

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

BIOTECHNOLOGIE AGROALIMENTAIRE et BIOSECURITE ALIMENTAIRE

Option : Biosécurité Alimentaire

ALOULOUA Yves Cédric

THEME :

Année Académique

2019-2020

Numéro d'ordre :

22 /2021

**Investigation des microorganismes associés
naturellement à la fève fraîche et fermentée de cacao
(*Theobroma cacao* L.)**

Date de soutenance : Mercredi 03 Février 2021

Jury :

M. ACKAH Jacques A.B., Maître de Conférences, UJLoG, **Président**

M. KONATE Ibrahim, Maître de Conférences, UJLoG, **Directeur Scientifique**

M. ATTIEN Yao Paul, Maître-Assistant, UJLoG, **Encadreur**

Mme EKISSI Alice Christine epse KOUAME, Maître-Assistant, UJLoG, **Examineur**

DEDICACE

Je dédie l'ensemble de ce travail à :

L'ESPRIT SAINT de DIEU pour la protection et toutes les grâces qu'il manifeste à mon égard.

Ma famille :

*A Mon Père **ALOULOUA Konan Daniel** et à ma Mère **KOUADIO Adjo Gisèle Marie Josée,***

Pour les énormes sacrifices que vous avez consentis. Ce travail n'est qu'un modeste témoignage de votre amour et de ma reconnaissance.

A mes Frères et Sœurs, à qui Je dédie également ce mémoire.

Vos encouragements incessants m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention d'un grand nombre de personnes. Je tiens à remercier toutes les autorités de l'université Jean Lorougnon Guédé ainsi que tous ceux qui ont contribué à ma formation.

Je remercie **Mme TIDOU Abiba Sanogo** épouse **KONE** Professeur Titulaire en Toxicologie, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé pour la bonne gestion de l'Université. J'exprime ma gratitude à **M. KONE Tidiani**, Professeur Titulaire, Vice-Président chargé de la Pédagogie, de la Recherche, de la Vie Universitaire et de l'Innovation Technologique pour la mise en œuvre de stratégies en vue du développement de l'Université. Je remercie **M. AKAFFOU Doffou Sélastique**, Professeur Titulaire en Génétique, Vice-Président chargé de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures pour l'engagement de participer à la réussite des étudiants.

Je dis merci à **Mme TONESSIA Dolou Charlotte**, Maître de Conférences en Phytopathologie, Directrice de l'UFR Agroforesterie pour sa disponibilité et sa bonne gestion de l'UFR.

Je tiens à remercier **M. KOUASSI Kouassi Clément**, Maître de Conférences en Microbiologie, Vice-doyen de l'UFR Agroforesterie pour sa disponibilité, les conseils personnels et éducatifs pour l'amélioration de ce document.

Mes remerciements à l'endroit de **M. KONATE Ibrahim**, Maître de Conférences en Microbiologie, pour avoir accepté la Direction scientifique de ce mémoire.

J'exprime ma profonde gratitude à mon encadreur, **M. ATTIEN Yao Paul**, Maître-Assistant en Microbiologie alimentaire, pour ses conseils, son soutien d'ordre moral, matériel et financier ; lequel soutien m'a beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail.

Je remercie **M. DIOMANDE Massé**, Maître de Conférences en Biotechnologie Agroalimentaire, responsable du parcours Biotechnologie agroalimentaire et Biosécurité Sécurité Alimentaire pour ses conseils et sa disponibilité face aux préoccupations des étudiants tous les enseignants de l'Université Jean Lorougnon Guédé.

Je tiens à remercier **M. ACKAH Jacques A.B.**, Maître de Conférences en Biochimie, Pharmacologie des Substances Naturelles à l'UFR Agroforesterie pour avoir accepté de présider ce jury. Que Dieu vous le rende au centuple.

Je tiens également à remercier **Mme EKISSI Alice Christine epse KOUAME**, Maître-assistant en Biotechnologie agroalimentaire à l'UFR Agroforesterie pour avoir accepté d'examiner ce document et de le parfaire. A mes amis, en l'occurrence **KONAN Kouakou Ahossi** et **DIABAGATE Jean Rodolpho** pour leur réalisme leur soutien sur tous les plans.

TABLE DES MATIERES	Pages
DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES.....	iii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	vii
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	
I. Le cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	5
1. Origine.....	5
2. Description du cacaoyer	5
3. Principales variétés de cacao	7
4. Production mondiale et consommation mondiale	8
4.1. Production mondiale	8
4.2. Consommation mondiale	9
5. Composition biochimique des fèves de cacao.....	9
5.1. Protéines et acides aminés	9
5.2. Glucides.....	10
5.3. Acides gras.....	10
5.4. Composition en minéraux des fèves de cacao	10
6. Bienfaits du cacao	11
II. Fermentation des fèves de cacao	12
1. Impact de la fermentation sur les fèves de cacao	12
2. Problèmes liés aux différents types de fermentation.....	12
III. Microorganismes impliqués dans la fermentation des fèves de cacao.....	13
1. Lactobacillus	13
1.2. Fermentation des bactéries lactiques	14
2. Bacillus.....	14
2.1. Caractères bactériologiques et morphologiques	15
2.2. Groupe de Bacillus cereus et classification	15
2.3. Caractéristiques des Bacillus cereus	Erreur ! Signet non défini.

3. Levures	16
3.1. Caractères morphologiques et cultureux	16
3.2. Métabolisme.....	17
4. Moisissures	17
4.1. Caractères morphologiques et cultureux.....	18
4.2. Métabolisme.....	18
DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES	
I. Matériel	20
1. Matériel biologique.....	20
2. Matériel technique	20
2.1. Milieux de culture	20
2.2. Appareillage	20
II. Méthodes	20
1. Site de prélèvement	20
2. Echantillonnage	21
3. Analyses microbiologiques	22
3.1. Préparation des milieux de culture.....	22
3.2. Préparation des solutions mères et des dilutions décimales.....	23
4. Ensemencement et incubation.....	24
4.1 Milieu Mossel	24
4.2. Milieu MRS	25
4.3. Sabouraud +Chloramphénicol	25
5. Dénombrement.....	25
6. Interprétation des résultats microbiologiques	26
7. Analyse des statistiques.....	26
TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION	
I. Résultats.....	32
1. Germes présents dans les échantillons analysés prélevés dans les localités.....	28
2. Comparaison des microorganismes présents dans les fèves fraîches et les fèves fermentées.....	31
II. Discussion.....	35
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	38
REFERENCES	40

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

BCP :	BromoCrésol Pourpre
BNETD :	Bureau National d'Études Techniques et de Développement
CCI :	Chambre de Commerce et d'Industrie
EPT :	Eau Peptonée Tamponnée
ICCO:	International Cocoa Organization
MRS:	Man Rogosa Sharpe
NCEP :	National Cholesterol Education Program
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
pH :	Potentiel d'Hydrogène
SM :	Solution mère
UFC :	Unité Formant Colonie

LISTE DES TABLEAUX

Pages

Tableau I : Composition des minéraux dans les fèves de cacao.....	10
Tableau II : Germes présents dans les fèves fraîches de cacao à Tagoura.....	28
Tableau III : Germes présents dans les fèves fraîches de cacao à Zaguiguia.....	29
Tableau IV : Germes présents dans les fèves fraîches de cacao à Gbokora.....	29
Tableau V : Germes présents dans les fèves fermentées de cacao à Tagoura.....	30
Tableau VI : Germes présents dans les fèves fermentées de cacao à Zaguiguia.....	30
Tableau VII : Germes présents dans les fèves fermentées de cacao à Gbokora.....	31

LISTE DES FIGURES	Pages
Figure 1: <i>Theobroma cacao</i> L.....	6
Figure 2 : Photo montrant les différentes variétés de cacao.....	8
Figure 3 : Production mondiale de cacao.....	8
Figure 4 : Principaux pays consommateurs de cacao.....	9
Figure 5: Carte géographique de la ville de Daloa.....	21
Figure 6 : Cabosses et fèves à l'intérieur d'une cabosse de cacao.....	22
Figure 7 : Procédure de la dilution décimale.....	24
Figure 8 : Bactéries lactiques présents dans les fèves fraîches et fermentées.....	32
Figure 9: Levures présents dans les fèves fermentées de cacao.....	32
Figure 10: Moisissures présents dans les fèves fraîches de cacao.....	33
Figure 11: Moisissures présents dans les fèves fermentées de cacao.....	33
Figure 12 : <i>Bacillus cereus</i> présents dans les fèves fermentées de cacao.....	34

INTRODUCTION

Le cacao fait partie des matières premières les plus échangées dans le monde. En moyenne, près de 3 millions de tonnes de cacao en fèves y sont produites chaque année (CCI, 2001). Le cacao est un produit agricole de rente de grande importance économique pour la Côte d'Ivoire (Guehi *et al.*, 2007). Il constitue l'un des emblèmes de ce pays à l'époque coloniale (OCDE, 2007). Depuis 1970, la Côte d'Ivoire occupe le premier rang des pays producteurs de cacao avec des productions atteignant souvent 1,2 millions de tonnes de fèves par an, soit près de 40 % de la production mondiale (Kouakou *et al.*, 2013). De plus, le pays tire 15 % de son produit intérieur brut de la production et l'exportation de cacao (OCDE, 2007). La fève de cacao constitue la matière première des industries chocolatières qui fabriquent soit des produits semi-finis soit des produits finis. La culture du cacao requiert le climat chaud et humide des régions tropicales ou subtropicales, un sol profond, fertile et bien drainé. Une cinquantaine de pays de la zone intertropicale cultivent le cacao parmi lesquels trois d'entre eux dominent la production mondiale. Il s'agit de la Côte d'Ivoire qui produit environ (39 %), le Ghana avec (21 %) et l'Indonésie (13 %). La production nationale a atteint un record historique de 1,74 millions de tonnes en 2014 (Traoré, 2019).

Certains pays producteurs réussissent à transformer localement une quantité significative de fèves de cacao en produits semi-finis ou finis (CCI, 2001). Dans les pays producteurs de cacao, les planteurs de cacao (ou cacaoculteurs) effectuent les premières étapes de transformation du fruit (ou cabosse): cueillette, écabossage, fermentation des fèves, séchage, calibrage. La fermentation est une des principales activités post récolte dans la production des fèves marchandes de cacao. Au cours de la fermentation, la pulpe, substrat de la fermentation est dégradée suite à un ensemble complexe de réactions biochimiques et enzymatiques auxquelles participent essentiellement les levures, les bactéries lactiques, les bactéries acétiques et les *bacillus* (Ouattara *et al.*, 2011). La fermentation demeure un processus complexe et difficile à contrôler car la contamination microbienne se fait de façon hasardeuse et aléatoire. Mais les métabolites résultant de ces réactions modifient les paramètres tels que le pH et la température du milieu fermentaire. Cela conduit au fil du temps, à la mise en place d'un environnement propice au développement ou à l'inhibition de microorganismes impliqués dans le processus fermentaires du cacao. Cette succession microbienne, en rapport avec la séquence des réactions enzymatiques et de métabolites produits, impacte fortement la qualité du cacao (Camu *et al.*, 2007). Cependant, l'ordre d'émergence et de succession des microorganismes peut varier en fonction des changements des conditions climatiques locales (Ardhana & Fleet,

2003). Mais aussi des paramètres physico-chimiques du milieu de fermentation et peut par conséquent influencer positivement ou négativement la qualité de la fève de cacao. Il revient à se demander si les microorganismes qui agissent lors de la fermentation sont endogènes ou exogènes. Quelques études ont déjà été menées dans ce sens sur les différents microorganismes qui agissent dans les fèves de cacao et sur l'isolement de ces microorganismes.

Ce travail vient à point nommé pour rechercher l'origine des germes présents dans les fèves de cacao. Cette étude a pour objectif de déterminer les microorganismes présents dans les fèves fraîches et fermentées de cacao.

De façon spécifique, il s'agit de :

- 1. Dénombrer les germes dans les fèves fraîches et fermentées
- 2. Comparer la charge des germes présents dans la fève fraîche et dans la fève fermentée de cacao

Outre l'introduction, la conclusion, les recommandations et les perspectives, le présent mémoire s'articule autour de trois grandes parties. Dans la première, il sera présenté les généralités sur le cacao (*Theobroma cacao* L.) où il sera question de montrer l'origine du cacao et d'expliquer le processus de fermentation du cacao. La deuxième partie rend compte du matériel et des méthodes utilisés dans le cadre de cette étude pour atteindre les objectifs fixés. La troisième partie présente les résultats qui sont discutés.

Première Partie :
GENERALITES

I. Le cacao (*Theobroma cacao* L.)

1. Origine

Le terme “cacao” est généralement utilisé pour désigner la plante *Theobroma cacao* L., et ses produits, notamment les grains de cacao, communément appelées “fèves”. Si aujourd’hui le cacaoyer est mondialement apprécié pour son fruit, il faut remonter plus de 4000 ans en arrière. Le cacao tire son origine dans les forêts tropicales d’Amérique centrale et d’Amazonie (Bertin & Lefebvre, 2010). Le cacaoyer était cultivé par les Maya et les Olmèques, peuples précolombiens de l’Amérique sous forme de breuvage amer consommé exclusivement par les rois et les nobles : le « cacauhaa », à l’origine du mot cacao (chez les Mayas, « cac » signifie rouge, en référence à la couleur de la peau du fruit ; et « cau » mot employé pour la force, le feu) (N’goran, 2015). Les Aztèques, plus au sud, ont eux aussi appris à cultiver le cacaoyer en mélangeant ses grains à de la vanille, du piment et de la farine de maïs : ils en font une boisson aromatique, le « xocolatl » (mot signifiant « eau amère » qui donnera chocolat), source de sagesse spirituelle et d’énergie corporelle. Bien plus tard, avec l’arrivée massive des conquistadors et notamment d’Hernan Cortes le cacao est exporté en Espagne. La préparation du chocolat, d’abord bien gardée par les moines espagnols, finit par être connue dans plusieurs pays européens. Au XIX^e siècle, un suisse du nom d’Henri Nestlé a même l’idée de mélanger le cacao à du lait concentré. Le chocolat au lait est né (Bertin & Lefebvre, 2010).

En Côte d’Ivoire, le cacao n’est signalé qu’en 1890 dans le sud-ouest du pays, très peu peuplée, qui fait frontière avec le Liberia. Deux colons français Verdier et Bretignere sont à l’origine de l’économie de plantation en Côte d’Ivoire. Ils vont pour la première fois créer en 1888 la plantation de cacao à Elima dans la région d’Aboisso située à l’Est à 116 Km d’Abidjan. Le colonisateur français se concentre alors sur le Sud-Est ivoirien, pour endiguer la présence anglaise au Ghana. Une dizaine de petites plantations de cacao apparaissent en 1895, sur des sols pauvres, mais sans succès, après des années de persistance la Côte d’Ivoire ne produit que deux tonnes en 1904. (N’goran, 2015). Aujourd’hui la Côte d’Ivoire est le premier producteur mondial avec 1,74 million de tonnes de cacao (OCDE, 2007).

2. Description du cacaoyer

Le cacaoyer est un arbre de 3 à 8 mètres de hauteur, qui pousse à l’ombre. Il porte des feuilles toute l’année. Sa fleur est petite, blanche et présente sur l’arbre pratiquement toute l’année.

On trouve en permanence, des fleurs, des feuilles et des fruits ensemble sur l’arbre.

Ces fruits sont appelés « cabosses » de couleur verte, jaune ou rouge sombre, mesure environ 25 cm de long, 15 cm de large et pèse 500 g, et sont portées par le tronc et les plus grosses branches.

Les fruits comportent de 20 à 40 fèves entourées de mucilage et qui après fermentation, séchage et torréfaction sont utilisées pour la fabrication du chocolat (Attafi, 2013).



Figure 1: *Theobroma cacao* L. (Attafi, 2013).

La systématique du cacaoyer est la suivante:

Règne : Plantae

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Malvales

Famille : Sterculiacées

Genre: *Theobroma*

Espèce: *Theobroma cacao* L.

(Linné, 1753)

3. Principales variétés de cacao

Theobroma cacao L., est l'une des quelques 22 espèces du genre *Theobroma* de la famille des sterculiacées. Cette espèce est apparemment originaire de la partie basse équatoriale du versant oriental des Andes où on recense le plus vaste éventail de pousses naturelles (Medane, 2017). Pour la production de cacao, on distingue principalement trois variétés de cacaoyers :

La variété Criollo, originaire d'Amérique centrale et du Sud, est cultivée principalement au Mexique, en Colombie et au Venezuela. Ses cabosses sont de forme allongée, jaune orangé à maturité et les fèves arrondies avec des cotylédons blancs à rose. C'est une variété très fragile et sensible aux maladies ; elle ne représente que 5 % de la production mondiale. Cependant, sa faible amertume et sa qualité aromatique lui permet d'être très convoitée par les chocolatiers pour faire du chocolat de luxe (Kongor *et al.*, 2016).

La variété Forastero, est originaire de l'Amazonie, cultivée principalement en Afrique de l'ouest (Côte d'Ivoire, Ghana), à l'Equateur et au Venezuela. Elle est la plus cultivée dans le monde, 80 % de la production mondiale proviennent des cacaoyers de cette variété. Les cabosses sont lisses, vertes puis jaunes à maturité, leurs fèves sont aplaties et leurs cotylédons violet foncé. Une forte amertume est obtenue dans le chocolat final. Par leur importante diversité génétique, les cacaoyers Forastero sont plus résistants aux maladies et plus robustes. Les cacaos obtenus à partir de Forastero sont considérés de qualité standard (Kongor *et al.* 2016).

La variété Trinitario, originaire de Trinidad qui est issue du croisement entre la variété Criollo et Forastero, présente des caractéristiques similaires avec ses parents, avec la taille des arbres, la forme des cabosses et la couleur des fèves qui sont variables selon le « cultivar ou sous-variété » de Trinitario. Son rendement très élevé lui permet de participer de 10 à 15 % à la production mondiale. Les cacaoyers Trinitario sont principalement cultivés dans les pays d'où sont originaires les Criollo (Gilet, 2006 ; (Schwan & Wheals, 2004).

La variété Mercedes, c'est le cas du CCN-51, hybride venant de l'Equateur, issu du croisement entre les variétés Iquitos (Equateur-Pérou, 45,4 %), Criollo (Amazonie, 22,2 %) et Amelonado (Ghana et Amérique centrale, 21,5 %) qui est résistant notamment à *Moniliophthora perniciosa* ou de la variété Mercedes, qui a une précocité de croissance et un rendement final très important. La Figure 02 représente les cabosses des 3 principales variétés de cacaoyer ainsi que le cacao mercedès (Koua *et al.*, 2018)



Figure 2 : Photo montrant les différentes variétés de cacao (Anitha, 2018)

4. Production mondiale et consommation mondiale

4.1 Production mondiale

Selon le rapport de l'ICCO pour la saison 2017 / 2018, la production mondiale de cacao s'est élevée à 4,6 millions de tonnes. Les pays Africains ont détenu 75 % de la production mondiale. Les pays d'Amérique latine, représentent seulement 18 % de la production mondiale suivi des pays d'Asie qui produisent 7 % (ICCO, 2019). Sept pays produisent plus de 90 % de la production mondiale, la Côte d'Ivoire représente à elle seule plus de 42 % de la production avec 1,9 millions de tonnes de cacao récoltées, suivi du Ghana (905 000 de tonnes) puis de l'Equateur, du Cameroun, du Nigéria, de l'Indonésie et du Brésil (ICCO, 2019).

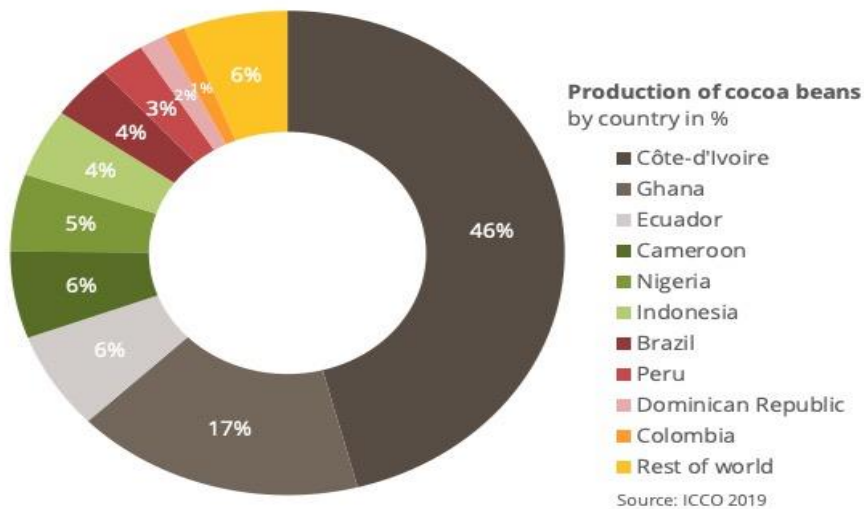


Figure 3 : Production mondiale de cacao (ICCO, 2019)

4.2. Consommation mondiale

Près de la moitié de la consommation mondiale de cacao 45 % revient à l'Europe, suivie par les Amériques. Individuellement, ce sont les États-Unis qui consomment le plus de produits à base de cacao (797 000 tonnes), devant l'Allemagne et la France. Avec une consommation annuelle d'un peu plus de 46 000 tonnes, la Suisse se classe quant à elle au 18e rang mondial des pays consommateurs de produits à base de cacao. Cependant, en termes de consommation par habitant, la Suisse est presque en tête, avec 5,5 kg d'équivalents fèves par personne devancée uniquement par l'Islande et la Belgique (ICCO, 2019).

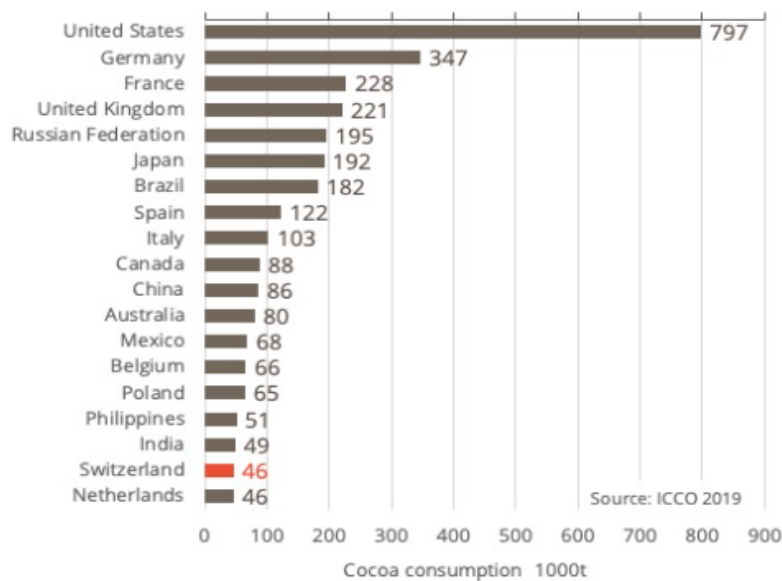


Figure 4 : Principaux pays consommateurs de cacao (ICCO, 2019)

5. Composition biochimique des fèves de cacao

La fève de cacao renferme plusieurs composés appartenant à diverses familles. On peut citer entre autres les glucides, les lipides, les protéines, les minéraux, les vitamines, l'eau, les polyphénols (Shittu & Badmus, 2009).

5.1. Protéines et acides aminés

Les protéines représentent environ 60 % de la teneur en azote total des fèves de cacao fermentées et constituent 10 à 15 % du poids sec des fèves de cacao séchées, qui sont le deuxième constituant le plus abondant après la graisse de cacao. L'azote non protéique des fèves fermentées se trouve sous la forme d'acides aminés ; environ 0,3 % se présente sous forme d'amide et 0,02 % sous forme d'ammoniac qui se forme lors de la fermentation des fèves et des méthylxanthines telles que la théobromine et la caféine (Bertazzo *et al.*, 2013).

5.2. Glucides

Les fèves de cacao contiennent des saccharides. L'amidon est le principal polysaccharide avec une concentration comprise entre 3 et 7 % des fèves de cacao. La cellulose est d'environ 12 % dans les fèves de cacao fermentées / séchées et c'est l'un des composants prédominants des polysaccharides de la paroi cellulaire. Les sucres solubles trouvés dans les fèves de cacao fermentées sont le glucose, le saccharose, le raffinose, le fructose, le stachyose et le verbascose et ils vont de 0,39 % à 3,48 % (Redgwell *et al.*, 2003). Les principaux sucres sont le fructose et le saccharose (Bertazzo *et al.*, 2013).

5.3. Acides gras

Le beurre de cacao est une matière grasse végétale constituée à 98 % en masse de triglycérides (TG) dont environ 70 % sont des monoinsaturés, 20 % des diinsaturés, 6 % des polyinsaturés et enfin 2 % de triinsaturés (Krysiak, 2011).

Le beurre de cacao est un mélange de graisse semi-solide et semi-liquide : ses acides gras ont des points de fusion différents; en effet l'acide oléique fond à 13 °C, l'acide stéarique à 70 °C, et l'acide palmitique à 63 °C. Le beurre de cacao, lui, fond à 34–35 °C. Le beurre de cacao est une des graisses les plus stables connues, contenant les antioxydants naturels qui empêchent le rancissement et lui donnent une vie de stockage de deux à cinq ans.

5.4. Composition en minéraux des fèves de cacao

Les minéraux représentent 5 % de la masse de cacao, principalement sous forme de magnésium, potassium et phosphore avec une richesse relative en sels de cuivre et de fer et autres résidus (Afoakwa *et al.*, 2013). De nombreux minéraux sont nécessaires pour la fonction vasculaire, mais des quantités suffisantes de magnésium, cuivre, potassium et de calcium alimentaire méritent une attention particulière pour leur rôle dans la prévention de l'hypertension artérielle et leur contribution dans la réduction des risques de maladies cardiovasculaires (National Cholesterol Education Program, 2000).

Tableau I : Composition des minéraux dans les fèves de cacao

Pour 100 g de chocolat à croquer

	Noir	Au lait	Blanc
Protéines (g)	4,3	7,7	7,8
Glucides (g)	60,2	57,3	55,2
Lipides (g)	30,9	32,1	33,9
Fer (mg)	2,3	1,1	–
Magnésium (mg)	103,8	2,3	250
Calcium (mg)	45	2,3	250
Sodium (mg)	15	90	NR
Potassium (mg)	365	420	NR
Phosphore (mg)	172,6	231,6	200
Cuivre (mg)	0,7	0,4	–
Energie (kcal)	535	548	557

Source : (Siret-Robert, 2014)

6. Bienfaits du cacao

Théobromine et caféine : Le cacao contient de la Théobromine et de la caféine, deux stimulants qui réduisent la fatigue et permettent d'augmenter la concentration et la mémoire. La théobromine est plus douce que la caféine, et va agir plus sur la durée. Elle va de plus provoquer la libération d'adrénaline, une molécule euphorisante (Jean, 2020).

Flavonoïdes : Ils contribuent à l'amélioration des capacités cérébrales et protègent le cerveau. Ils sont aussi à l'origine de la production d'oxyde nitrique, qui améliore l'afflux sanguin dans le cerveau. Grâce aux flavonoïdes, le cacao peut réduire les risques de crise cardiaque et nous protéger des maladies cardio-vasculaires, il augmente également le niveau d'oxyde nitrique dans le sang, ce qui dilate les artères et vaisseaux sanguins, améliorant la circulation (Jean, 2020).

Polyphénols : Les fèves de cacao sont uns des aliments les plus antioxydants qui existent. Elles contiennent d'importantes quantités de polyphénols, ces pigments qui colorent les

végétaux et sont aussi d'excellents antioxydants. Ces antioxydants vont aider le corps à lutter contre le stress oxydatif et le vieillissement cellulaire (Jean, 2020).

Sérotonine : Les fèves contiennent de la sérotonine, l'hormone associée au bien-être. Et aussi du tryptophane, un acide aminé essentiel, le neurotransmetteur qui permet à notre corps de créer la sérotonine. Enfin sa haute teneur en magnésium contribue à diminuer le stress (Jean, 2020).

Le cacao permet de réduire le taux de mauvais cholestérol, ce qui réduit le risque de maladies cardio-vasculaires. Mais au-delà de tous ces éléments, le cacao a également des vertus thérapeutiques. Il est efficace contre la prostate, la cystite, les rhumatismes, l'arthrite mais aussi la bronchite. Manger du cacao peut aider à mincir et contrôler son poids, sous certaines conditions (cacao cru ou chocolat noir à partir de 70 %, consommés avec modération dans le cadre d'une alimentation équilibrée) (Jean, 2020).

II. Fermentation des fèves de cacao

1. Impact de la fermentation sur les fèves de cacao

La fermentation est une étape primordiale du traitement post-récolte. Elle dure de 2 à 8 jours et cette durée dépend de la variété du cacao et des pratiques agricoles (Camu *et al.*, 2007). Elle induit un ensemble de réactions biochimiques qui ont lieu dans la pulpe et au centre des cotylédons sous l'action des micro-organismes contaminant la pulpe et les fèves de cacao lors de l'ouverture soit par simple contact des mains des agriculteurs ou par le matériel utilisé. L'opération de fermentation a trois buts principaux ; éliminer le mucilage par l'action microbienne, provoquer la mort de l'embryon pour empêcher la germination et enfin déclencher les réactions biochimiques dans les cotylédons pour former les précurseurs d'arôme (Schwan & Wheals, 2004). La fermentation est une des principales activités post récolte dans la production des fèves marchandes de cacao dont elle détermine la qualité marchande et organoleptique (Schwan & Wheals, 2004).

2. Problèmes liés aux différents types de fermentation

Les fermentations les plus couramment utilisées sont réalisées en tas, en caisses ou en paniers (Guehi *et al.*, 2010; Bankoffi *et al.*, 2013).

❖ Fermentation en tas

Au cours de cette fermentation, les fèves de cacao sont placées sur des feuilles de bananiers et recouvertes par celles-ci. Cette pratique concerne environ 60 % du cacao produit. L'avantage de cette technique est de diminuer le nombre de brassage, car elle assure de bons échanges gazeux entre les fèves et le milieu extérieur, par contre elle ne protège pas les fèves contre les variations de température (Barel, 2013).

❖ Fermentation en caisses

Elle se fait dans des caisses en bois ou des caisses en plastique (Guehi *et al.*, 2010). La fermentation dans ces dernières n'est pas très fréquente car elle produit un nombre élevé de fèves mal fermentées par rapport aux deux autres méthodes (en tas et caisses en bois). Le cacao fermenté dans des caisses en bois perforées est généralement de bonne qualité car les caisses présentent une bonne isolation thermique, indispensable au bon déroulement de la fermentation (Barel, 2013).

❖ Fermentation en panier

Cette technique traditionnelle est très pratiquée au Nigeria. La fermentation est effectuée dans des paniers en fibres végétales contenant 10 à 150 kg de fèves, posés sur le sol et recouverts de feuilles de bananiers. On brasse en transvasant les fèves d'un panier à l'autre.

III. Microorganismes impliqués dans la fermentation des fèves de cacao

1. Lactobacillus

1.1. Caractères morphologiques et cultureux

Les lactobacilles sont des bactéries asporulées, généralement immobiles, en forme bacille souvent allongées, groupées en paires ou en chaînes (Larpent, 2000). Les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques. Les lactobacilles (*Lactobacillus*) forment un genre de bactéries à gram positif, de la famille des *Lactobacillaceae*. On compte environ 192 espèces de lactobacillus (Euzéby, 2013). La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C. Certaines espèces de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C, certaines souches peuvent croître à des températures allant de 2 à 55 °C (Euzéby, 2006 ; Saad, 2010). Les lactobacilles donnent une très bonne croissance sur milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe). En milieu, gélosé les colonies sont dans la plupart des cas de petites tailles, lisses, brillantes et dans de rares cas elles sont de couleur jaunâtre ou rougeâtre (cas de *Lactobacillus plantarum*). Ce genre se développe sur milieu à pH allant de 5.4 à 6.4 (quelques espèces peuvent

pousser à un pH de 2.8 tel que *Lactobacillus suebicus*). La croissance optimale est obtenue dans des conditions microaérophiles bien que la plus part des souches soient anaérobies facultatives (Morisset, 2003 ; Walter & Hertel, 2009).

1.2. Fermentation des bactéries lactiques

De nombreuses bactéries lactiques, naturellement présentes sur les matrices alimentaires, sont à l'origine de fermentations utilisées par l'Homme pour transformer les produits alimentaires, afin d'en modifier le goût, la texture, et/ou d'en améliorer la conservation, un critère essentiel au cours de l'histoire humaine, les aliments étant parfois rares et facilement dégradés. Par fermentation, on entend une transformation naturelle d'un aliment, liée à la présence de bactéries, et généralement réalisée à l'abri du dioxygène et de la lumière afin d'éviter le développement de moisissures. Une fermentation consiste donc en une dégradation des nutriments présents dans l'aliment par des bactéries lactiques, qui vont produire de l'acide lactique faisant baisser le pH et inhibant ainsi la croissance d'autres microorganismes, susceptibles d'altérer les aliments. Les aliments fermentés, étant pré-dégradés par les bactéries lactiques, sont généralement assez digestes et bien tolérés. Elle procure également le goût aigre de certains aliments fermentés. De plus, certaines bactéries lactiques produisent également des substances antibiotiques de nature peptidique, appelées bactériocines, pour éliminer les bactéries compétitrices. Par exemple, *Lactococcus lactis* produit de la nisine, une bactériocine inhibant la croissance des pathogènes alimentaires *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Carré-Mlouka, 2019).

2. *Bacillus*

Les *Bacillus* sont des bacilles Gram+, généralement mobiles, aptes à la sporulation. La spore ne prend pas la coloration de Gram, elle est sphérique ou ovale, déformante ou pas selon les espèces. Dans les cas douteux, une coloration spécifique peut être réalisée. L'aptitude à la sporulation peut aussi être mise en évidence par le test de thermorésistance (10 minutes à 80 degrés). Les *Bacillus* sont catalases +, aérobies ou aéro-anaérobies. On les classe en fonction de la morphologie de la spore (étudiée par examen microscopique) ou en fonction de critères plus nombreux incluant le caractère respiratoire et fermentaire, la thermophile, etc. (Guiraud, 2012).

2.1. Caractères bactériologiques et morphologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et mycoïdes sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase. Les *Bacillus* sont répartis en trois catégories selon la morphologie de leurs spores :

Le groupe I rassemble les bacilles dont les spores d'aspect ovale ou cylindrique ne sont pas déformantes (*B. cereus*, *B. lentus*, *B. megaterium*,...), le groupe II comprend les bacilles dont les spores ont une silhouette ovale modifiant la forme du corps de la bactérie (*B. circulans*, ...), le groupe III réunit les bacilles dont les spores rondes déforment le corps bacillaire (*B. sphaericus*,...). (Medane, 2017)

2.2. Groupe de *Bacillus cereus* et classification

L'expression « groupe *Bacillus cereus* » est en fait une nomenclature considérée comme empirique et non- taxonomique (Vilas, 2002) ; elle a toutefois l'intérêt de souligner la grande proximité des microorganismes qui composent. Ce groupe, c'est -à- dire six espèces correspondant à *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoïdes*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis* . *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* sensu stricto et *Bacillus thuringiensis* ont une telle proximité sur le plan génétique qu'on les regroupe souvent à l'heure actuelle dans une seule « espèce » dénommée *Bacillus cereus* sensu lato (Chen & Tsen, 2002).

2.3. Caractéristiques des *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est un groupe d'espèces très proches qui sont caractérisées par des bacilles à Gram-positif, aérobies ou anaérobies facultatifs, et sporulant. Il fait partie d'un ensemble d'espèces apparentées, souvent regroupées dans la littérature sous le terme « *Bacillus cereus* sensu lato (De Buyser *et al.*, 2012).

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont caractérisées par une température optimale de croissance de 30-37°C mais elles sont capables de croître de 4°C à 50°C selon les espèces (55°C pour certaines souches). Ces caractéristiques les rendent particulièrement résistantes à la chaleur, le froid, la déshydratation, l'action des désinfectants et des substances bactéricides. La croissance de *Bacillus cereus* est inhibée dans les aliments à activité de l'eau (aw) inférieure à 0,92 ou à pH inférieur à 4,5 (De Buyser *et al.*, 2012).

Les sept groupes reflètent les différentes aptitudes des souches à se développer à différentes températures, à la thermo-résistance de leurs spores et à la fréquence de leur implication dans les toxi-infections alimentaires collectives (Tiac). *Bacillus cereus* peut produire deux types de toxines, une toxine émétique préformée dans les aliments et résistante à une large gamme de températures et de pH, et des toxines diarrhéiques produites pendant la croissance dans l'intestin grêle après ingestion de cellules végétatives ou de spores en quantité suffisante (De Buyser *et al.*, 2012).

3. Levures

Le terme courant de levure désigne généralement le genre *Saccharomyces* (levure de bière ou levure de boulanger). Une levure est un champignon unicellulaire, se reproduisant par fission ou bourgeonnement à certains stades de sa vie et formant des cellules sexuelles sans appareil fructifère. La plupart des levures sont acidophiles, avec une préférence pour des pH entre 4 et 5. La classification des champignons, et donc des levures, est complexe et soumise à des remaniements fréquents. Avec plus de 1500 espèces décrites, ce qui ne représente probablement qu'une faible proportion de ce qui existe réellement, les levures ne se retrouvent que dans 3 classes de champignons (70 000 espèces décrites) (Dassy, 2018).

3.1. Caractères morphologiques et culturels

Les levures sont de formes variables selon l'espèce sphérique, ovoïde ou elliptique, en bouteille, triangulaire ou apiculée (renflée à chaque bout comme un citron) mais généralement ovales, d'environ 6 à 10 microns et jusqu'à 50 microns, se multiplient par bourgeonnement ou par scission (scissiparité). Ils sont souvent capables d'accomplir une sporulation soit dans un but de dormance en milieu défavorable, soit dans un but de dispersion.

N'importe quel milieu de culture glucosé convient. Cependant on utilise de façon préférentielle certains milieux et dans des conditions particulières (incubation à 28 °C pendant

24 à 48 heures) : milieux non-sélectifs (milieu ordinaire ; milieu BCP ; milieu à l'extrait de malt (extrait de malt, agar-agar et eau)) ; milieux sélectifs : gélose de Sabouraud (sélectif par pH acide, auquel on peut ajouter du chloramphénicol ou gentamicine) (Dassy, 2018).

3.2. Métabolisme

➤ Le métabolisme primaire des levures

Les levures sont aéro-anaérobies pour la plupart (métabolisme pouvant se produire en présence de dioxygène (respiration cellulaire) ou en l'absence de dioxygène (fermentations)). Elles peuvent plus rarement aérobies strictes (métabolisme seulement en présence de dioxygène). En plus de la respiration, le dioxygène est aussi nécessaire pour la synthèse des stéroïdes et de l'acide nicotinique (vitamine PP, précurseur du coenzyme NAD⁺). Ce qui implique que ces composés doivent être ajoutés au milieu de culture pour une culture anaérobie (métabolisme seulement en l'absence de dioxygène). Comme l'ensemble des eucaryotes, les levures sont chimio-organotrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent les substrats carbonés à la fois comme sources de carbone et d'énergie. Elles sont capables de métaboliser de nombreux sucres simples, mais pas des polysaccharides tels que l'amidon et la cellulose. Cela a des conséquences sur la fabrication d'aliments et de boissons à base de céréales dans laquelle interviennent des levures (Dassy, 2018).

➤ Le métabolisme secondaire des levures

Les levures synthétisent de nombreuses molécules aromatiques ou organoleptiques, que l'on peut répartir en huit familles principales : alcools supérieurs, acides organiques, esters, phénols volatils, aldéhydes et cétones, composés soufrés, terpènes et lactones. Un composé est dit organoleptique s'il agit sur les sens, en l'occurrence ici le goût et l'odorat. Mais la situation est complexe, car un arôme donné peut dépendre d'un mélange de substances organoleptiques plutôt que d'une molécule particulière. De plus, il y a des effets de synergie ou de masquage provoqués par d'autres composés non organoleptiques (Dassy, 2018).

4. Moisissures

Les moisissures sont des champignons pluricellulaires microscopiques ubiquistes, à croissance filamenteuse, qui regroupent des milliers d'espèces. Le terme familier de « moisissures » fait généralement référence à leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse, qui peut être observée à divers endroits (Chabasse *et al.*, 2002).

4.1. Caractères morphologiques et culturels

Les moisissures sont des champignons microscopiques formant le groupe des hyphomycètes et regroupant des milliers d'espèces. Elles sont formées de nombreux filaments minces et enchevêtrés (Antoine, 2009). La partie qui plonge dans le milieu nutritif constitue le thalle ou mycélium qui peut revêtir des formes très diverses. Un mycélium peut donner naissance à plusieurs milliers, voire plusieurs millions de spores dont l'ensemble appelé sporée se présente souvent sous un aspect poudreux et coloré (Antoine, 2009). Tout comme les levures, les moisissures sont également cultivées grâce au milieu sélectif : gélose de Sabouraud (sélectif par pH acide, auquel on peut ajouter du chloramphénicol ou gentamicine).

4.2. Métabolisme

Les moisissures sont des champignons microscopiques se développant la plupart du temps à une température moyenne (entre 5 et 25°C) sur un fond nourrissant (matière organique, sucres, graisses, cellulose...), avec une quantité d'oxygène et un taux d'humidité importants (Chabasse *et al.*, 2002). Les spores de moisissures sont présentes dans l'air ambiant mais leurs dimensions sont inférieures à 10 microns. Il existe de nombreuses variétés de moisissures se matérialisant en coloris tirant du verdâtre au noir. Lors de leur développement les moisissures produisent de nombreuses spores, ce qui explique leur très rapide expansion. Parmi les plus connues, les espèces du genre *Penicillium* avec lesquelles on produit la pénicilline, un antibiotique utile pour lutter contre diverses bactéries. (Chabasse *et al.*, 2002).

Deuxième Partie : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué des échantillons de fèves de cacao fraîches et fermentées contenues dans des cabosses de cacao récoltées. Les échantillons prélevés dans la saison de récolte (Août à Octobre) proviennent des champs de cacao situés à Tagoura, Zaguiguia et à Gbokora dans la région de Daloa (Côte d'Ivoire).

2. Matériel technique

2.1. Milieux de culture

Les milieux de culture ayant servi à la réalisation de cette étude sont les suivants :

- Le bouillon Eau Tamponnée (EPT) (Difco) TM est un bouillon non sélectif utilisé dans les phases de pré-enrichissement et la régénération des microorganismes contenus dans les denrées alimentaires pour les analyses.
- la gélose MRS (Biokar Diagnostics) pour la recherche des bactéries lactiques ;
- la gélose Mosel MYP (Bio-Rad) au jaune d'œuf pour la recherche des *Bacillus cereus* ;
- La gélose Sabouraud + Chloramphénicol (Biokar Diagnostics) est un milieu sélectif utilisé pour la recherche des levures et moisissures.

2.2. Appareillage

Le matériel technique est constitué d'une balance, un autoclave et aussi un bain-marie. Les boîtes de Pétri stériles (90 mm de diamètre), les flacons avec bouchon autoclavable, des pipettes stériles de 1mL et de 5mL, des tubes à essai, des erlenmeyers, une anse de platine, une spatule, des gants de protection, des étaleurs, une propipette, des tubes à essais, une bouteille de gaz à bec bunsen, un bécher, des éprouvettes graduées, les boîtes plastiques stériles ainsi que tout matériel classique d'un laboratoire.

II. Méthodes

1. Site de prélèvement

L'échantillonnage des cabosses de cacao a été réalisé sur trois sites. Les localités de Gbokora, de Tagoura et Zaguiguia à Daloa dont l'âge des champs est compris entre 20 et 35 ans. La ville de Daloa est située dans le centre-ouest de la cote d'Ivoire, Chef-lieu de la région du Haut Sassandra. La ville de Daloa a une superficie d'environ 5400 km² et sont situés entre la latitude 6° et 7° Nord et la longitude 7° et 8° Ouest (Adjiri *et al.*, 2019).

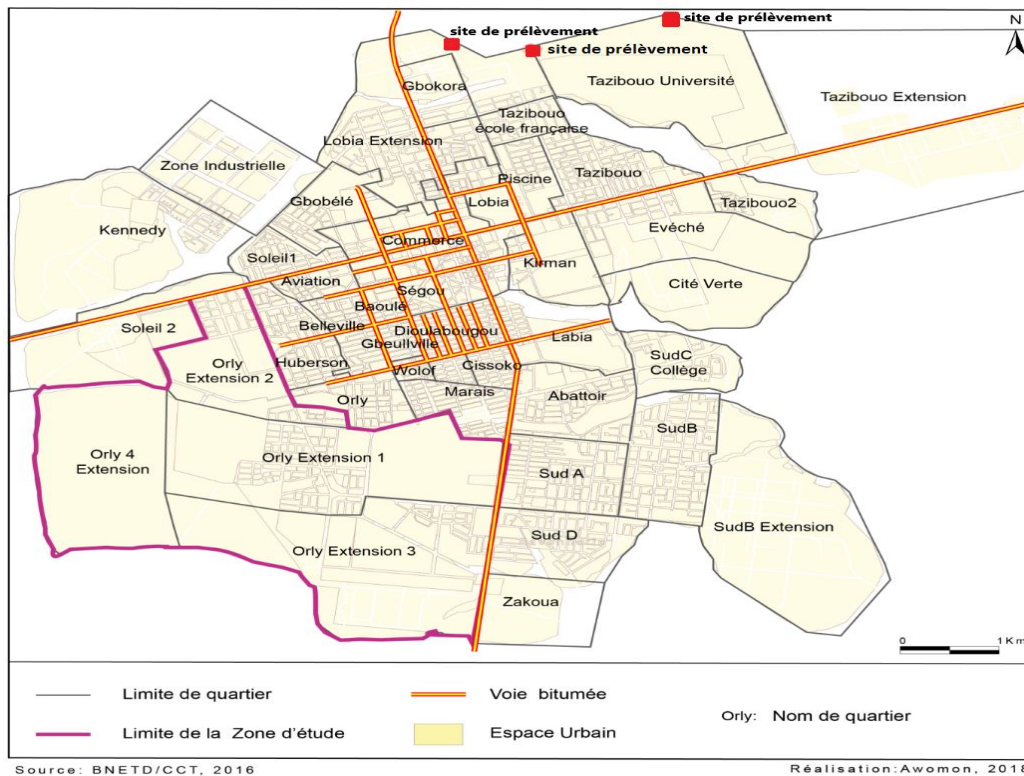


Figure 5: Carte géographique de la ville de Daloa

2. Echantillonnage

La saison propice pour récolter des fèves de cacao étant dans la période de Août à Octobre, c'est à ces périodes qu'il y'a eu récolte des fèves dans les champs. En effet, les cabosses de cacao ont été récoltées (dans le mois de septembre) à l'aide d'une machette de sorte à ne pas les blesser, ensuite nettoyé avec de l'eau chlorique avant de les mettre dans une boîte hermétique pour transporter ces fèves au laboratoire le même jour. Les cabosses sont fendues sous une hotte au laboratoire avant de prélever trois fèves à l'aide de pince métallique. Les autres cabosses n'ayant pas été utilisées le même jour ont été destinées à six jours de fermentation après laquelle les mêmes analyses ont été faites. Un total de 30 échantillons a été prélevé et étiqueté. En raison de 10 échantillons par site. 5 fèves fraîches et 5 autres fèves qui seront fermentées.

Les échantillons ont été prélevés à différents stades de maturité. L'échantillon 1 correspond à des cabosses apparemment saines (sans taches), les échantillons 2 et 3 correspondent à des cabosses moyennement tachetés et les échantillons 4 et 5 sont des cabosses tachetés.



Figure 6 : Cabosses et fèves à l'intérieur d'une cabosse de cacao

3. Analyses microbiologiques

3.1. Préparation des milieux de culture

Les différents milieux de cultures pour les différentes analyses sont préparés selon les prescriptions des fabricants. Ces milieux sont ensuite stérilisés à l'autoclave.

- **Sabouraud + chloramphénicol**

Principe : La gélose Sabouraud est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de levures et moisissures. L'addition de chloramphénicol inhibe la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif.

C'est un milieu déshydraté (Biokar Diagnostics) 65,5 g pour 1L d'eau distillée. 29,5g seront prélevés du milieu à l'aide d'une spatule et d'une balance pour 450 mL d'eau distillée qui est chauffé lentement dans un récipient Erlenmeyer en agitant fréquemment puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Il a fallu ensuite stériliser et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes. Le milieu est ensuite refroidi lentement dans un bain-marie avant utilisation, bien agité dans les boîtes de Pétri stériles à 1 mL par boîte. Le pH prêt à l'utilisation est $5,6 \pm 0,2$ à 30°C.

- **MRS (Man, Rogosa & Sharpe)**

Principe : La gélose MRS est utilisée pour la culture des Lactobacillus. La sélectivité du milieu est uniquement assurée par son pH.

C'est un milieu déshydraté (Biokar Diagnostics) 70,3 g pour 1L d'eau distillée soit 31,6 g pour 450 mL d'eau distillée qui ont été prélevés à l'aide de spatule. La solution de 450 mL est chauffée lentement, dans un bain-marie, en agitant fréquemment puis portée à ébullition jusqu'à dissolution complète. Il faudra ensuite stériliser et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes, laisser refroidir lentement, homogénéiser et couler en boîte de Pétri pH du milieu prêt à l'emploi $6,2 \pm 0,2$ à 25°C.

- **Mossel au jaune d'œuf**

Principe : La gélose au jaune d'œuf est un milieu enrichi et différentiel utilisé pour l'isolement et la différenciation présumée de différentes espèces sur la base de leur activité lécithinase.

Ce milieu a permis d'isoler et dénombrer les *Bacillus cereus*. Il s'agit de dissoudre 24g de solution de Mossel MYP (Bio-Rad) pour un volume d'eau distillée de 500 mL dans un Erlenmeyer, mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Le volume de 500 mL de la solution mère, ayant fait l'objet du traitement thermique jusqu'à dissolution complète, stérilisé et autoclavé à 121°C pendant 15 minutes, Refroidi lentement à un degré approximatif de 49°C. Après autoclave, 5 g de jaune d'œuf ont été ajoutés à la solution de Mossel. L'incubation se fera à 30°C de 24 à 48 heures. pH du milieu prêt à l'emploi à $7,2 \pm 0,2$.

3.2. Préparation des solutions mères et des dilutions décimales

Une quantité de 10g de fève de cacao est pesée aseptiquement autour du bec Bunsen sur une balance (KERN) dans un sachet de type Stomacher. Un volume de 90 mL d'Eau Peptonée Tamponnée (EPT) stérile y est ajouté. Le tout est soigneusement mélangé 10 à 15 minutes sous une hotte. Cette suspension obtenue constitue la solution mère (SM). La solution mère est laissée au repos pendant une heure, dans l'optique de revivifier les microorganismes, puis des dilutions décimales y sont ajoutées. Ainsi, 1 mL de cette solution est prélevé près de la flamme du bec bunsen à l'aide d'une pipette graduée stérile et transféré dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau distillée stérile. Ensuite 1mL sont prélevés de la première dilution après homogénéisation qu'on ajoute dans le deuxième tube à essai contenant 9 mL d'eau distillée. Ci-dessous la figure 7 décrivant la procédure de dilution décimale.

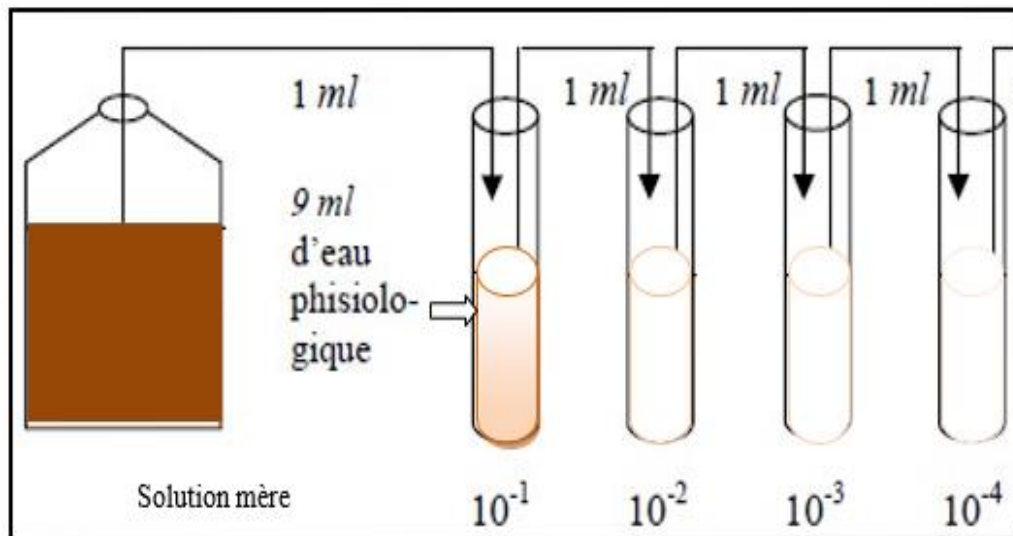


Figure 7 : Procédure de la dilution décimale

4. Ensemencement et incubation

4.1 Milieu Mossel

Identification des souches : la présence de *Bacillus cereus* sur le milieu requiert la présence de colonies roses rouges qui indiquent (mannitol -), s'il y a un halo blanchâtre au centre de la colonie cela indique (lécithinase +) (Guillaume, 2004).

Le mannitol est un sucre-alcool (polyol) dérivé du mannose utilisé par les algues brunes pour réguler leur pression osmotique. Le mannitol est utilisé comme édulcorant naturel, agent anti-agglomérant et agent de remplissage, obtenu à partir de l'hydrogénation du sucre de mannose. À température ambiante, il apparaît comme un solide blanc inodore. (aquaportail.com, 2020) Un test au mannitol positif est le reflet de la présence de cellules inflammatoires et de leurs médiateurs.

La lécithine : c'est un composant normal du jaune d'œuf. Ensemencés sur une gélose au jaune d'œuf, les microorganismes qui possèdent une lécithinase décomposent la lécithine en diglycéride insoluble et en phosphorylcholine, ce qui entraîne la formation d'un précipité dans le milieu. Ainsi, une zone de précipitation blanche et opaque s'étendant au-delà des limites de la colonie indique une activité positive de la lécithinase du micro-organisme testé.

Pour le milieu Mossel, la solution mère et chacune des dilutions a été étalée à la surface de la gélose contenant 500 mL du milieu Mossel MYP (Bio-Rad) préalablement coulé et séché,

puis incubé à 30°C pendant 24 heures de sorte à permettre aux différents types de *Bacillus cereus* de germer.

4.2. Milieu MRS

Identification des souches : Pour ce milieu, la présence de bactéries lactiques se manifeste par l'apparition de petites colonies d'environ 1 mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtre ou laiteuse.

Après avoir autoclavé la gélose MRS contenant 450 mL, la solution mère et les dilutions 10-1, 10-2 et 10-3 ont étéensemencée en surface à l'aide d'une spatule en fer stérile sous une hotte de laboratoire et placé dans un récipient hermétique avec une bougie à l'intérieur afin d'éliminer complètement l'air contenu dans le récipient (les bactéries lactiques sont partiellement tolérables à l'oxygène). Les boîtes sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures (Idoui, 2009).

4.3. Sabouraud + Chloramphénicol

Identification des souches: Sur la gélose, les moisissures sont les colonies blanches, arrondi (pour la plupart), texture rayonnant en bordure et cotonneuse de diamètre compris entre 40 et 55mm. Les levures seraient de couleur blanche crémeuse au recto, arrondies, uniformes avec sclérose solidement adhérente à la gélose de diamètre compris entre 30 et 35mm.

A l'aide d'une pipette stérile de 1mL de solution des dilutions 10-1, 10-2 et 10-3 est prélevée et transférée sur 450 mL de la gélose Sabouraud +chloramphénicol déjà coulée et solidifiée en boîte de pétri. L'échantillon a été transféré sur le milieu,ensemencé dans la masse à l'aide d'une pipette. Deux boîtes de pétri seront utilisées par dilution. Cette opération se réalise dans les conditions aseptiques (sous une hotte) près de la flamme du bec bunsen. Les boîtes de pétri sont ensuite retournées et incubées à 37°C pendant 5 jours.

5. Dénombrement

Le principe est un ensemencement en surface dans le milieu de culture à différentes dilutions (2 boîtes par dilution) ainsi que de la solution mère suivi d'une incubation à 30°C pendant 24h minimum. Les dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile. 100 µL des dilutions appropriées sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant 20 mL du milieu de culture Sabouraud pour les levures, MRS gélosé pour les bactéries lactiques.

Les colonies sont comptées après 24 heures à 5 jours d'incubation.

6. Interprétation des résultats microbiologiques

Le calcul du nombre de microorganismes par gramme d'échantillon (UFC / g) à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de pétri choisies est réalisé par l'équation :

$$N = \frac{\sum C_i}{(N_1 + 0,1N_2)d.V}$$

Où ***n1*** est le nombre de boîtes de la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées, ***n2*** est le nombre de boîtes de la dilution qui précède la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées, ***d*** est le taux de dilution de la première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées. ***N*** est le dénombrement moyen des champignons en UFC/g ou UFC/mL. $\sum C$ est la somme des colonies répondant aux critères d'identification sur les boîtes retenues ***V*** est le volume d'inoculum.

7. Analyses statistiques

Les différents calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel 2013. L'analyse des variances (ANOVA) est la technique utilisée pour le traitement statistique des données à l'aide du logiciel R (R i386 3.1.2). Le principe du test de l'analyse de variance est basé sur l'hypothèse que la variabilité totale observée dans les résultats est due à une fluctuation aléatoire. Le test de Tukey a été aussi appliqué en considérant que les variabilités sont significativement différentes pour des probabilités inférieures à 5 %.

Troisième Partie : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats

1. Germes présents dans les échantillons analysés prélevés dans les localités

Les résultats ont montré que le taux de contamination des microorganismes dans tous les échantillons étudiés avaient une probabilité ($P < 5\%$). Le test de TUCKEY nous a permis de localiser cette différence au niveau des échantillons par rapport aux microorganismes étudiés. Les différents résultats sont présentés dans les tableaux suivants en UFC/g. Il y'a eu une absence de germes de bactéries lactiques, de *Bacillus cereus* et de levures dans les fèves fraîches. A partir du deuxième jour d'incubation, les levures et moisissures ont proliféré dans les cinq échantillons de fèves fraîches.

❖ Cas des fèves fraîches

Les microorganismes étudiés dans les fèves fraîches n'ont pas proliféré. Les moisissures font exception avec des charges allant de $0,21 \cdot 10^4$ à $0,89 \cdot 10^4$ UFC/g dans les échantillons.

Tableau II: Germes présents dans les fèves fraîches de cacao à Tagoura.

Type d'échantillon	Bactéries lactiques	Levures	Moisissures	<i>Bacillus cereus</i>
E1	nd	nd	$0,20 \cdot 10^4 \pm 19,9^a$	nd
E2	nd	nd	$0,18 \cdot 10^4 \pm 25,9^a$	nd
E3	nd	nd	$0,19 \cdot 10^4 \pm 15,3^a$	nd
E4	nd	nd	$0,24 \cdot 10^4 \pm 14,6^a$	nd
E5	nd	nd	$0,30 \cdot 10^4 \pm 13,8^a$	nd

Dans une même colonne, les valeurs affectées de la même lettre sont statistiquement identiques, au seuil de 5 %. ($P > 0,05$) (Tukey, HSD). nd : Non détectable.

Tableau III : Germes présents dans les fèves fraîches de cacao à Zaguiguia

Type d'échantillon	Bactéries lactiques	Levures	Moisissures	<i>Bacillus cereus</i>
E1	nd	nd	nd	nd
E2	nd	nd	$0,10.10^4 \pm 12,6^a$	nd
E3	nd	nd	$0,13.10^4 \pm 11,0^a$	nd
E4	nd	nd	$0,18.10^4 \pm 18,3^a$	nd
E5	nd	nd	$0,17.10^4 \pm 12,6^a$	nd

Dans une même colonne, les valeurs affectées de la même lettre sont statistiquement identiques, au seuil de 5 %. ($P > 0,05$) (Tukey, HSD). nd : Non détectable.

Tableau IV : Germes présents dans les fèves fraîches de cacao à Gbokora

Type d'échantillon	Bactéries lactiques	Levures	Moisissures	<i>Bacillus cereus</i>
E1	nd	nd	nd	nd
E2	nd	nd	$0,09.10^4 \pm 22,4^a$	nd
E3	nd	nd	$0,11.10^4 \pm 15,3^a$	nd
E4	nd	nd	$0,13.10^4 \pm 16,7^a$	nd
E5	nd	nd	$0,16.10^4 \pm 10,2^a$	nd

Dans une même colonne, les valeurs affectées de la même lettre sont statistiquement identiques, au seuil de 5 %. ($P > 0,05$) (Tukey, HSD). nd : Non détectable.

❖ Cas des fèves fermentées

Chez les fèves fermentées, tous les microorganismes étudiés ont proliféré sur les cinq échantillons lors des analyses à partir du premier jour

Les échantillons E4 et E5 (cabosses tachetées) présents les plus fortes charges.

Tableau V : Germes présents dans les fèves fermentées de cacao à Tagoura

Echantillon	Bactéries lactiques	Levures	Moisissures	<i>Bacillus cereus</i>
E1	$2,69.10^4 \pm 64,3^a$	$1,90.10^4 \pm 112^b$	$1,36.10^4 \pm 72,6^c$	$2,89.10^4 \pm 184,1^d$
E2	$2,80.10^4 \pm 81,5^a$	$3,01.10^4 \pm 133,6^b$	$0,87.10^4 \pm 100,3^c$	$3,19.10^4 \pm 192,6^d$
E3	$2,86.10^4 \pm 69,1^a$	$3,66.10^4 \pm 159,6^b$	$0,93.10^4 \pm 91,6^c$	$2,87.10^4 \pm 197,3^d$
E4	$3,01.10^4 \pm 99,4^a$	$3,12.10^4 \pm 118,3^b$	$1,62.10^4 \pm 51,6^c$	$3,66.10^4 \pm 206,9^d$
E5	$2,97.10^4 \pm 106,8^a$	$3,29.10^4 \pm 314,8^b$	$1,25.10^4 \pm 92,3^c$	$3,20.10^4 \pm 243,2^d$

Dans une même colonne, les valeurs affectées de la même lettre sont statistiquement identiques, au seuil de 5 %. ($P > 0,05$) (Tukey, HSD).

Tableau VI : Germes présents dans les fèves fermentées de cacao à Zaguiguia

Echantillon	Bactéries lactiques	Levures	Moisissures	<i>Bacillus cereus</i>
E1	$1,98.10^4 \pm 68,8^a$	$2,46.10^4 \pm 103,9^b$	$0,88.10^4 \pm 70,7^c$	$2,68.10^4 \pm 208,7^d$
E2	$1,92.10^4 \pm 84,6^a$	$2,91.10^4 \pm 80,0^b$	$1,71.10^4 \pm 65,5^c$	$2,92.10^4 \pm 132,6^d$
E3	$2,60.10^4 \pm 109,1^a$	$3,39.10^4 \pm 265,8^b$	$1,84.10^4 \pm 50,2^c$	$1,89.10^4 \pm 425,1^d$
E4	$2,77.10^4 \pm 107,3^a$	$3,61.10^4 \pm 163,1^b$	$1,88.10^4 \pm 56,7^c$	$2,77.10^4 \pm 312,9^d$
E5	$2,71.10^4 \pm 100,6^a$	$3,24.10^4 \pm 128,6^b$	$1,72.10^4 \pm 71,0^c$	$2,89.10^4 \pm 169,0^d$

Dans une même colonne, les valeurs affectées de la même lettre sont statistiquement identiques, au seuil de 5 %. ($P > 0,05$) (Tukey, HSD).

Tableau VII : Germes présents dans les fèves fermentées de cacao à Gbokora

Echantillon	Bactéries lactiques	Levures	Moisissures	<i>Bacillus cereus</i>
E1	$2,61.10^4 \pm 97,2^a$	$1,77.10^4 \pm 88,7^b$	$1,20.10^4 \pm 34,6^c$	$1,94.10^4 \pm 207,5^d$
E2	$2,73.10^4 \pm 89,5^a$	$1,60.10^4 \pm 71,1^b$	$1,42.10^4 \pm 68,9^c$	$1,85.10^4 \pm 201,4^d$
E3	$2,63.10^4 \pm 87,5^a$	$2,03.10^4 \pm 103,0^b$	$1,67.10^4 \pm 55,3^c$	$2,98.10^4 \pm 109,6^d$
E4	$2,84.10^4 \pm 93,6^a$	$2,15.10^4 \pm 140,6^b$	$2,13.10^4 \pm 59,6^c$	$3,16.10^4 \pm 143,1^d$
E5	$2,70.10^4 \pm 116,7^a$	$2,08.10^4 \pm 97,3^b$	$1,68.10^4 \pm 92,6^c$	$2,77.10^4 \pm 322,2^d$

Dans une même colonne, les valeurs affectées de la même lettre sont statistiquement identiques, au seuil de 5 %. ($P > 0,05$) (Tukey, HSD).

2. Comparaison des microorganismes présents dans les fèves fraîches et les fèves fermentées.

La charge microbienne dans les fèves testées varie d'un état à un autre (frais ou fermentées). Ainsi la charge microbienne en *bacillus cereus*, en levures, en moisissures et en bactéries lactiques dans les fèves fermentées est plus élevée que celle dans les fèves fraîches.

- **Bactéries lactiques**

Il y'a une absence de germe dans les fèves fraîches. Sur les fèves de cacao fermentées, les germes ayant proliférés dans les boîtes de Pétri sont de très petites colonies sous formes de coques et de couleurs blanchâtre et jaunâtre (figure 8 montrant la présence de bactéries lactiques).

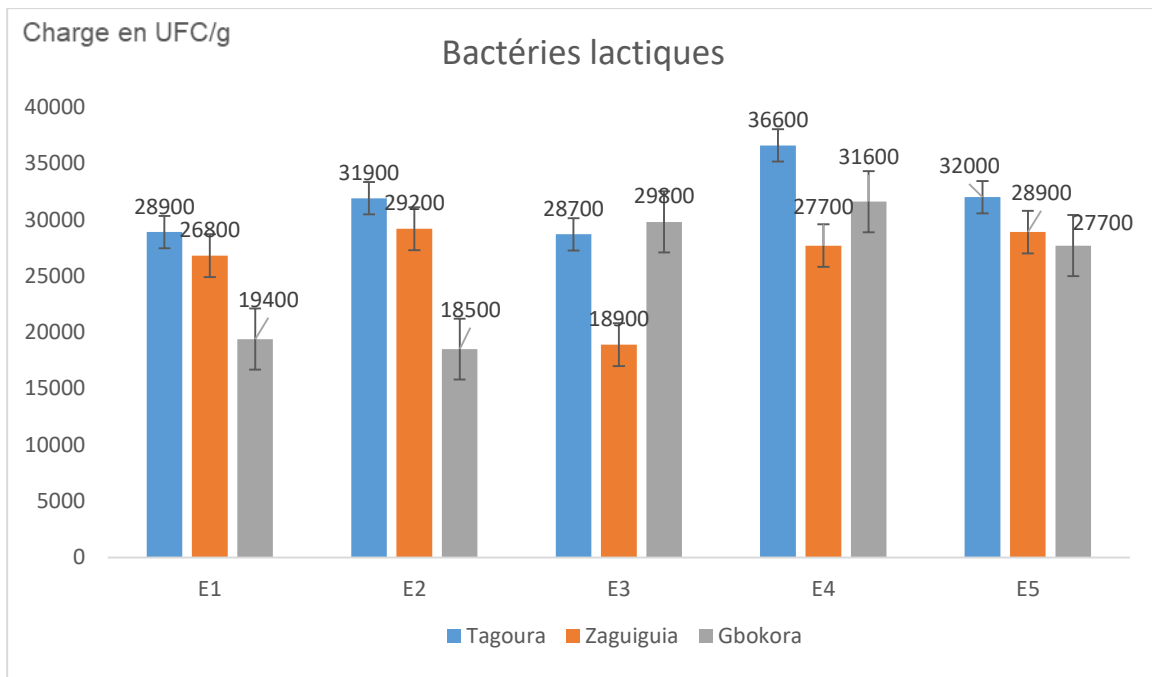


Figure 8 : Bactéries lactiques présents dans les fèves fraîches et fermentées

- **Levures**

Aucun germe présent dans les fèves fraîches. Chez les fèves fermentées, c'est à partir du deuxième jour d'incubation qu'un nombre considérable de microorganismes a pu être visible avec de petites colonies blanches désignant les levures avec des colonies atteignant 3 à 4 μm (ci-dessous la figure 9 indiquant l'évolution des levures.)

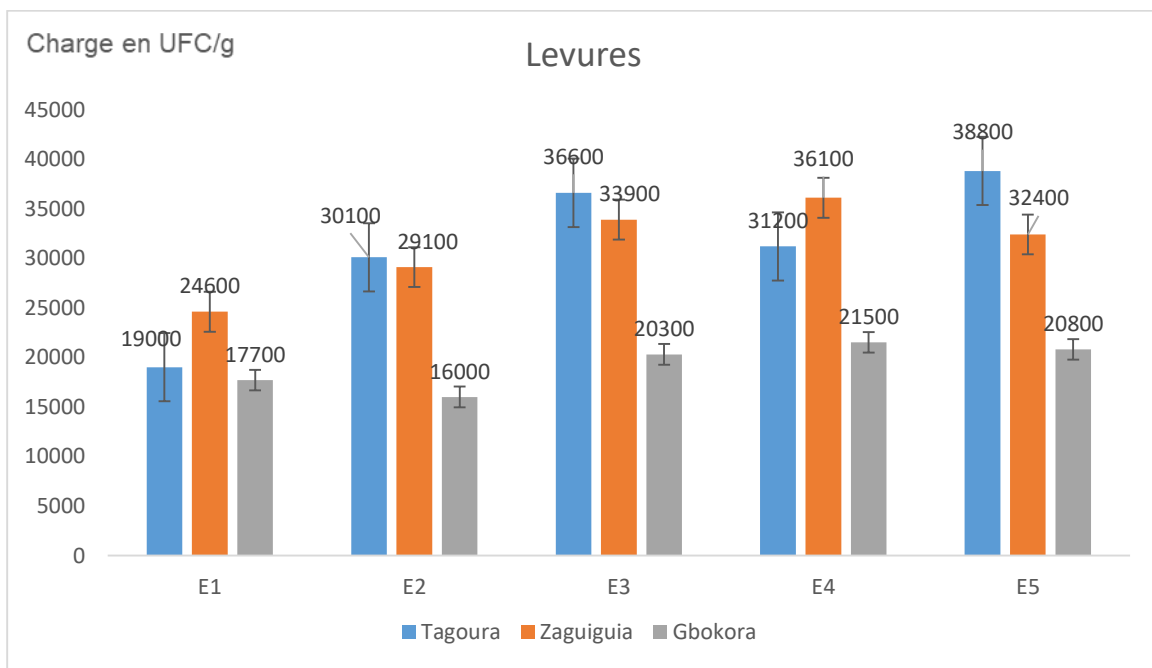


Figure 9: Levures présents dans les fèves fermentées de cacao

- **Moisissures**

Chez les moisissures, les germes étudiés ont été observés sur les fèves fraîches et sur les fèves fermentées contrairement aux autres germes. (Ci-dessous les figures 10 et 11, indiquant la présence des moisissures dans les différents échantillons).

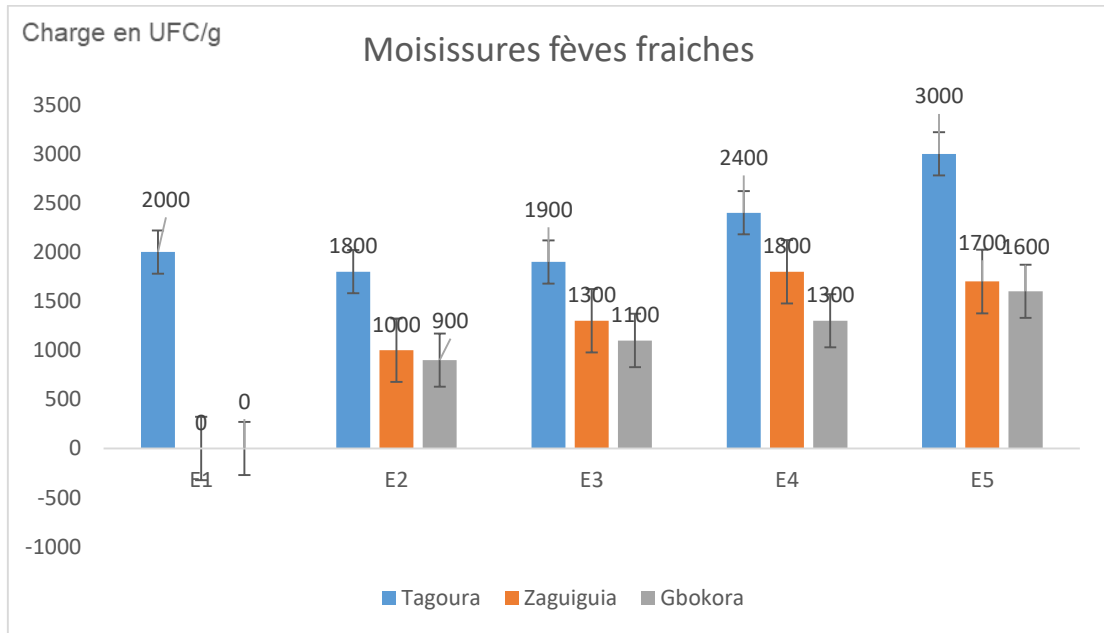


Figure 10: Moisissures présents dans les fèves fraîches de cacao

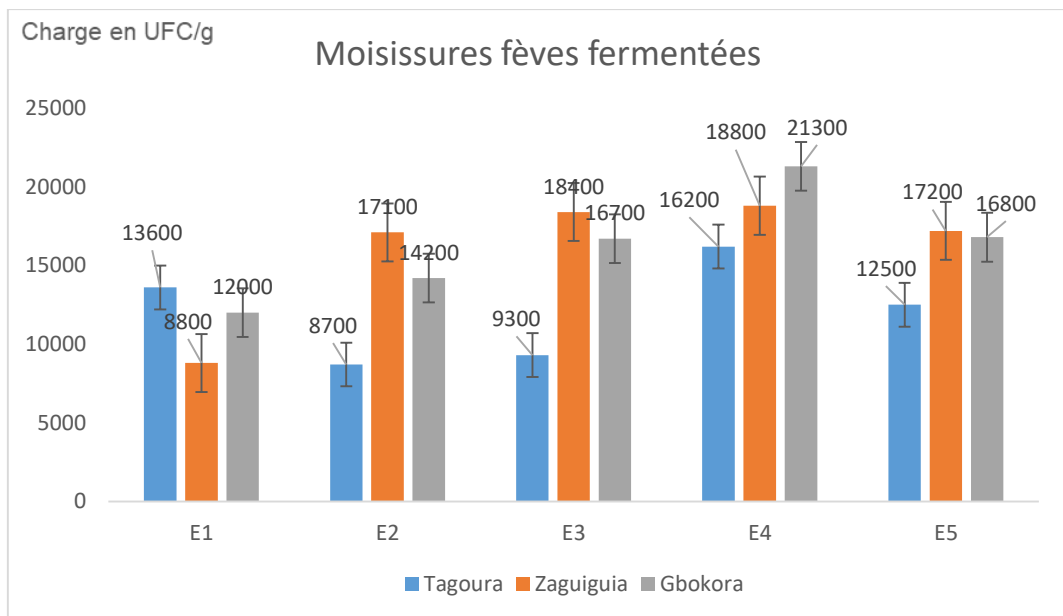


Figure 11: Moisissures présents dans les fèves fermentées de cacao

- *Bacillus cereus*

Il y'a une absence totale de germe de *Bacillus cereus* sur les fèves fraîches contrairement aux fèves fermentées où la majorité des colonies apparait de couleur rose (mannitol négatif) et presque toujours entourées d'un halo de précipité, indiquant la production de lécithinase. (Ci-dessous la figure 12, indiquant la présence de *Bacillus cereus* sur les fèves fraîches).

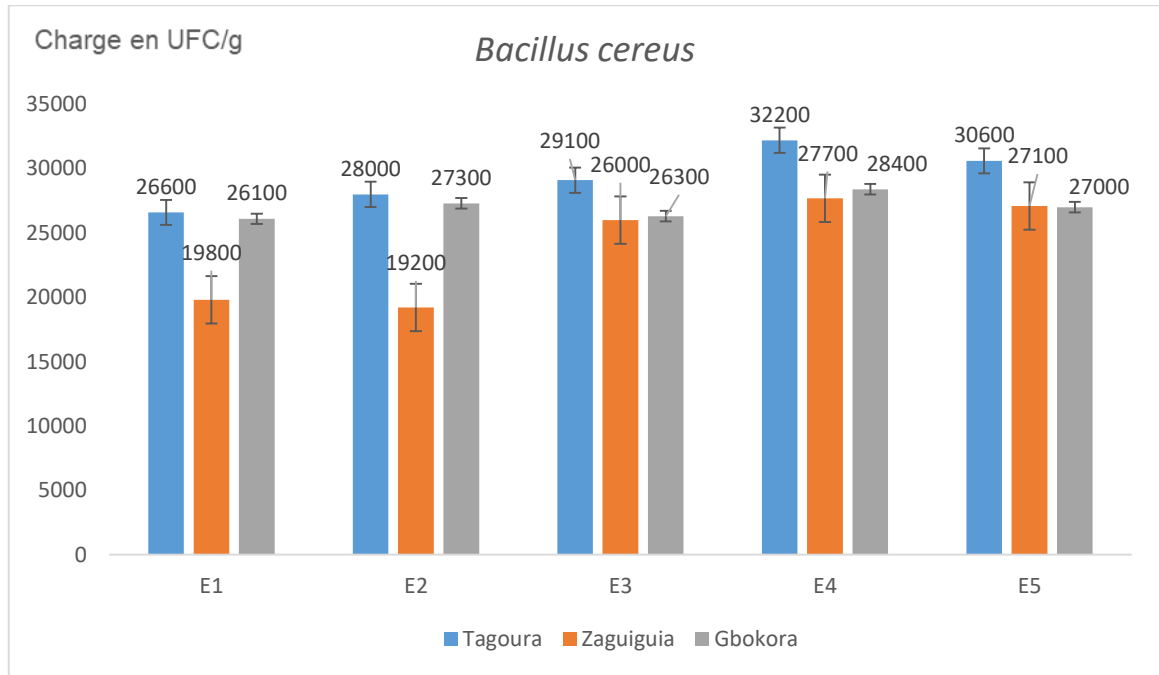


Figure 12 : *Bacillus cereus* présents dans les fèves fermentées de cacao

II. Discussion

La présente étude a pour objectif le dénombrement et la comparaison des germes de *Bacillus cereus*, de bactéries lactiques, de levures et de champignons isolées de la fève fraîche et dans la fève fermentée de cacao.

Dans cette étude, il y'a eu une investigation sur la croissance microbienne du cacao dans les fèves fraîches et dans les fèves fermentées. A l'issue du processus de manutention post-récolte effectué (écabossage et fermentation), l'absence de microorganismes dans les fèves fraîches laisse penser qu'il n'y a pas de conditions favorables à leur développement (Bankoffi *et al.*, 2013) tandis que la présence abondante de germes (bactéries lactiques, *Bacillus cereus*, levures et moisissures) dans les fèves fermentées est due au fait que la fermentation a eu lieu en milieu aérobie. Chez les échantillons des fèves fraîches, c'est uniquement la présence de moisissures qui a pu être observée. Les *Bacillus cereus* et les bactéries lactiques dont l'incubation a duré respectivement 24h et 48h sont absents parce qu'ils n'ont pas pu contaminer les fèves étant donné que le travail a été effectué dans des conditions aseptiques (sous une hotte de laboratoire) (Camu *et al.*, 2007). La présence de moisissures dans les fèves fraîches est provoquée par des pourritures brunes présentes au préalable sur les cabosses pendant la récolte. Ces germes sont issus d'une probable contamination d'ordre exogène. (Bankoffi *et al.*, 2013). Dans les fèves fermentées, les différents échantillons montrent une forte prolifération des microorganismes étudiés.

Ce qui est conforme avec les travaux effectués par (Mounjouenpou, 2008) qui affirme que l'intégrité de la cabosse est à un degré moindre et le délai d'écabossage influencent la diversité qualitative des moisissures. Les moisissures sont retrouvées pour toutes les conditions mais leur nombre varie selon le stade de prélèvement. Des concentrations maximales de $5,5 \pm 1,4 \times 10^7$ UFC.g-1 et $1,4 \pm 0,2 \times 10^7$ UFC.g-1 de moisissures sont obtenues. Le degré d'infection des fèves par les moisissures a été étudié par ensemencement direct sur le milieu de culture. La forte contamination des fèves de cacao par les moisissures est confirmée. Le taux de contamination par les moisissures totales est de 100 % quel que soit le type de traitement. En effet les contaminations des cabosses par les champignons ont entraîné une présence de moisissures sur les fèves lors de l'écabossage (Mounjouenpou, 2008).

Cependant, cette présence de moisissures sur les fèves fraîches pourrait s'expliquer par une mauvaise manipulation durant le processus de préparation des échantillons (Brou, 2018). Avec le dispositif qui exclut toute possibilité de contamination d'ordre exogène des fèves

pendant le stockage, il est donc évident que l'apparition du taux de contamination est due à la présence d'insectes (Brou, 2018). Une présence qui fait suite à l'éclosion de leurs œufs qui se trouvaient préalablement sur ces fèves lors de l'échantillonnage (Brou, 2018).

Ce qui peut signifier que les cabosses de cacao exposées aux insectes peuvent constituer un risque de contamination endogène. Une analyse conforme à celle de (Kra, 2016) qui a étudié et comparé des variétés de souches de moisissures sur différents types de cabosses de cacao. Il s'agit principalement de *Aspergillus carbonarius* productrice d'ochratoxine A et le *rhizopus* qui ne l'est pas. L'étude a démontré que les cabosses abimées, les longs délais d'écabossage produisent des taux de fèves moisies élevés pouvant atteindre parfois $55,67.10^4 \pm 7,17$ UFC/g. Ce qui pourrait signifier que l'état de la cabosse peut influencer la présence de moisissures sur les fèves fraîches de cacao (Kra, 2016).

Alors que pendant la fermentation la population fongique varie en fonction de certains paramètres physicochimiques (Kouadio, 2015). L'étude menée par (Kouadio, 2015) explique la quantité importante des moisissures sur les fèves fermentées par rapport aux fèves fraîches par humidité et le pH. La présence de moisissures augmente proportionnellement avec l'humidité et diminue avec l'augmentation de la valeur du pH (Kouadio, 2015). Des paramètres qui sont influencés par la méthode et la durée de fermentation des fèves de cacao. L'étude démontre également les raisons pour lesquelles la présence de moisissures sur les fèves fraîches est inférieure à celles sur les fèves fermentées. Cette présence élevée de champignons peut présenter un risque qualitatif sur les fèves de cacao et pouvant produire des composés à l'origine d'une mauvaise odeur du cacao (Schwan & Wheals, 2004).

L'absence des levures sur les fèves fraîches s'explique par le temps insuffisant pour les fèves de fermenter. Les levures, responsables de la fermentation alcoolique, émergent entre 18 et 24 heures (Schwan & Wheals, 2004). Ce qui explique une forte concentration de levure sur les fèves fermentées dans les trois localités. Selon (Schwan & Wheals, 2004), la présence de levures s'explique par une élévation du pH. Une corrélation également existe entre le taux de levures sur les fèves et le temps de fermentation des fèves. Pour (Tissot, 1936) les levures ne peuvent être présentes initialement en grande quantité sur les fèves fraîches. Car elles ont besoin d'air pour être apportées ou soit elles se trouveraient déjà sur les cabosses. Ce qui n'est pas le cas car les cabosses ont été nettoyées et stérilisées. Elles sont en petit nombre et nécessitent une multiplication avant de déclencher complètement la fermentation (Tissot, 1936).

L'absence des autres microorganismes tels que les bactéries lactiques et les *Bacillus cereus* sur les fèves fraîches peut s'expliquer par des mesures de protection et d'hygiène lors de l'analyse. Ces germes n'apparaissent que pendant la fermentation où interviennent également les paramètres physico-chimiques.

Pour (Ban Koffi *et al.*, 2013), le développement des bactéries lactiques est plus accru sur les fèves fermentées parce que la production d'acide lactique au deuxième jour de fermentation coïncide avec une inflexion du pH. Cette acidification libère donc ces bactéries qui ne peuvent être perçues que les fèves fraîchement obtenues après écabossage (Ban Koffi *et al.*, 2013).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude a porté sur les fèves fraîches et fermentées des fèves de cacao (*Theobroma cacao L.*) de la variété Forastero. Des échantillons de fèves de cacao ont été prélevés dans trois champs de cacao dans la région de Daloa. Les fèves fraîches ont été écabossées et analysées le même jour après la récolte, les autres cabosses ont été fermentées pendant six jours dans des feuilles de bananiers en milieu aérobie. Le but est de déterminer les microorganismes associés à la fève fraîche et à la fève fermentée de cacao. Les études effectuées ont consisté à prélever, ensemercer dans les boîtes de Pétri et incuber à des températures de 30 et 37 degrés. Les levures et moisissures ont étéensemencées avec la gélose Sabouraud, les *Bacillus cereus* avec la gélose Mossel et les bactéries lactiques avec la gélose MRS. Ce sont les moisissures qui ont été identifiées dans les fèves fraîches au deuxième jour d'incubation, et une absence généralisée de *Bacillus cereus*, de levures et de bactéries lactiques. La présence de moisissures dans les fèves fraîches pourrait s'expliquer par une probable contamination d'ordre exogène. La contamination lors de la manipulation des fèves de cacao est due aux pourritures brunes présentes au préalable sur les cabosses lors de la récolte dans les champs de cacao. La pourriture brune des cabosses est une maladie du cacaoyer causée par un champignon parasite du genre *Phytophthora*. Au niveau des fèves fermentées, tous les microorganismes étudiés ont proliféré dans les différents milieux de culture. Pendant les six jours de fermentation les différents microorganismes ont été soit apportés par l'air sur les fèves, soit dans les récipients soit sur les aires de fermentation. Ainsi les microorganismes tels que les *Bacillus cereus*, les bactéries lactiques et les levures et moisissures ne sont pas contenus naturellement dans les fèves de cacao.

Cette étude montre également que la fermentation a permis d'observer une croissance microbienne bien plus importante dans les fèves fermentées que celle contenue dans les fèves fraîches. La quantité de souches dépend du temps de fermentation et du type de cabosse.

Néanmoins, les résultats de ce travail demandent une amélioration au niveau de qualité des fèves ainsi que des cabosses de cacao en tenant compte des perspectives suivantes :

- Approfondir davantage les recherches pour identifier et étudier les germes et les conséquences qu'ils peuvent causer aux fèves de cacao.
- Investiguer d'autres sites de productions de cacao pour mieux cerner la qualité des fèves de cacao issues de ce type de fermentation.

REFERENCES

- Adjiri A., Kone B., Aka Natchia., Djabakate I. & Dibi B. (2019). Caractérisation physico-chimique et source de la minéralisation des eaux souterraines des départements de Daloa et Zoukougbeu, Côte d'Ivoire. Laboratoire des Sciences et Technologies de l'Environnement (LSTE), UFR Environnement, Université Jean Lorougnon GUEDE. 13(4): 2388-2401
- Afoakwa E., Kongor J., Takrama J. & Budu A. (2013). Changes and nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp preconditioned cocoa (*Theobroma cocoa L.*) beans. *International Food Research Journal*, 20 (4): 1843-1853.
- Anitha N. (2018). Chocolate Tree - Everyone's Favorite Tree, www.trustbasket.com/blogs consulté le 06/11/2020. 9p.
- Antoine F. (2009). Moisissures prévention et lutte, Brochures de recommandations et de conseil, <http://arch.arch.be/docs/brochures/moisissures-prevention-et-lutte.pdf> consulté le 13/11/2020. 47p.
- Aquaportail (2020). Définition de mannitol, <https://www.aquaportail.com/definition-> consulté le 24 octobre 2020. 3p.
- Ardhana M. & Fleet G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa fermentations in Indonesia. *International journal of Food Microbiology*, 86 : 87-99.
- Attafi B. (2013). La gestion de risque de prix liée à la commercialisation du cacao en Côte d'Ivoire. Mémoire de Master, IFPG-ISFPT école supérieure internationale des matières premières, Korhogo, Côte d'Ivoire, 52 p.
- Bankoffi L., Ouattara G. H., Karou T. G., Guehi S. T., Nemlin, J. G., & Diopoh J. K. (2013). Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *Agronomie Africaine*, 25(2): 159-170.
- Barel M. (2013). Qualité du cacao: l'impact du traitement post-récolte, *Savoir faire*, Editions Quae, (Versailles, France), 54 p.

- Bertazzo A., Comai S., Mangiarini F., & Chen S., (2013). Composition of Cacao Beans Chocolate in Health and Nutrition, *Nutrition and Health*, Totowa, New Jersey, United States of America, 105p.
- Bertin M-A. & Lefebvre S. (2010). *Theobroma cacao* L., le cacaoyer. Editions Exode tropical, France 24 p.
- Brou J. K., Irie Bi. Z. N'goran K. E., Brou K., Acka E. D. & Kone D. (2018). Caractérisation des insectes et des champignons infestant les fèves de cacao dans les principales zones de productions en Côte d'Ivoire, Université Felix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 298p.
- Camu N., De Winter T., Verbrugghe K., Cleenwerck I., Vandamme P., Takrama J. S., Vancanneyt M. & De Vuyst L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied Environmental Microbiology*, 73 :1809 - 1824.
- Carré-Mlouka A. (2019). Diversité et mécanismes moléculaires dans les interactions biotiques des microorganismes environnementaux. Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Université de Montpellier, France, 37 p.
- CCI (2001). Cacao. Guide des Pratiques Commerciales, Centre du Commerce International CNUCED/OMC, Genève, Suisse, 190 p.
- Chabasse D., Bouchara J.P., Brun S., Cimon B. & Penn P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation Biologie Médicale*, 25: 17-20.
- Chen M.L. & Tsen H.Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene-based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, London 92(1): 912– 919.
- Dassy B. (2018). Levures et métabolisme fermentaire, Physiologie de la biosynthèse du polyoside capsulaire par staphylococcus aureus. *Microbiology Society*, Paris, France, 30 p.

- De Buyser M-L, Hennekinne J-A., & Dragacci S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation, *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4): 815–836.
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. & Whitman W. B. (2009). Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *listeria*. *Bergey's manual of systematic biology – The Firmicute*, 3, Springer édition, New York, USA, 19 p.
- Euzéby J. P. (2013). Lactobacilles ingluviei. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/> Consulté le 14/11/2020. 11p.
- Gilet F. (2006). Le cacao : des Olmèques au XXIème siècle. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Nantes, Faculté de pharmacie, Nantes, France, 228 p.
- Guehi T. S., Konan Y. M., Koffi-Nevry R., N'dri D. Y. & Manizan N. P. (2007). Enumeration and identification of main fungal isolates and evaluation of fermentation's degree of Ivorian raw cocoa beans. *Australian Journal of Basic And Applied Sciences*, 1 (4) : 479 - 486.
- Guéhi T.S., Dabonne S., Ban-Koffi L., Kedjebo D.K., & Zahouli G. B. (2010). Effect of tunding beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2 (3): 163-171.
- Guillaume P.Y. (2004). La microbiologie : Les milieux de cultures en boite. <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html>, consulté le 06/11/2020.
- Guiraud J.P. (2012). Microbiologie alimentaires, collection Industries agroalimentaires Edition Dunod, Paris, France : 301-305.
- ICCO (2019). Guidelines on best known practices in the cocoa value chain (CS-16-Rev 1). http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc_download/119-manual-of-best-known-practices-incocoa-production.html. Consulté le 24/10/2020. 41p.

- Idoui T. (2009). Activité probiotique de *Lactobacillus plantarum*: étude réalisée chez le poulet de chair Isa 15. Laboratoire de pharmacologie et phytochimie U- Jijel, Laboratoire de biologie des microorganismes et biotechnologie U- Essenia Oran, Algérie, 39p.
- Jean C. (2020). Cacao, le stimulant qui fait plaisir. darwin nutrition, <https://www.darwin-nutrition.fr/super-aliments/cacao/> Consulté le 24/10/2020. 19p.
- Kongor JE., Hinneh M., Van de Walle D., Afoakwa EO., Boeckx P., & Dewettinck K. (2016). « Factors Influencing Quality Variation in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Flavour Profile — A Review ». *Food Research International*, 82 p.
- Koua S. H., Coulibaly N. A. & Alloue-Boraud W. A. M. (2018). Caractérisation vergers et des maladies de cacao de la Côte d'Ivoire: cas des départements d'Abengourou, Divo et Soubré, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 35(3): 5706-5714.
- Kouadio A. K. A. (2015). Etude de la qualité physico-chimique et mycologique du cacao (*Theobroma cacao* L.) produit dans les zones de Yamoussoukro et Soubré (Côte d'Ivoire), *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 13 (1) : 330-340
- Kouakou B. J., Irie Bi Z., Dick E., Nemlin G. & Bomisso L. E. (2013). Caractérisation des techniques de séchage du cacao dans les principales zones de production en Côte d'Ivoire et détermination de leur influence sur la qualité des fèves commercialisées. Laboratoire de Physiologie Végétale, Abidjan, Côte d'Ivoire, 206 p.
- Kra K. (2016). Effet des traitements technologiques post-récolte sur la contamination du cacao (*Theobroma cacao* L.) par les moisissures mycotoxigènes et l'ochratoxine A. Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, 196 p.
- Krysiak W. (2011). Effects of convective and microwave roasting on the physicochemical properties of cocoa beans and cocoa butter extracted from this material. *Grasas y Aceites*, 62(4): 467-478.
- Larpent J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne, Les principaux groupes bactériens, *Lavoisier*, Paris, France, 180 p.
- Linné C. V. (1753). Systematique du cacao, *Species Plantarum*, Stockholm, Suède. 1200 p.

- Medane H. (2017). Identification et caractérisation de la thermorésistance des spores *Bacillus cereus* isolées de la poudre de cacao. Mémoire de Master, Science des Aliments, UFR des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, 96 p.
- Morisset D. (2003). Etude des relations structure/fonction d'une bactériocine anti-Listeria, la mésentéricine Y105. PhD thesis, Université de Poitiers, Poitiers, France, 247 p.
- Mounjouenpou P. (2008). Aspergillus noirs producteurs d'ochratoxine A dans le cacao Biodiversité et incidence des traitements post-récolte au Cameroun. Thèse en microbiologie : sciences des aliments, UFR Sciences et Techniques du Languedoc, Université Montpellier 2, Montpellier, France, 156 p.
- N'goran M. E. (2015). Suivi de la transformation des fèves de cacao et application de l'HACCP au niveau de l'entreprise SACO en Côte d'Ivoire. Mémoire de Master, UFR des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université 8 mai 1945 Guelma, Guelma, Algérie, 65 p.
- National Cholesterol Education Program (2000). National Institutes of Health. Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Bethesda, Maryland: US Department of Health and Human Services, <http://www.nhlbi.nih.gov/about/ncep/index.htm> consulté le 14/11/2020. 15p.
- Nielsen D. S., Teniola O. D., Ban-Koffi L., Owusu M., Anderson T. S. & Holzapfel W. H. (2007). The microbiology of ghanian cocoa fermentation analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 168-186.
- OCDE (2007). Le cacao, L'atlas de l'intégration régionale est une initiative de la CEDEAO et du CSAO. www.atlas-ouestafrique.org/ consulté le 15/10/2020. 33p.
- Ouattara H. G., Reverchon S., Niamke S. L. & Nasser W. (2011). Molecular identification and pectate lyase production by Bacillus strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 28: 1-8.

- Redgwell R. J., Trovato V., Merinat S., Curti D., Hediger S. & Manez A., (2003). Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81 : 103- 112.
- Saad N. (2010). Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299 avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de doctorat, UFR de science alimentaire, Université de Limoges, France, 221 p.
- Schwan R. & Wheals A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1): 205-222.
- Shittu T.A. & Badmus B.A. (2009). Statistical correlations between mineral element composition, product information and retail price of powdered cocoa beverages in Nigeria. *Journal of food composition and analysis*, 22(2): 212-217.
- Siret-Robert T. (2014). Les normes nutritionnelles, le chocolat de C à T, <http://blog.univ-angers.fr/chocolatdecats/tag/nutritionnelle/> Consulté le 24/10/2020.
- Tissot P. (1936). La fermentation du cacao, *Journal d'Agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 176 : 264-276.
- Traoré K. (2019). Enjeux socio-économiques des forêts classées ivoiriennes et conflits intercommunautaires à l'ouest de la Côte d'Ivoire : une question de business ou un défi de développement durable ?, UFR des sciences sociales, Département de sociologie, Université Peleforo Gon Coulibaly de Korhogo, Côte d'Ivoire. 15(1) 110-141.
- Vilas B. (2002). L'expression « groupe *Bacillus cereus* » est en fait une nomenclature considérée comme empirique et non- taxonomique, Porto, Portugal, 14 p.
- Walter P. H. & Hertel C. (2009). The firmicutes. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, Second edition, Heidelberg, New York, 36 (3): 465-511.

RESUME :

Cette étude a eu pour objectif de rechercher les germes en l'occurrence les *Bacillus cereus*, les levures, les moisissures et les bactéries lactiques dans les fèves fraîches et fermentées de cacao. Les échantillons ont été prélevés dans trois champs de cacao de la localité de Daloa. Un total de 30 échantillons a été prélevé. Lors de l'analyse, il y a eu l'utilisation de la gélose Mossel pour la détermination des *Bacillus cereus*, la gélose Sabouraud + chloramphénicol pour les levures et les moisissures et la gélose MRS pour les bactéries lactiques. Il y'a présence de plusieurs souches bactériennes dans les fèves fermentées ayant des charges allant jusqu'à $2,13 \cdot 10^4$, $3,88 \cdot 10^4$, $3,22 \cdot 10^4$ et $3,66 \cdot 10^4$ UFC/g qui correspondent respectivement aux moisissures, aux les levures, aux bactéries lactiques et aux *Bacillus cereus* tandis que seules les moisissures ont proliféré dans les fèves fraîches avec des charges allant jusqu'à $0,89 \cdot 10^4$ UFC/g. L'étude a montré que les fèves fraîches ne contiennent pas de microorganisme et que les germes présents sur les fèves fraîches sont d'origine exogène.

Mots clés : Cacao, fèves fraîches, fermentations, microorganismes

ABSTRACT:

The objective of this study was the research of *Bacillus cereus*, yeasts, molds and lactic acid bacteria in fresh and fermented cocoa beans. The samples were taken from three cocoa fields around the town of Daloa. A total of 30 samples were taken. During the analysis, there was the use of Mossel agar for the determination of *Bacillus cereus*, Sabouraud agar + chloramphenicol for yeasts and molds and MRS agar for lactic acid bacteria. There is the presence of several bacterial strains in fermented beans with loads of up to $2.13 \cdot 10^4$, $3.88 \cdot 10^4$, $3.22 \cdot 10^4$ and $3.66 \cdot 10^4$ CFU/g which correspond respectively to molds, yeasts, and bacteria. lactic acid bacteria and *Bacillus cereus*, while only molds proliferated in the fresh beans with loads of up to $0.89 \cdot 10^4$ CFU/g. The study showed that fresh beans do not contain microorganisms and that the germs present in fresh beans are of exogenous origin.

Key words: Cocoa, fresh beans, fermentation, microorganisms