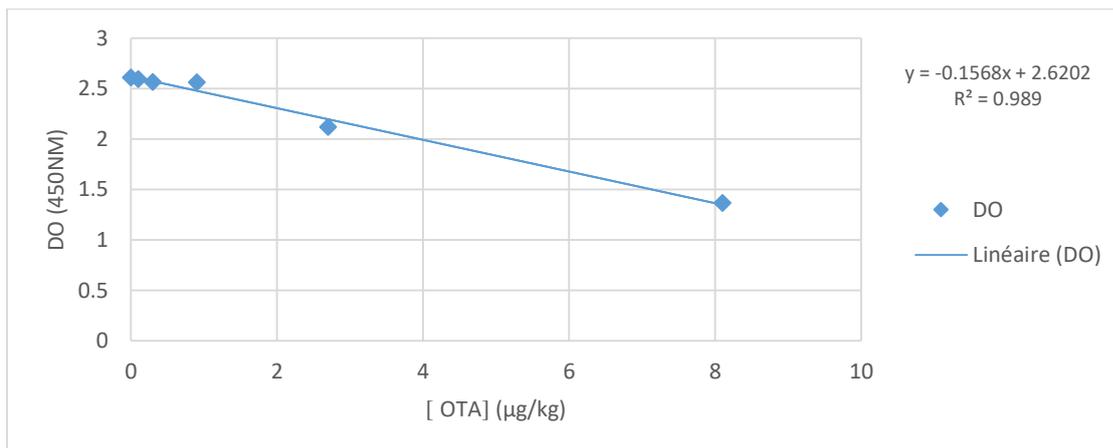
### ❖ Droite d'étalonnage des sucres totaux



### ❖ Droite d'étalonnage des polyphénols totaux



### ❖ Droite d'étalonnage de l'ochratoxine A



### ❖ Protocole ELISA pour le dosage de l'Ochratoxine A :

-Laisser le kit à 20-25°C pendant 30 minutes avant le début du test et agiter tous les réactifs avant leur utilisation ;

-Ajouter 50µl de chaque standard et de chaque échantillon dans les puits ; ajouter 50µl d'anticorps par puits, homogénéiser, couvrir à l'aide d'une membrane, incuber à 37°C pendant 30 minutes à l'obscurité ;

-Laver la microplaque en versant délicatement le liquide contenu dans les puits, ajouter 350µl de tampon de lavage, rincer 5 fois de suite en 30 secondes chacune, et couvrir de papier absorbant pour sécher ;

-Ajouter 100µl de l'enzyme conjugué par puits et mélanger lentement, couvrir et incubé à 37°C pendant 30 minutes à l'obscurité et rincer comme précédemment ;

-Ajouter 50 µl du substrat A puis 50 µl du substrat B dans chaque puits, mélanger lentement, incubé à 37°C pendant 30 minutes à l'obscurité et apprécier la coloration bleue ;

- Ajouter 50 µl de la solution stop dans chaque puits, mélanger lentement, lire la DO à 450nm.

### **Résultats**

-Calculer les concentrations des échantillons à partir de la droite d'étalonnage obtenue

-Calculer le pourcentage d'absorbance :

$$\%A = (B/B_0) * 100$$

( B : moyenne de la DO de l'échantillon ou du standard, B<sub>0</sub> : moyenne de la DO de la solution standard à 0ng/ml=100%)

Le résultat après évaluation donne la concentration en OTA en µg/ml. Cette concentration correspond à l'absorbance de chaque échantillon et peut être lu à partir de la courbe d'étalonnage.

## Annexe 5: Cinétique fermentaire des isolats de levures

### ❖ Perte de masse de CO<sub>2</sub> engendrée par les différents isolats de levures dans la recherche de l'aptitude de production d'alcool.

Temps (Heures)	Perte de masse (g)												
	0	2	4	6	8	10	12	16	20	25	30	35	40
E1	0	0	0	0	0,08	0,20	0,25	0,30	0,40	0,50	0,62	0,80	0,85
E2	0	0	0	0	0,10	0,25	0,35	0,40	0,50	0,61	0,73	0,90	0,95
E3	0	0	0	0	0,10	0,25	0,36	0,41	0,50	0,62	0,70	0,86	0,90
E4	0	0	0	0	0,20	0,30	0,40	0,50	0,55	0,60	0,65	0,82	0,90
E5	0	0	0	0	0,10	0,20	0,28	0,32	0,38	0,40	0,42	0,65	0,70
E6	0	0	0	0	0,08	0,15	0,25	0,32	0,40	0,43	0,45	0,70	0,75
E7	0	0	0	0	0,08	0,18	0,23	0,32	0,41	0,51	0,65	0,90	0,95
E8	0	0	0	0	0,07	0,15	0,22	0,30	0,38	0,43	0,50	0,92	0,98
E9	0	0	0	0	0,10	0,23	0,29	0,38	0,45	0,52	0,60	0,91	0,97
E10	0	0	0	0	0,07	0,10	0,15	0,18	0,20	0,30	0,40	0,76	0,80
E11	0	0	0	0	0,09	0,24	0,30	0,36	0,41	0,43	0,45	0,68	0,70
E12	0	0	0	0	0,15	0,28	0,34	0,41	0,50	0,60	0,70	0,85	0,90
E13	0	0	0	0	0,08	0,15	0,23	0,35	0,40	0,43	0,45	0,69	0,71
E14	0	0	0	0	0,10	0,19	0,27	0,32	0,40	0,43	0,45	0,64	0,70
E15	0	0	0	0	0,10	0,20	0,27	0,31	0,39	0,40	0,45	0,65	0,71
E16	0	0	0	0	0,20	0,28	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,85	0,90
E17	0	0	0	0	0,10	0,20	0,28	0,34	0,40	0,50	0,55	0,67	0,70
E18	0	0	0	0,05	0,08	0,17	0,26	0,34	0,40	0,50	0,60	0,80	1,00
E19	0	0	0	0	0,09	0,20	0,30	0,40	0,50	0,55	0,60	0,85	0,90
E20	0	0	0	0	0,08	0,21	0,30	0,38	0,40	0,52	0,57	0,95	1,00
<b>E21</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,27</b>	<b>0,40</b>	<b>0,60</b>	<b>0,71</b>	<b>0,80</b>	<b>0,90</b>	<b>1,10</b>	<b>1,50</b>	<b>1,50</b>
E22	0	0	0	0,10	0,20	0,35	0,40	0,45	0,50	0,60	0,70	0,95	1,00
E23	0	0	0	0	0,10	0,20	0,30	0,35	0,39	0,43	0,62	0,85	1,00
<b>E24</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,30</b>	<b>0,50</b>	<b>0,65</b>	<b>0,76</b>	<b>0,85</b>	<b>1,10</b>	<b>1,30</b>	<b>1,65</b>	<b>1,70</b>
E25	0	0	0	0	0,09	0,20	0,30	0,40	0,50	0,65	0,75	0,95	1,00
E26	0	0	0	0	0,10	0,24	0,31	0,38	0,40	0,60	0,71	0,79	0,80
E27	0	0	0	0,05	0,20	0,29	0,33	0,40	0,40	0,65	0,72	0,80	0,80
E28	0	0	0	0	0,10	0,21	0,25	0,27	0,30	0,42	0,73	0,74	0,75
E29	0	0	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,41	0,69	0,71	0,72

## Annexe 6 : Quelques étapes de la fermentation des fèves de cacao (10Kg)

(A) Cacaoyère, (B) écabossage, (C) Elimination des fèves détériorées, (D) Mélange des fèves à fermenter, (E) Mise en sac des fèves à fermenter, (F) Fermentation en Sac, (G) Fèves en cours de Fermentation, (H) Prélèvement des échantillons de fèves fermentées, (I) séchage des fèves fermentées.



- ❖ **Aspect des fèves fermentées en tas de 10kg :** (A) Contrôle naturel C, (B) Condition LL (*L. farciminis* (Lab11.1) et *S. cerevisiae* (E24)), (C) Condition LLM (*L. farciminis* (Lab11.1)-*S. cerevisiae* (E24) et *A. carbonarius*), (D) Condition M (*A. carbonarius*).



## Annexe 7: Fermentation avec les starters en tas de 25Kg en milieu rural:

(A) Plant de cacaoyer, (B) Cabosses de cacao pourries et éliminées, (C) Opération d'écabossage, (D) Mise en sac de fèves fraîches, (E) Sacs de fèves fraîches, (F) Pesée des ferments, (G) Mélange des fèves fraîches et de ferments, (H) Fermentation des fèves en tas au Jour 0, (I) Fermentation des fèves en tas au Jour 5, (J) Fermentation du Contrôle naturel C, (K) Fermentation de la condition LL, (L) Fermentation de la condition LLM, (M) Fermentation de la condition M, (N) Séchage des fèves au soleil, (O) Epreuve de cut test, (P) Cut test Contrôle Naturel C, (Q) Cut test condition LL, (R) Cut test condition LLM, (S) Cut test condition M.







**LISTE DES  
PUBLICATIONS**

## **LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE**

Ce travail de recherche a déjà conduit à la publication d'un article scientifique à savoir :

Sandrine Aimée YOUTE FANCHE, Antoine Laurent WOUAPI TCHOKONTHE, Camelia Filofteia DIGUȚĂ, Sylvain Leroy SADO KAMDEM, Florentina ISRAEL-ROMING, Florentina MATEI, Jean-Justin ESSIA NGANG. Antifungal properties of lactic acid bacteria isolated from cocoa beans fermentation in the centre region of Cameroon. *Romanian Biotechnology Letters*, 2020, 25 (2): 1407-1417, doi: 10.25083/rbl/25.2/1407.1417.

## **LISTE DES AUTRES COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE**

Ce travail a également connu les communications suivantes :

### **1- Présentations orales**

- Sandrine A. YOUTE FANCHE (2018). Le cacao : valeur nutritionnelle, microflore et risques sanitaires associés. Colloque de la Francophonie « Nutriments et contaminants des fruits et légumes au cœur d'une alimentation santé » (AUF). Université des Sciences Agronomiques et de Médecine Vétérinaire de Bucarest, Roumanie, 06/06/2018.
- 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> Regroupement du Collège doctoral régional de l'AUF « Mathématiques, Informatique, Biosciences et Géosciences de l'environnement » Mathinbio 2018, Région Afrique centrale et Grands Lacs, domaine Biosciences, Université catholique d'Afrique Centrale Campus de Nkolbisson, Yaoundé, Cameroun, du 08 au 12/10 /2018 et à l'Université Marien GOUABI, Congo-Brazzaville du 21 au 25/10 /2019.

### **2- Posters**

- D-O. BEBINE, S. YOUTE, N. NKOUDOU, A. WOUAPI et J-J ESSIA NGANG (2018). Prevision of moulds inhibition by yeast and lactic acid bacteria starter in cocoa beans fermentation. 25<sup>ème</sup> Conférence annuelle des Biosciences sous le thème « Bioscience, Knowledge valorisation and entrepreneurship ». Université de Ngaoundéré, Cameroun, 30/11/2018.
- YOUTE FANCHE Sandrine A., WOUAPI TCHOKONTHE Antoine L., DIGUȚĂ Camelia Filofteia, MATEI Florentina et ESSIA NGANG Jean-Justin (2019). Antimicrobial profile and identification of lactic bacteria isolated from cocoa beans fermentation. Symposium des doctorants de la Faculté de Biotechnologie, Université des Sciences Agronomiques et de Médecine Vétérinaire de Bucarest, Roumanie, 19/06/2019.