

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU



Ecole Doctorale
Sciences et Technologies

N ° d'ordre : 194

Laboratoire de Biochimie Alimentaire,
Enzymologie, Biotechnologie Industrielle
et Bioinformatique (BAEBIB)

Thèse Présentée

Par Donatien KABORE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Ouagadougou

Option : Sciences Appliquées

Spécialité : Biochimie/Microbiologie

**ETUDE DES POTENTIALITES METABOLIQUES DES SOUCHES DE
BACTERIES AEROBIES MESOPHILES ET DE BACTERIES LACTIQUES
EN VUE D'UNE PRODUCTION CONTROLEE DU *MAARI***

Soutenue le : 28 Janvier 2012

Devant le jury composé de:

Président : Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

Membres : -Mamoudou H. DICKO, Maître de Conférences, Université de Ouagadougou, Burkina Faso (Directeur de thèse)

-Lamine Said BABA-MOUSSA, Maître de conférences, Université d'Abomey-Calavi, Benin (Rapporteur)

-Bréhima DIAWARA, Maître de Recherches, DTA/ IRSAT/ CNRST, Burkina Faso

CITATION

<< Il n'y a pas une plante sur la terre qui n'ait quelques rapports avec les besoins de l'Homme et ne servent quelque part à sa table, à son vêtement, à son toit, à ses plaisirs, à ses remèdes ou au moins à son foyer >>

Bernadin de Saint Pière, 1794

DEDICACE

Je dédie cette thèse:

- *À mon père, à ma mère ainsi qu'à mes parents adoptifs pour tout ce qu'ils ont fait pour moi tout au long de mes études...*
- *À ma Chérie Noëlle et notre fils Dona P. Christophe pour leurs patience, compréhension, soutien, encouragements,... qui, à aucun moment, n'ont fait défaut.*
- *À tous mes frères et soeurs qui ne cessent de m'encourager...*
- *À tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail!*

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé grâce à la contribution de plusieurs collaborations de recherche impliquant plusieurs laboratoires dont le laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB) de l'Université de Ouagadougou, le laboratoire du Département Technologie Alimentaire du Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (DTA/IRSAT/CNRST, Burkina Faso) et le laboratoire de Microbiologie de l'Université de Copenhague (Faculty of Life Sciences, Department of Food Science, Danemark). Cette thèse a été conduite sous la direction et les co-directions suivantes :

- Pr. Mamoudou H. Dicko, Directeur du Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB), Directeur de la présente thèse ;
- Dr Bréhima DIAWARA, Directeur de l'IRSAT (Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies)/CNRST, co-Directeur de thèse ;
- Pr. Mogens Jakobsen, Professeur Titulaire, Manager Principal du projet DANIDA (Danish International Development Assistance), Responsable du laboratoire Food Microbiology/Department of Food Sciences/ Faculty of Life Sciences/ University of Copenhagen-Denmark, co-Directeur de thèse.

Le travail a été soutenu financièrement et matériellement par le projet DANIDA à travers son volet «Capability Building for Research and Quality Assurance in Traditional Food Processing in West Africa / Project n° 104. Dan.8.L. 1101». Nous exprimons notre profonde reconnaissance à l'organisation danoise DANIDA.

REMERCIEMENTS

Ce document est le fruit des efforts conjugués de nombreuses personnes. Avec un coeur plein de reconnaissances, je prie ces personnes de bien vouloir accepter mes sincères et profonds remerciements.

Je témoigne ma reconnaissance aux illustres rapporteurs et membres du jury qui me font l'honneur de juger notre travail. Il s'agit de Pr. Alfred S. TRAORE (Président du jury), Pr. Mogens JAKOBSEN (co-directeur de thèse et membre du jury), Pr. Mamoudou H. DICKO (Directeur de thèse et membre du jury), Pr. Lamine Said BABA-MOUSSA (rapporteur et membre du jury) et Dr Bréhima DIAWARA (co-Directeur de thèse et membre du jury).

Je remercie sincèrement :

-le Professeur Mogens JAKOBSEN, Responsable du Department of Food Science, Food Microbiology (Université de Copenhague/ Danemark), co-Directeur de cette thèse pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, encadré, soutenu et assisté tout au long de mes travaux;

-le Pr. Mamoudou H. DICKO (Directeur de Thèse) qui a bien voulu accepter mon inscription en Thèse de Doctorat à l'Université de Ouagadougou, dans son laboratoire et sous sa direction. Par ailleurs, nous avons bénéficié de et apprécié ses enseignements et sa disponibilité constante à nous assister et à nous orienter dans notre carrière scientifique. Puisse-t-il trouver à travers ce modeste document, l'expression de toute notre reconnaissance ;

-le Dr Bréhima DIAWARA, Maître de Recherche au DTA/IRSAT/CNRST (co-Directeur de thèse), pour m'avoir confié le projet de thèse, initié aux exigences de rigueurs spécifiques à la recherche, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité, son soutien inconditionnel, son engouement et la grande qualité de l'encadrement dont il a su me faire bénéficier et qui nous a permis d'améliorer nos aptitudes professionnelles dans le domaine des sciences alimentaires ;

-les rapporteurs et les membres du jury, pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail en acceptant de le juger; leur participation au jury me fait un grand honneur ;

-Pr. Dennis S. NIELSEN et Pr. Line THORSEN, pour leurs assistances scientifiques et techniques lors de nos séjours au Department of Food Science, University of Copenhagen. Merci pour leur accueil, leur aide, leur encadrement, leurs conseils ainsi que les corrections des articles. Mes salutations chaleureuses et mes remerciements à Pr. Lene J., Dr Thorben S. Berner (my SDS-PAGE teacher), Dr Vicky L., Filippa, Sally, Stephen, David, James, Simona, Fortune... à toute l'équipe du Department of Food Science (University of Copenhagen) pour leur accueil, leur sympathie et leur aide durant mon séjour à Copenhague ;

- Dr Hagrétou LINGANI-SAWADOGO, Maitre de Recherche au DTA/ IRSAT/CNRST, à qui nous tenons à exprimer nos très vifs remerciements pour sa participation si enrichissante à l'encadrement de cette thèse, son aide, sa disponibilité et pour ses conseils si précieux;
- à tous les enseignants du département de Biochimie-Microbiologie (UFR-SVT) qui ont chacun à un certain moment contribué efficacement à notre formation. Nos sincères remerciements à Pr Nicolas BARRO, Dr Cheick A.T. OUATTARA, Dr Marcel BENGALY;
- Dr Imael H.N. BASSOLÉ, Dr Aly SAVADOGO : vous m'avez toujours considéré comme votre petit frère ; merci pour votre aide, votre soutien et votre assistance ;
- Dr Léquet GANOU, Dr Irène L. OUOBA, Dr Laurencia OUATTARA, Dr Charles PARKOUDA, pour leur aide, pour leurs soutiens, assistance, suggestions et encouragements ;
- Mmes CONGO M. (Tanti Adja), COMPAORE/DAWENDE C., BA HAMA F., SOMDA S., KONATE J., BASSOLÉ B., KONKOBO C., ZIDA K., KERE C., OUEDRAOGO C., OUEDRAOGO S., SAMADOULOUGOU J., Mr COMBARI M. (mon RAQ), Mr BOUGOUMA Boniface, Mr BAYILI R., Raoul D. (le Docteur du DTA), FOFANA, pour leurs soutiens, assistance, suggestions et encouragements ;
- Tout le personnel de l'IRSAT et du DTA ainsi que les stagiaires, pour leurs soutiens et encouragements quotidiens ;
- Que les collègues de promotion trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour leurs contributions diverses à la réalisation de ce travail ;
- Mr BAKI O. et sa famille, Dr NIKIEMA D. pour leur aide et leurs encouragements ;
- Mes amis Philippe C., Denis S., Yaya B., Appolinaire D., Jean Francois O., Nicolas M., Souleymane T., Abel T., Siaka H., Mamadou O., Willy, Djoef, Léon, Dramane, Théoneste ... pour leurs soutiens et aide;
- Agence de Promotion des Produits Forestiers Non Ligneux (APFNL) pour leur aide ;
- Kafando Lazarre et sa famille, les familles Compaoré à Koubri, Kobendé, Ouedraogo, Manly, Dondassé à Ouaga, pour leurs soutiens et aides ;
- A toute l'équipe du laboratoire BAEBIB et de l'imprimerie de l'Université de Ouagadougou ;
- Nous adressons enfin nos remerciements à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS

Sigles Significations

BHI:	Brain Heart Infusion
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
pb :	paire de base
CFA:	Communauté Financière Africaine
CNRST :	Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique
DTA:	Département Technologie Alimentaire
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAO:	Food and Agriculture Organization
h :	Heure
GRAS:	Generally Recognized As Safe
LB :	Luria Bertani
MED:	Ministère de l'Economie et du Développement
MES:	Morpholine Ethane Sulfonic acid
MRS:	De Man, Rogosa, Sharpe
MS :	Matière Sèche
DO :	Densité optique
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase chain reaction
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE :	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
UFC:	Unité Formatrice de Colonie

TABLE DES MATIERES

CITATION	i
DEDICACE.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
ABREVIATIONS.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
RESUME.....	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I. : BIBLIOGRAPHIE	5
1.1. Description botanique du baobab	6
1.2. Compositions et utilisations du baobab.....	7
1.2.1. Composition biochimique	7
1.2.2. Propriétés médicinales.....	11
1.2.3. Utilisations alimentaires	11
1.3. Fermentation alimentaire traditionnelle en Afrique.....	12
1.4. Le <i>maari</i>	14
1.4.1. La technologie de production du <i>maari</i>	14
1.4.2. Valeur nutritive du <i>maari</i>	18
1.4.3. Changements physico-chimiques au cours de la fermentation.....	18
1.4.4. Les microorganismes associés à la fermentation.....	20
1.4.4.1. Les bactéries du genre <i>Bacillus</i>	21
1.4.4.2. Les bactéries lactiques	23
1.5. La nécessité d'optimiser le processus de production du <i>maari</i>	24
1.6. Avantages de l'utilisation de starter pour la fermentation des graines de <i>Adansonia digitata</i>	25

1.7. Les bactériocines	26
1.7.1. Définition	26
1.7.2. Classification.....	27
1.7.3. Domaines d'applications des bactériocines	28
1.7.3.1. Le typage bactérien.....	28
1.7.3.2. Domaine alimentaire	28
1.7.3.3. Domaine de la médecine humaine et vétérinaire	29
1.7.3.4. Domaine agricole.....	30
1.7.3.2. Microorganismes producteurs de bactériocines	30
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	31
2.1. Matériels.....	32
2.1.1. Les souches bactériennes et les conditions de culture	32
2.1.2. Les milieux de culture (solides et liquides)	34
2.1.3. Les tampons et les solutions.....	34
2.1.4. Les enzymes, les kits et les primers.....	34
2.1.5. Les graines de baobab	35
2.1.6. Cadre de l'étude.....	35
2.2. Protocoles des études réalisées	35
2.2.1. Etude de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de <i>Bacillus</i> spp. et <i>Lysinibacillus</i> spp. isolées du <i>maari</i>	35
2.2.1.1. Préparation des inocula des souches de <i>Bacillus</i> spp. et <i>Lysinibacillus</i> spp. isolées du <i>maari</i>	35
2.2.1.2. Préparation de l'extrait de culture	36
2.2.1.3. Essais de l'activité antimicrobienne en aérobie, en micro-aérobie et anaérobie.....	36
2.2.1.4. Effet des enzymes, du pH et la chaleur sur l'activité inhibitrice	37
2.2.1.5. Détermination de la taille des substances antimicrobiennes.....	38
2.2.1.6. Recherche des gènes codant pour la subtiline, la subtilosine, la sublancine et l'ericine	39
2.2.1.7. Séquençage des produits PCR	40

2.2.1.8. Cinétique de croissance et de production de bactériocine par les souches B3, B122 et B222	40
2.2.1.9. Effet de l'aération sur la croissance et la production de bactériocine	41
2.2.2. Influence des conditions de culture sur la production de substances antimicrobiennes par les souches sélectionnées de <i>B. subtilis</i>	41
2.2.2.1. Influence de la composition du milieu d'incubation	41
2.2.2.2. Effet de l'adjonction de minéraux	42
2.2.2.3. Survie de <i>B. cereus</i> en co-culture avec les souches sélectionnées de <i>B. subtilis</i> dans le bouillon BHI, le bouillon <i>maari</i> et les graines bouillies de baobab et de néré.....	43
2.2.3. Propriétés antimicrobiennes, effets de l'acidité et de la bile sur les souches dominantes de bactéries lactiques isolées du <i>maari</i>	43
2.2.3.1. Préparation des inocula des souches de bactéries lactiques isolées du <i>maari</i>	43
2.2.3.2. Effet de l'acidité.....	44
2.2.3.3. Effet de la bile.....	44
2.2.3.4. Activité antimicrobienne.....	45
2.3. Méthodes d'analyses statistiques des données	45
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	46
3.1. Etude de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de <i>Bacillus spp.</i> et <i>Lysinibacillus spp.</i> isolées du <i>maari</i>	47
3. 1.1. L'activité antimicrobienne en aérobie, en microaérobie et anaérobie	47
3. 1.2. Effet des enzymes, du pH et de la chaleur sur l'activité inhibitrice	49
3. 1.3. Détermination du poids moléculaire des substances antimicrobiennes ...	50
3. 1.4. Recherche des gènes codant pour la subtiline, la subtilosine, la sublancine et l'ericine	51
3. 1.5. Cinétique de croissance et de production de bactériocine.....	53
3. 1.6. Effet de l'aération sur la croissance et la production de bactériocine	54
3. 1.7. Le séquençage.....	56
3.2. Influence du substrat sur la production de bactériocine par les souches sélectionnées de <i>B. subtilis</i>	56
3. 2.1. Influence du substrat	56

3. 2.2. Effet de l'adjonction de minéraux	59
3. 2.3. Survie de <i>B. cereus</i> en co-culture avec les souches sélectionnées de <i>B. subtilis</i> dans le bouillon BHI, le bouillon <i>maari</i> et les graines cuites de baobab et de néré	59
3.3. Propriétés antimicrobiennes, effets de l'acidité et de la bile sur les souches dominantes de bactéries lactiques isolées du <i>maari</i>	65
3. 3.1. Effet de l'acidité	65
3. 3.2. Effet de la bile	66
3. 3.3. Activité antimicrobienne	67
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73
ANNEXES: PUBLICATIONS	90

LISTE DES FIGURES

Figures	Intitulés	Pages
Fig. 1:	Le baobab et sa répartition en Afrique	6
Fig. 2:	Les produits du baobab.....	7
Fig. 3:	Diagramme de production du <i>maari</i>	15
Fig. 4:	<i>Maari</i> séché.....	17
Fig. 5:	Structures de la subtiline et de la subtilosine.....	27
Fig. 6:	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines obtenues à partir des surnageants des souches B3, B122 et B222.....	51
Fig. 7:	Electrophorèse des produits PCR obtenus à partir des surnageants des souches de <i>B. subtilis</i> B3, B122 et B222.....	52
Fig. 8 :	Cinétique de production de bactériocine au cours de la croissance de B3, B122 et B222.....	54
Fig. 9 :	Evolution de la population bactérienne des souches de <i>B. subtilis</i> B3, B122 et B222 et de <i>B. cereus</i> NVH391-98 en incubation dans le bouillon BHI à 37°C pendant 40 h.....	60
Fig. 10:	Evolution de la population bactérienne des souches de <i>B. subtilis</i> B3, B122 et B222 et de <i>B. cereus</i> NVH391-98 en incubation dans le bouillon <i>maari</i> à 37°C pendant 40 h.....	61
Fig. 11:	Evolution de la population bactérienne des souches de <i>B. subtilis</i> B3, B122 et B222 et de <i>B. cereus</i> NVH391-98 en incubation dans les graines cuites de baobab à 37°C pendant 40 h.....	62
Fig. 12:	Evolution de la population bactérienne des souches de <i>B. subtilis</i> B3, B122 et B222 et de <i>B. cereus</i> NVH391-98 en incubation dans les graines cuites de néré à 37°C pendant 40 h.....	63
Fig. 13:	Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques L87, L154 et L169 par la méthode des spots.....	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Intitulés	Pages
Tableau I:	Composition biochimique de la feuille, de la graine et de la pulpe de baobab.....	8
Tableau II:	Composition en éléments minéraux de la graine, de la feuille et de la pulpe du baobab.....	9
Tableau III:	Profil en amino acides de la graine, de la feuille et de la pulpe du baobab.....	10
Tableau IV:	Composition en acides gras de la graine, de la feuille et de la pulpe de baobab.....	11
Tableau V:	Exemples d'aliments fermentés alcalins.....	13
Tableau VI:	Evolution des microorganismes au cours de la fermentation du <i>maari</i>	20
Tableau VII:	Quelques microorganismes producteurs de bactériocines.....	30
Tableau VIII:	Les bactéries indicatrices, leur code et leur origine.....	33
Tableau IX:	Les primers utilisés.....	39
Tableau X:	Spectre d'activité antimicrobienne des 10 souches dominantes de bactéries aérobies incubées en aérobic, microaérobic et en anaérobic.....	48
Tableau XI:	Effets des enzymes, de la température et du pH sur l'activité antimicrobienne des souches de <i>B. subtilis</i> B3, B122 et B222.....	49
Tableau XII:	Produits PCR obtenus/ détectés.....	53
Tableau XIII:	Effet de l'aération sur la production de bactériocine et la croissance bactérienne à 37°C des souches sélectionnées de <i>B. subtilis</i> B3, B122 et B222.....	55
Tableau XIV:	Effet de la supplémentation du BHI avec la mouture de graines de baobab sur l'activité antimicrobienne	58
Tableau XV:	Résistance à l'acidité des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du <i>maari</i>	65
Tableau XVI:	La tolérance à la bile des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du <i>maari</i>	66
Tableau XVII:	Spectre de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du <i>maari</i>	68

RESUME

Le baobab (*Adansonia digitata*), une plante de la famille des Malvaceae que l'on retrouve dans les régions tropicales d'Afrique, revêt une importance particulière du fait de son utilisation variée aussi bien alimentaire que médicinale. Le *maari* est un condiment obtenu de la fermentation naturelle des graines de baobab. Dans la présente étude, 10 souches dominantes de bactéries aérobies mésophiles et 09 souches dominantes de bactéries lactiques ont été examinées en vue de la mise au point de culture starters. Les souches de *Bacillus* spp. (8 souches) et de *Lysinibacillus* spp. (2 souches) représentant les bactéries aérobies mésophiles dominantes isolées du *maari*, ont été testées. Les bactéries ont été caractérisées selon la méthode de diffusion en milieu gélosé, pour leur pouvoir antibactérien contre des indicateurs de bactéries pathogènes. Les bactéries pathogènes ciblées étaient constituées de 7 souches de *Bacillus cereus*, 7 souches de *Salmonella* spp., 3 souches de *Listeria* spp., 2 souches de *Yersinia* spp., 1 souche de *Escherichia coli* et 1 souche de *Micrococcus luteus*. Les résultats ont permis de sélectionner 3 souches de *Bacillus subtilis* (B3, B122 et B222) pouvant inhiber la croissance des bactéries pathogènes Gram-positifs. Les substances inhibitrices produites par les 3 souches de *B. subtilis* (B3, B122 et B222) résistent à la catalase mais sont détruites par la protéase provenant de *Streptomyces griseus* et la trypsine ; ce qui indique que les agents actifs sont de nature protéique. Ces substances retiennent leurs activités antimicrobiennes après traitement jusqu'à 121°C et elles sont stables à pH acide et basique. La production de la bactériocine, pour chacune des souches sélectionnées commence dès la fin de la phase exponentielle de croissance de la bactérie productrice et atteint son maximum durant la phase stationnaire. Cette production s'est avérée dépendre de l'aération et est maximale en conditions d'aération modéré. L'utilisation des amorces spécifiques d'ADN a permis de mettre en évidence les gènes responsables de la biosynthèse de la subtiline ainsi que de la subtilosine A. L'étude de l'influence de la composition du milieu de croissance sur la production de bactériocines a été réalisée sur les 3 souches sélectionnées de *B. subtilis* (B3, B122 et B222) isolées du *maari*. Les résultats ont montré que la production des bactériocines

est fortement dépendante de la composition du milieu de croissance. Toutes les 3 souches de *B. subtilis* (B3, B122 et B222) ont présenté une forte activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* NVH391-98 dans le milieu BHI. Aucune activité n'a été détectée dans les graines cuites de baobab et de néré ainsi que dans le bouillon *maari*. Mieux, il a été observé qu'une incorporation du BHI avec 5% de mouture de graines de baobab améliore l'activité antimicrobienne des 3 souches de *B. subtilis*. Cependant, une incorporation du BHI à plus de 50% avec de la mouture de graines de baobab montre une diminution de la production de bactériocine. Le fer, le magnésium et le manganèse sont reconnus comme des éléments minéraux capables d'augmenter la production de bactériocine mais leur incorporation dans le bouillon *maari* s'est montrée sans effet dans la production de bactériocine. La survie de *B. cereus* NVH391-98 en co-culture avec chaque souche de *B. subtilis* a été réalisée dans le BHI, le bouillon *maari*, dans les graines fermentées de baobab et de néré. Les résultats ont montré que chacune des souches de *B. subtilis* tout comme *B. cereus* NVH391-98 ont présenté une bonne croissance dans les 4 substrats. Par contre, la croissance de *B. cereus* NVH391-98 a été sérieusement affectée dans le bouillon *maari* et dans les graines cuites de baobab et de néré bien qu'aucune activité antimicrobienne n'ait été observée. Par ailleurs toutes les 3 souches de *B. subtilis* ont inhibé totalement la croissance de *B. cereus* NVH391-98. En somme, la production de bactériocine par les 3 souches de *B. subtilis* isolées du *maari*, dépend du substrat de croissance.

Les souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari* (5 souches de *Ent. faecium*, 2 souches de *P. acidilactici* et 2 souches de *Ent. Casseliflavus*) ont été examinées pour leur activité antimicrobienne, la résistance à l'acidité ainsi que la tolérance à la bile. Deux souches de *P. acidilactici* (L87 et L169) et une souche *Ent. faecium* (L154) ont présenté une activité antimicrobienne contre une gamme importante de germes pathogènes notamment 7 espèces de *B. cereus*, 7 espèces de *Salmonella* spp., 3 espèces de *L. monocytogenes*, une espèce de *E. coli* et une espèce de *M. luteus*. Les souches L87, L169 et L154 ont également présenté une bonne capacité à survivre dans les conditions acides ainsi qu'en présence de la bile.

Au regard des résultats obtenus, un consortium de starter composé de souches sélectionnées de *B. subtilis* (B3, B122 et B222) et de bactéries lactiques (L87, L154 et L169) s'est révélé efficace pour la fermentation contrôlée des graines de baobab.

Mots clés : Baobab ; Activité antimicrobienne; Bactériocine ; *Bacillus subtilis*; *Maari*; Fermentation; Starter; Substrat d'incubation; Aération; Subtilosine; Subtiline.

ABSTRACT

Adansonia digitata (L.) called the baobab tree is very typical plant of the Sahelian region and belongs to the Malvaceae family. Each part of the baobab tree is reported to be useful. The seeds, leaves, roots, flowers, fruit pulp and bark of baobab are edible. Seeds are used as a thickening agent in soups, but they can be fermented and used as a flavouring agent, or roasted and eaten as snacks. *Maari* is a fermented food condiment obtained by spontaneous fermentation of seeds from the baobab tree.

The antimicrobial activity of 8 *Bacillus* spp. and 2 *Lysinibacillus* spp. representing the dominant aerobic sporeformers during traditional *maari* fermentation was assessed against a total of 31 indicator organisms representing various Gram negative and positive pathogens. The screening showed that 3 *Bacillus subtilis* strains (B3, B122 and B222) in particular had antimicrobial activity against some Gram positive organisms and were selected for further studies. It was found that the antimicrobial substances produced were heat-stable, no-sensitive to catalase, sensitive to protease from *Streptomyces griseus* and trypsin but resistant to the proteolytic action of papain and proteinase K and equally active at pH values ranging from 3 to 11. Bacteriocin secretion started in late exponential growth phase and maximum activity was detected during the stationary growth phase. The production of bacteriocin by *B. subtilis* B3, B122 and B222 was dependent on the aeration conditions. Maximum production of bacteriocin was observed under reduced aeration. Specific DNA primers were used to screen isolates B3, B122 and B222 for genes involved in the synthesis of the bacteriocins subtilosin A, subtilin, sublancin and ericin. Amplicons of the expected sizes were detected for *iywB*, *sboA*, *sboX*, *albA* and *spaS* involved in the biosynthesis of subtilosin and subtilin, respectively. The three bacteriocin-producing *B. subtilis* strains B3, B122 and B222 were investigated for their antimicrobial activity against *Bacillus cereus* NVH391-98 in different media. The production of bacteriocin was greatly influenced by the cultivation media. All three strains showed antimicrobial activity against *B. cereus* NVH391-98 in BHI whereas no antimicrobial activity was detected in cooked seeds and in *maari* broth, based on baobab grinded seeds. Furthermore it was found that the incorporation of BHI

with up to 5% (w/w) baobab grinded seeds enhanced the antimicrobial activity of the *B. subtilis* while incorporation of BHI with 50% (w/w) baobab grinded seeds decreased the antimicrobial activity. Addition of the inorganic salts FeCl₃, MgSO₄ and MnSO₄ have previously been reported to increase the production of bacteriocin in *B. subtilis*, but the addition of these salts either alone or in combination with *maari* broth 10% (w/w) did not cause any antimicrobial activity. The survival of *B. cereus* NVH391-98 in co-culture with *B. subtilis* was tested in BHI broth, *maari* broth 10% (w/w). The same experiment was conducted during fermentation of baobab seeds to *maari* and African locust beans to *soumbala*, an alkaline fermented product related to *maari*. It appeared that *B. cereus* NVH391-98 grew well in all the 4 substrates in mono-culture. All the three *B. subtilis* strains were able to decrease *B. cereus* NVH391-98 to levels below detection limit (< 10 cfu/ml) in BHI. In comparison, even though no bacteriocin production occurred in *maari* broth and in cooked seeds, the outgrowth of *B. cereus* NVH391-98 decreased. *B. cereus* NVH391-98 did not affect the growth of *B. subtilis* B3, B122 and B222 in co-culture. In conclusion, the production of antimicrobial products by the investigated *B. subtilis* strains is highly substrate specific.

Nine dominant lactic acid bacteria strains including 5 strains of *Enterococcus faecium* (L9, L104, L117, L134, L154), 2 strains of *Enterococcus casseliflavus* (L142 et L152) and 2 strains of *Pediococcus acidilactici* (L169 et L87), isolated from traditional *maari* fermentation, were examined for their resistance at pH 2.5, their tolerance to 0.3% bile and their antimicrobial activities against 21 pathogenic bacteria including *B. cereus* strains, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*. It was observed that all LAB strains survived in 0.3% bile and exhibited antimicrobial activity against a broad spectrum of bacteria, including food spoilage and pathogenic organisms such as *B. cereus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* and *M. luteus*. None of the tested LAB strains was active against *Y. enterocolitica* strains. At pH 2.5, *P. acidilactici* L87 survived over a period of 4 h whereas a slight decrease was observed for *Ent. faecium* L169. *Ent. faecium* L154 cell number decreased considerably. The rest of the tested strains did not survive at pH 2.5 over a period of 4 h. Based on the present data, it can be assessed that *P. acidilactici* L87, *P. acidilactici* L169 and *Ent. faecium* L154 in addition to the *Bacillus*

spp. are the main microorganisms responsible of the fermentation of baobab seeds. Thus, these bacteria can be useful as starter cultures for improving *maari* quality and safety with respect to protection against food spoilage and pathogenic microorganisms.

Keywords: Baobab; Antimicrobial activity; Bacteriocin; *Bacillus subtilis*; *Maari*; Fermentation; Cultural medium, Atmosphere, Subtilosin, Subtilin; Lactic acid bacteria; Acid resistance; Bile tolerance.

INTRODUCTION GENERALE

La fermentation alimentaire, l'une des plus anciennes pratiques de biotechnologie, occupe une place qui devient de plus en plus prépondérante dans la vie quotidienne des Hommes. En ce sens, les aliments fermentés contribuent pour 20-40% à l'alimentation dans le monde entier (**Campbell-Platt, 1994**). Par définition, la fermentation est un processus dans lequel un substrat organique subit des transformations chimiques, provoquées par l'action des enzymes produites par des micro-organismes (**Jay, 1996**). C'est une technique de transformation et de conservation des produits alimentaires qui améliore la valeur nutritive, les qualités hygiéniques et sanitaires, la densité énergétique ainsi que les caractéristiques organoleptiques des aliments (**Sawadogo-Lingani et al., 2008 ; Nnam et Obiakor, 2003 ; Nout et al., 1987**).

Le Burkina Faso est un pays soudano-sahélien à vocation agricole avec une population estimée en 2006 à 14 017 262 habitants dont 46,4% vivent sous le seuil de la pauvreté (**MEF, 2011**). La production alimentaire est composée de céréales (aliments de base), de fruits et légumes, de racines et tubercules, d'oléagineux et légumineuses, de produits animaux, de produits halieutiques, de produits de chasse et de produits forestiers non ligneux alimentaires jadis appelés produits de cueillette. Cependant, au cours des dernières années, le Burkina Faso a eu de plus en plus de mal à couvrir les besoins alimentaires de sa population avec la production agricole nationale. En conséquence, des pénuries alimentaires généralisées engendrant la faim et la malnutrition, persistent particulièrement parmi les groupes de population à faible revenu. Selon les résultats de la deuxième enquête nutritionnelle nationale conduite en août et septembre 2010 par le Ministère de la Santé, les prévalences de la malnutrition aiguë, de l'insuffisance pondérale et de la malnutrition chronique ont été estimées respectivement à 10,5 %, 31,4 % et 28,8 % (**Coulidiati, 2011**). Pour redresser cette situation, toutes les ressources nationales doivent être mises à contribution. L'une des stratégies pourrait être la valorisation des produits forestiers non ligneux (PFNL) dont le baobab. Le baobab est une plante de la famille des Malvaceae que l'on retrouve dans les régions tropicales d'Afrique (**De Caluwé et al., 2010**). Le baobab revêt une importance particulière du fait de son utilisation variée aussi bien alimentaire que médicinale. Par exemple, la production annuelle des feuilles de baobab au Burkina

Faso est de l'ordre de 100 000 tonnes avec un produit intérieur brut de l'ordre de 800 millions (Coulibaly, 1993). Le baobab contribue considérablement à l'économie des populations (Lamien et Traoré, 2002) et fait l'objet de diverses utilisations médicinales et alimentaires (Sidibe et Williams, 2002). Essentiellement exploité à l'état sauvage, le baobab produit des fruits dont la pulpe et les graines sont traditionnellement consommées par les populations locales. Ses feuilles sont également utilisées comme ingrédients dans diverses préparations culinaires (Diop et al., 2005).

Les graines de baobab contiennent des quantités appréciables de protéines (25,45% MS), de glucides (48,07% MS) et de lipides (18,87% MS) (Nnam et Obiakor, 2003), de vitamine B1 (0,25 mg/100g MS ; Arnold et al., 1985), de vitamine A (5,26 µg/ 100g MS ; Nkafamiya et al., 2007), de calcium (395 mg/100g MS ; Glew et al., 1997), de fer (6,55 mg/100g MS ; Arnold et al., 1985), de potassium (1275 mg/100g MS ; Arnold et al., 1985), de magnésium (640 mg/100g MS ; Arnold et al., 1985), etc. Les graines sont utilisées comme agents épaississant dans la préparation de mets ; elles sont également fermentées pour être utilisées comme condiments (FAO, 1988; Nnam et Obiakor, 2003). Le *maari* est le produit de la fermentation alcaline et spontanée des graines de baobab. C'est un condiment produit et consommé en Afrique de l'Ouest où il est connu sous les appellations *Dadawa Higgi* ou *Issai* (Nigeria), *Dikouanyouri* (Benin), *N'Gono* (Mali) et *Maari*, *Mackaari*, *Kaando*, *Thyou* ou *Teed bikalgo* (Burkina Faso) (Parkouda et al., 2010; Nkafamiya et al., 2007; Parkouda et al., 2009). Le *maari* contient des quantités appréciables de protéines (22,20% MS), de lipides (30,55% MS), de glucides (42,62% MS) et de sels minéraux (4,63% MS) (Nnam et Obiakor, 2003). Pour la production du *maari*, les graines de baobab sont cuites puis laissées à fermenter pendant 88 h. Le produit obtenu est ensuite séché donnant lieu à un condiment odoriférant de couleur brune foncée (Compaoré, 2009). L'étude des caractéristiques biochimiques et microbiologiques au cours de la production du *maari* a permis d'isoler les microorganismes impliqués dans la fermentation des graines de baobab (Compaoré, 2009) puis de les identifier (Parkouda et al., 2010). Ces différentes études ont montré que la fermentation des graines de baobab est initiée par les bactéries aérobies mésophiles (BAM) notamment les *Bacillus subtilis* (82% des BAM). Mais les bactéries lactiques dominées par *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus* et

Pediococcus acidilactici sont observées à partir de 24 h de fermentation (**Parkouda et al., 2010**) et persistent jusqu'à la fin de la fermentation.

Malgré sa grande valeur nutritive, la production du *maari* reste traditionnelle avec des équipements rudimentaires et une fermentation incontrôlée. Ce qui entraîne des variations de la stabilité et de la qualité du produit fini. Dans le but d'améliorer les qualités nutritionnelle et sanitaire du *maari* et de le rendre commercialement plus compétitif vis-à-vis des condiments importés, il est donc nécessaire d'améliorer la technique de production. L'un des facteurs importants de cette amélioration est l'utilisation de starter de microorganismes à multiples potentialités qui permettra d'assurer la maîtrise de l'étape de fermentation.

L'objectif général de ce présent travail est d'étudier les potentialités métaboliques des souches dominantes de bactéries aérobies mésophiles et de bactéries lactiques en vue de la mise au point de cultures starter pour la production contrôlée du *maari*.

Pour atteindre l'objectif général, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

- évaluer la production de bactériocines par les espèces dominantes de bactéries aérobies mésophiles isolées du *maari* ;
- déterminer l'influence de la composition du milieu d'incubation (substrat nutritif) sur la survie de *Bacillus cereus* et sur la production de bactériocine par les souches sélectionnées de *B. subtilis*;
- évaluer les propriétés antimicrobiennes des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari* ainsi que l'effet de l'acidité et de la bile sur ces souches ;
- sélectionner les souches sur la base de leurs propriétés technologiques puis les utiliser comme cultures starter pour une fermentation contrôlée du *maari* ;
- capitaliser les connaissances sur les microorganismes responsables de la fermentation des graines de baobab ;

Cette thèse comporte une introduction et trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique. Les aspects méthodologiques sont traités dans le second chapitre tandis que le troisième est consacré aux résultats et discussion. Le document se termine par une conclusion générale de l'ensemble des résultats suivie des perspectives.

CHAPITRE I :

BIBLIOGRAPHIE

1.1. Description botanique du baobab

Le baobab (*Adansonia digitata* L.) est un immense arbre qui pousse à l'état sauvage au Burkina Faso. On le rencontre également dans toutes les régions semi-arides et subhumides de l'Afrique intertropicale, ainsi qu'à Madagascar et en Australie. De port majestueux, le baobab, grand arbre à feuillage caduc peut atteindre 30 m de hauteur avec une moyenne de 15-20 m (Figure 1, **Parkouda et al., 2009**). Le tronc disproportionné est souvent renflé à la base et gorgé d'eau, ce qui lui a valu le nom de baobab-bouteille. Il se ramifie souvent en une houppe de branches épaisses, courtes et tortueuses.

Les feuilles sont composées, digitées, longuement pétiolées comprenant 3 à 12 folioles. Le baobab possède un système racinaire développé, pouvant atteindre 50 m de distance et 10 m de profondeur, ce qui permet à l'arbre de puiser en profondeur l'eau nécessaire à sa végétation (**De Caluwé et al., 2010**).

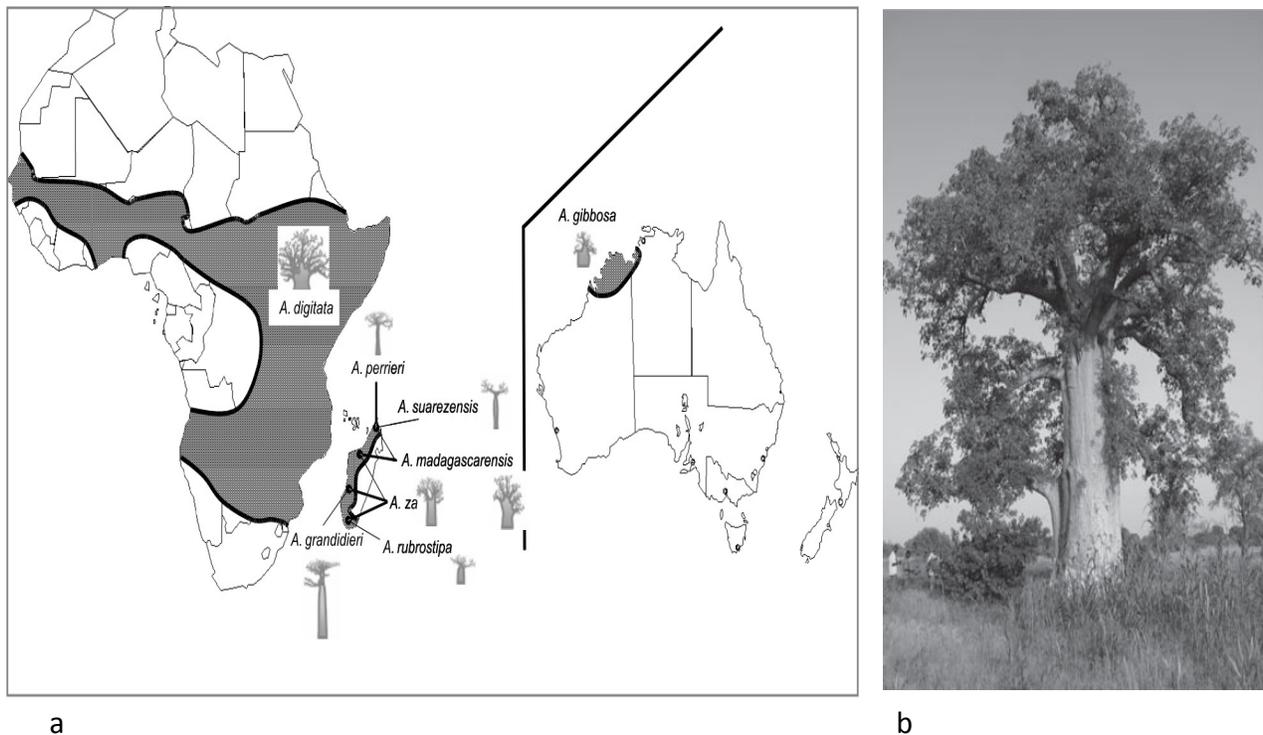


Figure 1. La répartition du baobab (a) en Afrique ; le baobab (b) (Parkouda et al., 2009).

Les fruits, à raison de 70 en moyenne par arbre, se présentent sous forme de masse oblongue fusiforme, sphérique ou en massue (Figure 2). Indéhiscents, ils mesurent 15 à 35 cm de long contre 7 à 15 cm de diamètre et pèsent de 200 à 500 g. Ils sont plus ou moins velus et contiennent plusieurs graines. L'enveloppe dure de la graine renferme une pulpe sèche, blanche, acide, constituée de mucilages et de pectines (**Vertuani et al., 2002 ; Nnam et Obiakor, 2003**).

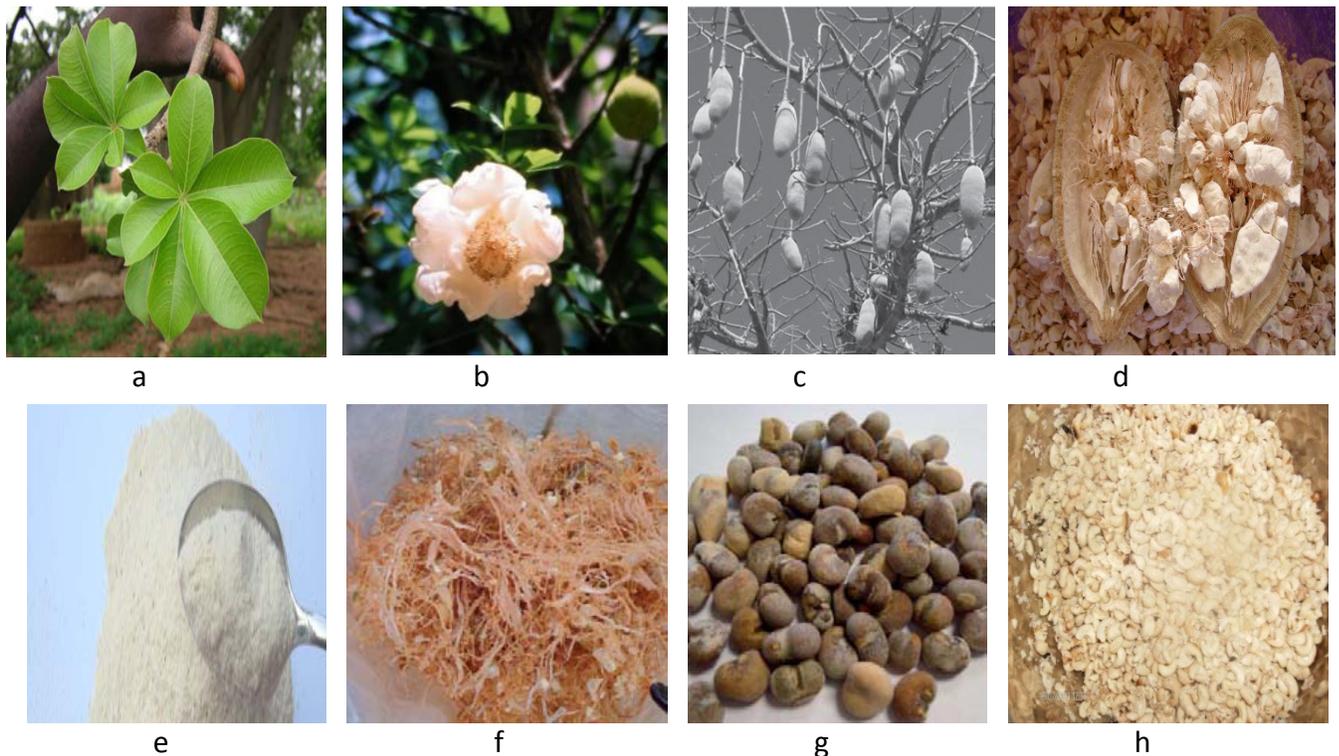


Figure 2. Les produits du baobab: (a) Feuille, (b) Fleur, (c) Fruit, (d) Pulpe, (e) Poudre de pulpe, (f) Fibres, (g) Graines, (h) Amandes (**Kaboré et al., 2011**)

1.2. Compositions et utilisations du baobab

1.2.1. Composition biochimique

Le baobab est un arbre à usage multiples en ce sens que toutes les parties du baobab sont utiles. Les graines, les feuilles, les racines, les fleurs, la pulpe, l'écorce du baobab

sont comestibles. Les données des tableaux I, II, III et IV montrent que la feuille de baobab est riche en protéines, en minéraux (calcium, fer, potassium, magnésium, manganèse, phosphore, et zinc) et en vitamines (A, B1, B2, B3 et C).

Tableau I. Composition biochimique des feuille, graine et pulpe de baobab

Parties du baobab	Constituants							Références
	Humidité (%)	Energie métabolisable (kJ/100g)	Carbohydate (%)	Protéine (%Nx6.25)	lipide (%)	Cendre (%)	Fibre (%)	
Feuilles	NM	1180-1900	13,8-70.0	10,3-15.0	2,3-10	8,5-16	11-16	Diop et al., 2005
	6,4	1480	64,6	14	4,3	10,8	NM	Nordeide et al., 1996
	NM	1180	60	13,4	4	NM	11	Becker, 1983
Pulpe	10,4	1345,26	76,2	3,2	0,3	4,5	5,4	Osman, 2004
	6,7	NM	23,2	2,6	0,2	5,3	5,7	Nour et al., 1980
	4,7	849	46,6	2,5	0,7	5,1	45,1	Murray et al., 2001
	13,2	1542	79,4	3,1	4,3	5	8,3	Saka et Msonthi, 1994
	14,5	846	81,3	2,5	0,8	NM	11,4	Becker et al., 1983
	8,70	1292	73,7	2,7	0,2	5,80	8,9	Arnold et al., 1985
	4,3	1528	45,1	18,4	12,2	3,8	16,2	Osman, 2004
Graine entière	4,71	1875,3	52,53	21,75	12,72	5,01	6,71	Nkafamiya et al., 2007
	4,8	1898	11,2	36,3	29,3	9,1	14,1	Murray et al., 2001
	8,1	2332	30	32,7	34,1	5	NM	Obizoba et Amaechi, 1993

NM: non mentionné dans le document original

Le fruit se compose de 4 à 28 % d'une pulpe à faible teneur en eau, acide, riche en carbohydrates, vitamine C, en calcium, en potassium, en magnésium et en pectine. La pulpe peut fournir jusqu'à 300 mg de vitamine C pour 100 grammes de matière sèche, soit l'équivalent de six à sept fois celle contenue dans une orange. Après séparation des graines, cette pulpe entre traditionnellement dans diverses préparations ou permet d'élaborer des boissons. Malgré une déficience en lysine et la présence de quelques facteurs antinutritionnels, les graines sont une source intéressante de lipides et de protéines. Après cuisson ou grillage, elles sont consommées directement ou utilisées comme épaississant sous forme de poudre. Les graines de baobab contiennent

également le phosphore, le calcium, le magnésium, les vitamines A et C. Les acides glutamique et aspartique sont les acides aminés majeurs alors que les acides oléique, linoléique et palmitique sont les plus représentatifs des acides gras. Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile de la graine de baobab sont exploitées dans la fabrication du savon. L'acceptabilité et l'utilisation optimale des différentes parties du baobab en tant que source alimentaire sont limitées par la présence de facteurs antinutritionnels notamment les inhibiteurs de protéines, les tannins, les phytates mais les techniques de traitements peuvent réduire ou détruire les facteurs antinutritionnels présents (**Kaboré et al., 2011**).

Tableau II. Composition en éléments minéraux des graine, feuille et pulpe du baobab

Parties du baobab	Eléments minéraux (mg/ 100g MS)										References
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn	Al	
Feuille	307-	0.1-	15-49	321-	312-549	3,1-	163	29,7-670	1,9	22,8-	Diop et al., 2005
	4020	1,2		1640		8,9				287	
	2000	1,16	15,5	NM	549	3,1	163	302	1,87	NM	Glew et al., 1997
	1470	<0,5	98,6	583	423	8,76	3,82	153	1,75	NM	Sena et al., 1998
Pulpe	295	1,6	9,3	1240	90	NM	27,9	NM	1,8	NM	Osman, 2004
	655	NM	8,6	NM	NM	NM	NM	50,8	NM	NM	Nour et al., 1980
	341	NM	1,7	NM	209	NM	5,46	73,3	1,04	NM	Glew et al., 1997
	335	0,37	2,65	2409	167	NM	11,20	76,2	1	NM	Arnold et al., 1985
	216	1,15	2,92	726	300	0,98	0,79	452	3,18	NM	Sena et al., 1998
Graine	410	2,6	6,4	910	270	NM	28,3	NM	5,2	NM	Osman, 2004
	58,9	NM	6,36	280	NM	NM	6,07	6	3,6	NM	Nkafamiya et al., 2007
	395	NM	1,83	NM	352	1,06	1,94	614	2,57	NM	Glew et al., 1997
	273	2,78	6,55	1275	640	NM	2,48	5,12	6,68	NM	Arnold et al., 1985

NM: non mentionné dans le document original

Tableau III. Profile en amino acides de la graine, de la feuille et de la pulpe du baobab (mg/ 100g MS)

Baobab	Feuilles			Pulpe		Graines		
	References	Diop et al., 2005	Sena et al., 1998	Glew et al., 1997	Osman, 2004	Glew et al., 1997	Osman, 2004	Glew et al., 1997
Acid aspartique		1000-1300	1240	1290	204,8	296	1900	2110
Acid glutamique		1100-1300	1440	1140	208	394	4360	4890
Serine		500	450	455	102,4	118	1120	1140
Glycine		600	540	557	92,8	121	1580	1040
Histidine		200	240	218	38,4	42	400	5050
Arginine		700-900	830	707	243,2	228	1470	2210
Threonine		400	430	365	89,6	65	700	6980
Alanine		700	680	658	105,6	221	1310	1060
Proline		600-700	640	676	70,4	235	1270	955
Tyrosine		400-500	430	415	659,2	106	280	559
Valine		600-700	700	655	153,6	162	1090	1160
Methionine		100-200	150	104	6,4	14	180	229
Isoleucine		500-700	610	546	70,4	137	660	827
Leucine		900	980	875	137,6	206	1290	1400
Phenylalanine		600	670	602	140,8	109	740	1030
Lysine		600	640	611	54,4	163	920	1120
Cysteine		200-300	240	211	32	137	280	360
Tryptophane		200	340	205	NM	18	NM	281

NM: non mentionné dans le document original

Tableau IV. Composition en acides gras des graine, feuille et pulpe de baobab

Baobab	Acides gras (mg/ 100g MS)								References
	C:14	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	
Feuilles	NM	24	1,1	3,5	5,8	10	8,1	NM	Diop et al., 2005
	tr	24	1,1	3,5	5,8	10	8,1	Tr	Glew et al., 1997
Pulpe	NM	15	NM	traces	NM	2,3	15	NM	Diop et al., 2005
	tr	15	NM	tr	NM	2,3	15	NM	Glew et al., 1997
Graines	NM	143	1,8	16	214	138	1,6	NM	Diop et al., 2005
	tr	143	1,8	16	214	138	1,6	Tr	Glew et al., 1997

C14:0 (acidemystirique); C16:0 (acidepalmitique); C16:1 (acide palmitoleique); C18:0 (acidestearique); C18:1 (acideoleique); C18:2 (acidelinoleique); C18:3 (acidelinolenique); C20:0 (acidearachidique)
Tr: trace; NM: Non mentionné dans le document original.

1.2.2. Propriétés médicinales

Le baobab est encore appelé « arbre pharmacien » et ses feuilles, ses racines, sa pulpe, sa graine ainsi que son écorce sont utilisées en pharmacopée grâce à leurs vertus thérapeutiques. La pulpe est utilisée pour combattre la diarrhée, la dysenterie, la variole et la rougeole. En décoction, elle est emménagogue et anti-diarrhéique. Les feuilles sont utilisées comme anti-diarrhéique, fébrifuge, anti-inflammatoire et anti-filarien. La poudre de feuilles séchées est antianémique, antirachitique, tonique, émolliente, antiasthmatique et antirhumatismal. L'écorce est fébrifuge et anti-inflammatoire pour le tube digestif (**Kaboré et al., 2011**).

1.2.3. Utilisations alimentaires

Les feuilles sont quotidiennement utilisées par les populations tant rurales qu'urbaines. Elles servent à faire la sauce à l'état frais ou sec et réduit en poudre. Elles peuvent aussi être associées à d'autres mets tels que le couscous de fonio. Les jeunes plantules et racines sont mangées comme des asperges (**Taita et al., 2005**). La pulpe du fruit est couramment utilisée dans la préparation de boissons (exemple du jus de *teedo* au Burkina Faso) ou de gruau à base de céréales (**Chadare et al., 2009**). Par ailleurs, la pulpe est fermentée seule ou en combinaison avec les céréales (**Chadare et**

al., 2009). Quant aux graines de baobab, elles sont le plus souvent fermentées puis séchées pour être utilisées comme condiment. Elles peuvent également être séchées puis réduites en poudre pour être utilisées comme épaississant dans la préparation de mets (**Chadare et al.**, 2009). Les amandes obtenues après décorticage des graines, sont soit grillées ou pilées pour faire la sauce (**Chadare et al.**, 2009).

1.3. Fermentation alimentaire traditionnelle en Afrique

La préparation et la consommation des aliments fermentés datent depuis la période de la préhistoire. Dans plusieurs pays africains, la fermentation était à l'origine une méthode de conservation des aliments en prévision des saisons maigres (**Dirar, 1993**). Différents types de produits fermentés sont connus dans ces pays (Tableau V) et constituent une part importante dans l'alimentation des populations (**Odunfa et Oyewole, 1998**). Certains de ces produits sont utilisés comme des plats de résistance, d'autres comme des boissons ou des condiments. Les aliments fermentés servis comme repas ou boissons tels que le *gari*, l'*ogi*, le *mahewu* et le *kaffir* sont généralement préparés à partir de matières premières riches en hydrates de carbone. Les condiments tels que le *soumbala*, le *bikalga*, l'*ugba*, l'*ogiri* sont généralement des produits obtenus à partir de la fermentation de graines riches en protéines. Ces condiments constituent d'excellentes sources de protéines et de vitamines (**Odunfa et Oyewole, 1998**). De nos jours, la fermentation des aliments vise plusieurs objectifs (**Odunfa et Oyewole, 1998**) parmi lesquels :

- l'amélioration des caractéristiques sensorielles par le développement de composés aromatiques divers et le changement de texture ;
- l'amélioration de la valeur nutritionnelle par la dégradation des macromolécules (les protéines, les hydrates de carbone, les lipides) en sucres, en acides aminés et en acides gras essentiels faciles à digérer ;
- l'amélioration de la qualité hygiénique et sanitaire (synthèse de substances antimicrobiennes inhibitrices des germes pathogènes, absence de toxines, élimination partielle et/ou complète de facteurs antinutritionnels) ;

-la diminution du temps de cuisson et de ce fait la quantité d'énergie nécessaire à la fermentation des substrats alimentaires.

Tableau V : Exemples d'aliments fermentés alcalins

Nom	Matières premières	Pays/ régions	Principaux microorganismes	Références
Maari	Graines de baobab	Burkina Faso	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> <i>Ent. faecium</i> , <i>Ent. casseliflavus</i> <i>P. acidilactici</i>	Parkouda et al., 2010
Dikouanyo uri	(<i>Adansonia digitata</i>)	Benin	<i>Bacillus spp.</i> , <i>lactic acid bacteria</i>	Chadare et al., 2010
Soumbala		Burkina Faso	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>Brevibacillus borstelensis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> ,	Ouoba et al., 2004; Sarkar et al., 2002
Afitin, Iru	Graines de néré (<i>Parkia biglobosa</i>)	Benin	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	Azokpota et al., 2006
Netetu		Senegal	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>	Ndir et al., 1994; Ndir et al., 1997
Dawadawa (Iru)		Nigeria	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Leuconostoc spp.</i>	Jideani et Okeke, 1991; Odunfa et Oyewole, 1986
Bikalga	Graine d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Burkina Faso	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. badius</i> , <i>Brevibacillus bortelensis</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. fusiformis</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	Ouoba et al., 2007
Okpehe	(<i>Prosopis africana</i>)	Nigeria	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	Oguntoyinbo et al., 2007
Soy-dawadawa	Graines de soja (<i>Glycine max</i>)	Ghana	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. firmus</i>	Dakwa et al., 2005
Soyadawa dawa		Nigeria	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. metaterium</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> ,	Dike et Odunfa, 2003

1.4. Le *maari*

Le *maari* est un produit obtenu par fermentation naturelle des graines de *Adansonia digitata* et utilisé comme condiment des sauces dans les régions du nord et du sahel du Burkina Faso. Il est connu sous le nom de *issai* ou *dadawa Higgi* au Nigéria (Nkafamiya et al., 2007) et de *dikouanyouri* au Bénin (Chadare et al., 2009). Au Burkina Faso, le *maari* (appellation fulfuldé) ou teed-bikalgo (appellation mooré) est un condiment utilisé dans plusieurs mets tels que les sauces, les soupes et le riz.

1.4.1. La technologie de production du *maari*

La technologie de production du *maari* suit les étapes suivantes (Figure 3) :

-le nettoyage des graines : les graines de baobab sont manuellement triées pour enlever les cailloux et les diverses impuretés. Ensuite, elles sont légèrement décortiquées au mortier pilon ; ce décorticage permet de débarrasser la fine enveloppe qui entoure les coques. Le son et les impuretés légères (glumes, résidus de paille...) sont alors éliminés par vannage. Pour parfaire le nettoyage, les graines subissent 2 ou 3 lavages successifs. Au cours de ces lavages, les graines immatures, perforées et les autres impuretés légères qui surnagent dans l'eau sont éliminées. Ce nettoyage permet d'obtenir un produit fini de bonne qualité hygiénique et organoleptique (Compaoré, 2009).

-la cuisson des graines : après le nettoyage, les graines sont cuites à l'eau dans une marmite pendant 6 à 12 heures en fonction de l'intensité du feu (tiges de mil ou de fagots de bois). De la potasse traditionnelle (lyxifiats de cendre) est ajoutée aux graines pendant la cuisson. Ce produit alcalinisant a été obtenu à partir de la cendre de tiges de millet par des techniques traditionnelles. Son ajout a pour but d'accélérer la cuisson, mais aussi de parfaire le nettoyage des graines en provoquant un débordement de mousse qui renfermerait des impuretés légères. Les graines sont cuites jusqu'à évaporation complète de l'eau et présentent alors des coques éclatées qui laissent apercevoir l'amande. Les graines cuites peuvent être facilement broyées à la main. La longue période de cuisson observée pendant la préparation du *maari* a également été

observée pendant la fermentation des graines de *Hibiscus sabdarifa* pour la production du *Bikalga* (Parkouda et al., 2008) où les graines sont cuites pendant 12 à 24h. Elle est également comparable à celle des graines de *Parkia biglobosa* pour la production du *soumbala* (Diawara et al., 1992) où les graines sont cuites une première fois pendant 24 à 40 heures, décortiquées, puis cuites une seconde fois pendant 1 à 2 heures.

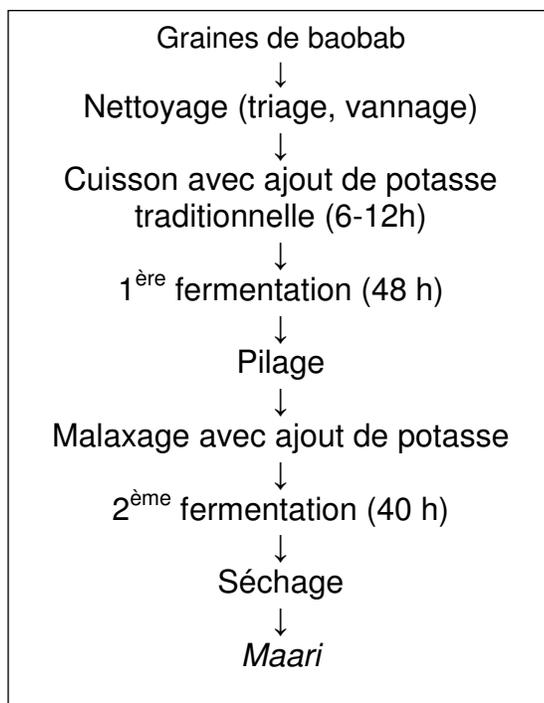


Figure 3. Diagramme de production du *maari* (Compaoré, 2009)

Cependant dans le procédé décrit par Nnam et Obiakor (2003), les graines de baobab sont cuites pendant une période beaucoup moins longue. Ce traitement thermique que les graines subissent peut provoquer divers types de transformations des nutriments. En effet la cuisson à l'eau entraîne l'hydrolyse des liaisons osidiques des di- et polysaccharides des glucides (Ekpenyong et Borchers, 1980). Cette hydrolyse est favorisée en milieu alcalin. Les traitements thermiques entraînent aussi la dénaturation des macromolécules protéiques. Cette dénaturation est liée à la destruction de la conformation native des protéines. Par cette dénaturation, les cuissons augmentent la valeur nutritive des aliments (Stanley et Aguilera, 1985). Les inhibiteurs tryptiques

sont également inactivés par la chaleur, ce qui augmente la digestibilité des protéines (**Ekpenyong et Borchers, 1980; Pulosof et al., 1982**). La cuisson favorise également l'absorption d'eau. Ce phénomène est influencé par l'hygroscopicité des protéines (**Pulosof et al., 1982**). Les coques des graines sont ainsi ramollies par l'hydratation créant de ce fait des conditions favorables à l'action des enzymes microbiennes. Les lipides et les sels minéraux peuvent également subir des transformations lors de la cuisson en milieu alcalin (**Godon, 1996**).

La cuisson à l'eau pourrait donc contribuer à augmenter la qualité nutritionnelle des graines et à les rendre plus aptes à la consommation humaine (**Camire et Clydesdale, 1981**). En effet, **Addy et al. (1995)** de même que **Igboeli et al. (1997)** ont montré que la cuisson des graines de baobab en milieu alcalin entraînait une réduction importante des substances antinutritives comme les inhibiteurs trypsiniques, les inhibiteurs amylasiques et les tanins dans les graines. Cette étape de cuisson pourrait aussi contribuer à sélectionner les microorganismes thermorésistants tels que les spores de *Bacillus spp.* (**Azokpota et al., 2006 ; Ouoba et al., 2007**).

-La fermentation : après la cuisson, on laisse refroidir les graines pendant quelques temps avant la fermentation. Cette fermentation qui dure 88 heures a lieu en deux phases : une première phase qui dure 48 heures suivie d'une seconde phase de 40 heures. Pendant la première phase, les graines après refroidissement sont mises dans un récipient couvert (marmite ou plat) et laissées en fermentation pendant 48 heures dans une cuisine ou dans une salle. Au cours de la fermentation, le récipient contenant les graines en fermentation est déplacé au soleil où les graines sont remuées à plusieurs reprises. Cette fermentation solaire dure 3 à 4 heures et entraîne un pré-séchage des graines, puis le récipient est ramené dans la cuisine (ou la salle) et la fermentation se poursuit. La première fermentation est caractérisée par un assombrissement de l'amande des graines et le dégagement d'une forte odeur complexe caractéristique. Après cette étape, les graines fermentées sont broyées par pilage au mortier-pilon puis malaxées avec de la potasse (lyxifiats de cendre) et de l'eau. La pâte obtenue est alors laissée à fermenter pendant environ 40 heures dans la cuisine. Comme les graines pendant la première phase de la fermentation, la pâte est

également pré-séchée au soleil pendant quelques heures. A la fin de cette seconde fermentation on note le dégagement d'une très forte odeur caractéristique.

-Le séchage de la pâte fermentée: après la fermentation, la pâte est séchée au soleil sur une meule ou dans une assiette. Le séchage dure de 1 à 4 jours en fonction de l'ensoleillement pour donner le *maari* final (Figure 4). Dans certains sites de production à Toulfé (Village situé au Nord du Burkina), le produit séché est pilé de nouveau avec adjonction d'eau et cuite à la vapeur sous forme de grosses boules pendant environ 15 minutes; cette étape facultative a pour objectif d'améliorer la qualité du produit fini selon les productrices. Après ces étapes, le *maari* est prêt à l'emploi. Il est de couleur sombre et est vendu en tas de 25 francs CFA sur la place des marchés. Contrairement au *soumbala* qui est directement utilisé dans les repas, le *maari* est d'abord trempé dans de l'eau chaude pendant quelques minutes. Puis l'extrait aqueux est utilisé pour la préparation des sauces. Il est préparé avec la plupart des condiments locaux : feuilles d'oseille, feuilles de baobab, feuilles de haricot, etc.



Figure 4. *Maari* séché (Compaoré, 2009)

1.4.2. Valeur nutritive du *maari*

Le *maari* constitue une source importante de protéines (22,20% MS). Il contient 42-55% d'hydrates de carbone, 5-14% de sels minéraux, 14-31% de lipides et fournit 413-534 Kcal/100 g de matière sèche (MS). Le *maari* contient du calcium (0,57 mg/ 100 g MS), phosphore (303,00 mg/ 100 g MS), du potassium (0,77 mg/ 100 g MS), du fer (0,55 mg/ 100 g MS), du zinc (1,80 mg/ 100 g MS), du cuivre (0,02 mg/ 100 g MS) et des traces d'iode (Nnam et Obiakor, 2003).

1.4.3. Changements physico-chimiques au cours de la fermentation

Evolution du pH durant la fermentation : il a été observé une augmentation du pH (de 6,73 à 7,34) au cours de la fermentation due à l'activité protéolytique des microorganismes responsables de la fermentation qui dégradent les protéines en peptides puis en acides aminés. Ces acides aminés sont utilisés par les microorganismes comme une source de carbone et d'énergie (Allangheny et al., 1996). Une partie de ces acides aminés est dégradée pour produire des composés tels que le NH₃, responsable de l'augmentation du pH (Ibrahim et Antai, 1986 ; Allangheny et al., 1996). Il existerait donc dans les graines en fermentation des bactéries capables de réaliser la protéolyse et donc productrices de protéases telles que les souches de *Bacillus* spp. généralement responsables de ce phénomène (Odunfa, 1983 ; Allangheny et al., 1996; Ouoba, 2003).

Evolution de la température durant la fermentation : la température augmente légèrement durant la fermentation (34°C en moyenne), liée à une production de chaleur liée à la fermentation.

Le taux de protéines : Nnam et Obiakor (2003) ont rapporté une diminution du taux de protéines de 25,45% à 22,20%. Cette baisse serait due à l'augmentation du nombre de microorganismes qui utilisent les protéines pour leur métabolisme.

Le taux de lipides : une augmentation du taux de lipides de 18,9 à 30,6% a été aussi rapportée par Nnam et Obiakor (2003) et serait due à l'accroissement de l'activité des lipases qui hydrolysent les lipides en glycérol et en acide gras (Odunfa, 2003). Les

acides gras pourraient être utilisés pour la synthèse de nouveaux lipides (**Nnam et Obiakor, 2003**).

Evolution des sels minéraux : d'une façon générale, la fermentation augmente la concentration en éléments minéraux particulièrement le calcium, le zinc, le phosphore, le fer, le cuivre et le potassium (**Nnam et Obiakor, 2003**). Cette augmentation est imputable aux activités métaboliques des microorganismes qui hydrolysent les complexes métal-phytate pour libérer les minéraux. (**Fardiaz et Markakis, 1981**). L'augmentation des éléments minéraux pourrait également être la conséquence de l'hydrolyse des acides oxalique et phytique (**Uwaegbute, 1996**). La potasse traditionnelle est ajoutée au cours du processus de fermentation et pourrait aussi être une source de sels minéraux (**Ouoba, 2003**).

La teneur en glucides totaux : le taux de glucides totaux diminue durant la fermentation (de 48,07 à 42,62%, **Nnam et Obiakor, 2003**). Cela serait dû à l'utilisation des sucres simples comme source d'énergie par les microorganismes (**Achinewhu, 1986**) ou comme source de carbone pour la synthèse d'autres composés (**Kazanas et Fields, 1981**). Il est connu que les enzymes amylolytiques hydrolysent l'amidon et les oligosaccharides en sucres simples solubles facilement utilisables (**Kazanas et Fields, 1981**).

Evolution des facteurs antinutritionnels : **Nnam et Obiakor (2003)** ont rapporté la baisse de la concentration des facteurs antinutritionnels au cours de la fermentation. La baisse de la concentration en tannins s'expliquerait soit par l'hydrolyse des composés polyphénoliques en composés simples par la polyphenol oxydase ou bien par la dégradation des complexes de tannins (tannin-protéine, tannin-amidon, tannin-fer) libérant ainsi les nutriments (**Obizoba et Atti, 1991**). La concentration en phytates diminue au cours de la fermentation, due à l'augmentation de l'activité des enzymes dephosphorylantes avec formation de l'inositol et de l'acide phosphorique (**Fardiaz et Markakis, 1981**).

1.4.4. Les microorganismes associés à la fermentation

Comme l'indique le tableau VI, la fermentation des graines de baobab est initiée par les bactéries aérobies mésophiles (BAM) avec comme espèces dominantes les *Bacillus subtilis* (82% de la flore totale du *maari*). Aucune bactérie lactique n'a été observée au début de la fermentation. Cependant après 24 h de fermentation, *Enterococcus faecium* commence à se développer et demeure jusqu'à la fin comme espèce dominante.

Tableau VI: Evolution des microorganismes au cours de la fermentation du *maari*

Temps de fermentation (heures)	1 ^e fermentation						2 ^e fermentation		<i>Maari</i> séché
	0	6	12	24	36	48	72	88	
BAM, log (ufc BAM/g)	2,2	2,8	6,1	8,3	8,7	9,1	9,8	9,9	10
% BAM :									
<i>Bacillus subtilis</i>	82	91	100	86	79	51	50	40	13
<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	5	-	-	-	-	44
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	-	-	6	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	-	-	6	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	43
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	-	-	-	-	7	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>									
<i>gallinarum</i>	-	-	-	-	-	37	16	-	-
<i>Staphylococcus sciuri</i>	18	9	-	9	7	-	17	60	-
<i>Acinetobacter</i>									
<i>calcoaceticus</i>	-	-	-	-	7	-	-	-	-
<i>Corynebacterium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	17	-	-
log (ufc BAL/g)	-	-	-	4,5	6,3	7,9	9,6	9,9	9,9
% BAL:									
<i>Enterococcus</i>									
<i>casseliflavus</i>	-	-	-	-	-	-	10	-	17
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	100	100	100	90	100	83

-absence de colonies ; Source : **Parkouda et al., 2010**

Hormis les espèces *B. subtilis* et *Ent. faecium* étant identifiées comme espèces dominantes respectives du début et de la fin de la fermentation, d'autres

microorganismes dits secondaires tels que *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. cereus*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Corynebacterium sp.* et *Ent. casseliflavus* ont été identifiés au cours de la fermentation des graines de baobab.

Le *maari* séché (produit final de la fermentation) contient des souches de *B. subtilis* (13% des bactéries aérobies mésophiles), *B. pumilus* (44% des bactéries aérobies mésophiles), *B. cereus* (43% des bactéries aérobies mésophiles), *Ent. Casseliflavus* (17% des bactéries lactiques) et *Ent. faecium* (83% des bactéries lactiques) (**Parkouda et al., 2010**).

La longue cuisson subie par les graines avant la fermentation constitue un système de sélection des microorganismes. Les bactéries du genre *Bacillus* sont favorisées due à leur capacité à sporuler et à la résistance de leurs spores à la chaleur. Les autres microorganismes proviendraient de l'environnement de production notamment l'air, les mains, les paniers, les sacs plastiques utilisés pour recouvrir les graines à fermenter (**Ouoba, 2003**).

1.4.4.1. Les bactéries du genre *Bacillus*

La fermentation spontanée des graines de baobab est fortement dominée par les bactéries lactiques aussi bien que les bactéries du genre *Bacillus* (**Parkouda et al., 2010**).

Les bactéries du genre *Bacillus* de la famille des Bacillaceae représentent les bactéries sporulées aérobies les plus largement répandues dans les sols, les eaux naturelles, l'air où elles participent à plusieurs transformations chimiques. Les espèces sont très nombreuses et de propriétés variées. Il existe environ une centaine connues (**Sander et al., 2003**). La souche *B. Sutilis* est considérée comme l'espèce type du genre *Bacillus* (**Harwood, 1989**). Les *Bacillus* sont des bâtonnets de diverses tailles formant des colonies de formes variées. Leur habileté à sporuler leur permet de tolérer des conditions nutritionnelles pauvres (**Doi, 1989**). Elles sont Gram positives au cours de la phase exponentielle de croissance, catalase positive pour la plupart, oxydase positive ou négative, aérobies ou anaérobies facultatives, psychrophiles, mésophiles ou

thermophiles, immobiles ou mobiles par cils péritriches (**Claus et Berkeley, 1986**). Elles sont hétérotrophes et tirent leur énergie d'une large gamme de composés organiques par fermentation ou respiration. Le genre *Bacillus* regroupe à la fois des bactéries pathogènes pour l'homme, les plantes et les animaux tels que *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. Sphaericus* et des bactéries non pathogènes participant à plusieurs types de fermentations traditionnelles et industrielles (**Green et al., 1999 ; Ouoba, 2003**).

Diverses espèces de *Bacillus* ont été isolées sur les graines de *Adansonia digitata*, de *Parkia biglobosa* et sur les graines d'*Hibiscus sabdariffa* fermentées au cours de la préparation respective du *maari*, du *soumbala* et du *bikalga*. Les plus citées sont *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilis* avec comme espèce prédominante *B. subtilis* (**Parkouda et al., 2010 ; Odunfa, 1985 ; Ibrahim and Antai, 1986 ; Diawara et al., 1992 ; N'dir et al., 1997 ; Ouoba, 2003 ; Ouoba et al., 2007**). Cette dernière espèce assure la protéolyse et la lipolyse indispensable à la genèse d'arômes caractéristiques. Les *Bacillus* sont également impliquées dans la fermentation du *kishk*, produit fermenté à base de farine et de lait (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Certaines bactéries du genre *Bacillus* (principalement *B. subtilis*) sont aptes à produire des substances antimicrobiennes telles que la subtiline, la colimicyne, la polymixine et des enzymes telles que les protéases, les amylases (**Lopez et al., 1994 ; N'dir et al., 1997**). L'espèce *B. thuringiensis* est un pathogène des insectes (moustiques), elle excrète un cristal protéique larvicide (**Buchaman and Gibson, 1975**). Les bactéries du genre *Bacillus* peuvent synthétiser une diversité de vitamines dont la thiamine, la riboflavine et la biotine (**O'Toole, 1999**). Certaines souches excrètent des polysaccharides (levanes) sur des substrats contenant le sucrose ou le raffinose. C'est ce qui donne à certains produits fermentés une texture gluante caractéristique (**Laokolé, 1994 ; Bourgeois and Larpent, 1996**).

Certaines espèces de *Bacillus* comme *B. cereus* sont des pathogènes potentiels pour l'homme de par leur production de toxines et d'enzymes lytiques. Elles sont donc à contrôler au cours de la fermentation des denrées alimentaires (**Bourgeois and Larpent, 1996 ; Buchaman and Gibson, 1975**).

1.4.4.2. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BAL) sont des bactéries à Gram-positif qui regroupent les genres bactériens suivants : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Dortu and Thonart, 2009**).

Ces bactéries peuvent avoir des formes de bâtonnet ou de coque, sont immobiles et ne sporulent pas. Elles ont également un métabolisme aérobie facultatif et ne produisent pas de catalase. Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Certaines sont dites homo-fermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétéro-fermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol en général). Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (**Drouault and Corthier, 2001**).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (**Klaenhammer et al., 2005**). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes. Elles sont utiles à l'homme (**Desmazeaud, 1996**) et sont utilisées pour la fabrication et la conservation de nombreux aliments. Ferments par excellence du lait, les bactéries lactiques sont impliqués dans diverses transformations alimentaires. On les retrouve dans la fermentation des légumes, du manioc (*gari*, *fufu*, *cassava*...) et des céréales comme le maïs pour la préparation du *mahewu*, du *kenkey*, de l'*akasa*, du *pito*, du *kaffir*, de l'*ogi*, du *mawè*, etc. (**Hounhouigan et al., 1993**; **Bourgeois and Larpent, 1996**; **Desmazeaud, 1996**) où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que

les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines.

1.5. La nécessité d'optimiser le processus de production du *maari*

Le *maari* constitue une source importante de protéines dans l'alimentation. Cependant comme la plupart des aliments fermentés en Afrique, la production est toujours traditionnelle avec des équipements rudimentaires et une fermentation incontrôlée qui entraîne des variations aussi bien de la stabilité que de la qualité du produit (**Sanni, 1993 ; Diawara et al., 1998**). Le *maari* est aussi confronté à une concurrence venant des assaisonnements importés bien que la teneur en calorie et la valeur nutritionnelle de ces produits soient faibles (**Diawara et al., 1998**). Une amélioration de la production est donc nécessaire afin de procurer aux populations du *maari* de meilleure qualité nutritionnelle et d'obtenir un produit commercialement attractif capable de concurrencer les assaisonnements importés. Les objectifs précités peuvent être réalisés en optimisant la production de la manière suivante (**Sanni, 1993**) :

- des paramètres de production tels que la température, l'humidité, l'aération, la quantité de substrats à utiliser peuvent être modifiés afin d'améliorer la qualité et le temps de production ;
- la mise au point de starters : les microorganismes doivent être sélectionnés pour conduire une fermentation donnant un produit désirable. Ce point est l'intérêt même de la présente thèse et sera abordé plus tard ;
- des équipements modernes adaptés et une production industrielle (à petite échelle dans un premier temps) doivent être envisagés. Le matériel doit être muni de conditions de maintenance, de fiabilité et d'hygiène bien définies ;
- un système de qualité doit être appliqué à la production avec à l'appui une formation du personnel en matière de conditions hygiéniques et d'utilisation de l'équipement.

1.6. Avantages de l'utilisation de starter pour la fermentation des graines de baobab

La production du *maari* implique une fermentation spontanée et incontrôlée comme la plupart des aliments fermentés en Afrique, entraînant souvent une variation de la qualité et de la stabilité du produit fini (**Sanni, 1993**). Un des facteurs contribuant à l'optimisation du processus de production est l'utilisation de cultures attestées et effectives de starter. Celles-ci garantissent la qualité et la stabilité nutritionnelle et organoleptique du produit ainsi qu'une réduction du temps de fermentation (**Odunfa and Adewuyi, 1985**). La fermentation des produits africains est souvent réalisée par un consortium de plusieurs microorganismes. Pour cela, la sélection de starters doit passer par l'isolement et l'identification des microorganismes associés à la fermentation. La variabilité de la culture microbienne doit être notée et le rôle de chaque microorganisme proprement déterminé. Des essais de fermentation doivent être réalisés avec de la matière première appropriée afin d'évaluer la performance des microorganismes et de décrire leurs propriétés technologiques (**Sanni, 1993**).

Selon **Holzapfel (1997)**, une culture starter peut être définie comme une substance ou une préparation contenant des microorganismes adaptés, et pouvant être ajoutée à un substrat pour accélérer ou faciliter la maîtrise du processus de fermentation et assurer la qualité des produits. La maîtrise du processus de fermentation consiste à favoriser une flore utile au détriment d'une flore indésirable afin de prévenir les risques sanitaires chez les consommateurs. La particularité d'un starter est liée à la matière première (lait, viande, légumes, céréales, tubercules, etc.) et doit avoir quelques attributs potentiels (**Holzapfel, 1997**) tels que :

- l'amélioration de la valeur nutritive par un enrichissement biologique à travers par exemple la biosynthèse de vitamines, d'acides aminés essentiels et de protéines ;
- l'amélioration des caractéristiques organoleptiques à savoir la saveur, l'arôme, la texture, la consistance et l'apparence visuelle ;
- l'amélioration de la sûreté toxicologique en dégradant les composés toxiques ;
- la capacité d'avoir des propriétés probiotiques contribuant ainsi à la santé ;

-la capacité de réduire le temps de production par une accélération du temps de fermentation.

En raison de la longue tradition et de leur haute performance, les starters utilisés dans l'industrie laitière servent de modèle ou d'exemple d'application des starters à d'autres aliments. Le premier starter (*Lactococcus lactis*) a été simultanément introduit au Danemark et en Allemagne en 1890 et a été utilisé pour la fermentation du lait dans la production de fromage ou de yaourt (**Holzappel, 1997**).

Les études de la fermentation du *maari* ont révélé que les *Bacillus* et les BAL étaient responsables de la fermentation (**Parkouda, 2010 ; Compaoré, 2009 ; Chadare et al., 2010**). Cependant les meilleures souches capables de conduire la fermentation n'ont pas encore été sélectionnées.

1.7. Les bactériocines

1.7.1. Définition

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **Klaenhammer (1988)** qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice.

Selon **Jack et Ray (1995)**, les bactériocines sont des molécules de nature protéique, synthétisées par voie ribosomique, sécrétées dans le milieu extracellulaire et douées d'une activité bactéricide dirigée essentiellement contre des espèces taxonomiquement très proches de l'organisme producteur. Elles ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide. Elles sont inactivées par les protéases et sont thermostables (**Jack et Ray, 1995**).

1.7.2. Classification

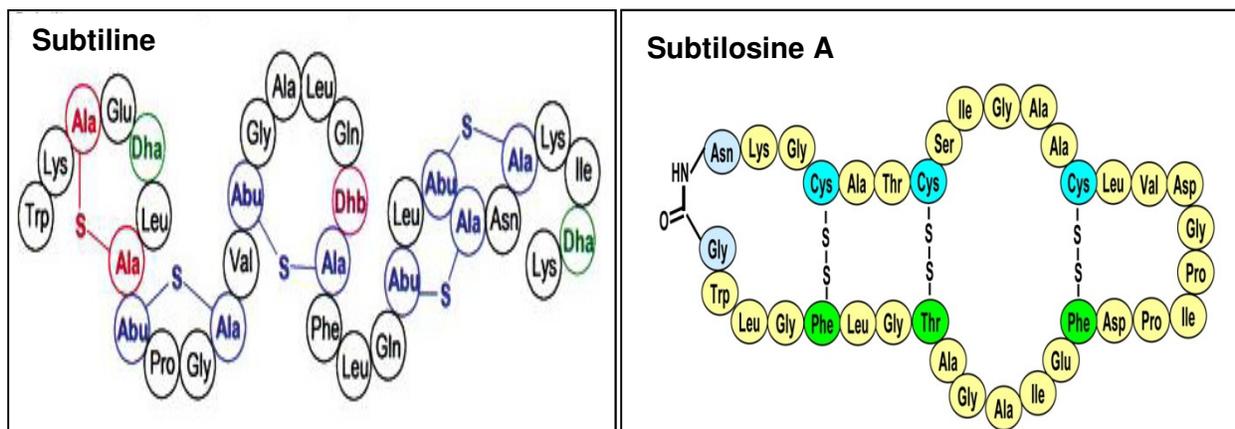
Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (**Klaenhammer, 1988**). Selon leurs caractéristiques structurales et d'activité biologique, quatre classes de bactériocines ont été définies (**Klaenhammer, 1993**).

Classe I : les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Exemples de lantibiotiques : la subtiline et la subtilosine A, produites par *B. subtilis* ; la nisine produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Les séquences et structures de la subtiline et de la subtilosine sont représentées à la figure 5.

Classe II : peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Exemples : la coaguline et la thurincine H

Classe III : protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. Ex : l'helvéticine J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysine A produite par *Ent. faecium*, la megacine A-216 produite par *B. megaterium* 216.

Classe IV : peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.



Dha =déhydroalanine; Dhb = déhydrobutyrine ; Abu = Acide 4-aminobutyrique

Figure 5. Structures de la subtiline et de la subtilosine (**Abriouel et al., 2010**)

1.7.3. Domaines d'applications des bactériocines

1.7.3.1. Le typage bactérien

L'utilisation des bactériocines a permis l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* (**Pitt and Gaston, 1995**) ainsi que la différenciation des souches de *Shigella* (**Merino et al., 2000**).

1.7.3.2. Domaine alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (**Ryan et al., 1998**). Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (**Harlander, 1993 ; Galverz et al., 2007**). Malgré le fait que la majorité des bactériocines soit des substances naturelles non toxiques, seule la nisine est reconnue jusqu'à maintenant comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (**Delves-Broughton, 1990**). Ainsi, la nisine est utilisée comme additif dans les aliments en conserves, notamment dans les produits laitiers, les soupes et les poudings à base de céréales. Par ailleurs, **Rayman et al. (1981)** ont démontré que l'interaction synergique entre la nisine et les nitrites contre les spores de *Clostridium botulinum* permettrait de réduire l'emploi de ces substances cancérigènes. A ce jour, plus de 45 pays ont approuvé l'utilisation de la nisine comme agent de conservation, ce qui fait de la nisine la bactériocine la plus utilisée à travers le monde (**Riley et Wertz, 2002**). Tout comme la nisine, l'utilisation de la pédiocine dans la conservation des viandes, des salades et du fromage a été brevetée en Europe (**Chen et al., 1997**).

1.7.3.3. Domaine de la médecine humaine et vétérinaire

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire. Par leurs caractéristiques mentionnées précédemment, les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie. Quelques lantibiotiques sont utilisables dans les applications médicales pour l'espèce humaine et animale. L'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* (**Allgaier et al., 1986**) est active contre *Propionibacterium acnes*, qui cause l'acné. Ce lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques et leur faible coût de production par rapport aux antibiotiques. La nisine, quant à elle, peut être utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pHs acides et son activité contre *Helicobacter pylori* (**De Vuyst et Vandamme, 1993**). Trois autres bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* YIT 9029 et *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 ont montré une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* qui cause des ulcères gastriques (**Avonts et De Vuyst, 2001**). La Cinnamycine produite par différentes souches de *Streptomyces* spp. est impliquée dans l'immunité humaine (prolifération des leucocytes) et la régulation de la pression du sang avec l'intervention de phospholipase A2 et l'enzyme de conservation de l'angiotensine. De plus, ce groupe peut être impliqué aussi dans la protection contre le virus *Herpes simplex* (**Avonts et De Vuyst, 2001**).

L'utilisation d'une bactériocine à la place d'un antibiotique, par intermittence, aiderait à détruire les populations résistantes. Les ionophores antibiotiques ont un très large spectre d'action, donc ils peuvent agir sur à peu près la moitié de la flore naturelle trouvée dans le rumen des bovins, alors que les bactériocines sont par contre extrêmement spécifiques, ce qui permet, par exemple, de cibler seulement les bactéries qui dégradent des protéines alimentaires ou seulement celles qui produisent du méthane. Un autre avantage qui s'ajoute, tient au fait que les bactériocines sont des protéines non toxiques qui se digèrent facilement. Comme elles sont digérées par

l'animal, il n'y a aucun risque qu'il reste des résidus dans la viande ou le lait. Par contre, les ionophores antibiotiques classiques ne sont pas digestibles, sont très toxiques et doivent être manipulés et administrés avec précaution.

1.7.3.4. Domaine agricole

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences sont les objets de l'exploitation des bactériocines en agriculture. Dans ce cas, les substances antibactériennes et les substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes (Paik *et al.*, 1997).

1.7.4. Microorganismes producteurs de bactériocines

De nombreuses souches bactériennes, à Gram positive et à Gram négative ont été décrites pour leurs capacités à produire des bactériocines (Tableau VII).

Tableau VII : Quelques microorganismes producteurs de bactériocines

Bacteriocines	Poids moléculaire (kDa)	Microorganismes producteurs	Références
Class I (lantibiotiques)			
Subtiline	3,34	<i>Bacillus subtilis</i>	Banerjee et Hansen, 1988
Subtiline B	3,42	<i>Bacillus subtilis</i>	Chan <i>et al.</i> , 1993
Subtilosine A	3,39	<i>Bacillus subtilis</i>	Zheng <i>et al.</i> , 1999
Mersacidine	1,82	<i>Bacillus subtilis</i>	Bierbaum <i>et al.</i> , 1995
Sublancine 168	3,88	<i>Bacillus subtilis</i>	Paik <i>et al.</i> , 1998
Ericine S	3,44	<i>Bacillus subtilis</i>	Stein <i>et al.</i> , 2002
Ericine A	2,98	<i>Bacillus subtilis</i>	Stein <i>et al.</i> , 2002
LFB112	6,3	<i>Bacillus subtilis</i>	Xie <i>et al.</i> , 2009
Class II			
Thuricine 17	3,16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Gray <i>et al.</i> , 2006
Thurincine H	3,14	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Lee <i>et al.</i> , 2009
Thuricine S	3,14	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Chehimi <i>et al.</i> , 2007
Bacthuricine F4	3,16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Kamoun <i>et al.</i> , 2005
Cereine 7A	3,94	<i>Bacillus cereus</i>	Oscáriz et Pisabarro, 2000
Cereine 7B	4,89	<i>Bacillus cereus</i>	Oscáriz <i>et al.</i> , 2006
Class III			
Megacine A-216	32,85	<i>Bacillus megaterium</i>	Kiss <i>et al.</i> , 2008
Megacine A-19213	39	<i>Bacillus megaterium</i>	Von Tersch et Carlton, 1983

CHAPITRE II :

MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels

2.1.1. Les souches bactériennes et les conditions de culture

-Les souches testées : la présente étude a porté sur 9 souches dominantes de bactéries lactiques et 10 souches dominantes de bactéries aérobies mésophiles, isolées au cours de la fermentation traditionnelle des graines de baobab au Burkina Faso (**Compaoré, 2009**) puis identifiées par **Parkouda et al. (2010)**. Les souches de bactéries lactiques comprennent 5 souches *Enterococcus faecium* (L9, L104, L117, L134, L154), 2 souches *Enterococcus casseliflavus* (L142 et L152) et 2 souches de *Pediococcus acidilactici* (L169 et L87).

Quant aux bactéries aérobies mésophiles, elles comprennent 4 souches de *B. subtilis* (B3, B55, B122, B222), 2 souches de *B. pumilus* (B47, B360), 2 souches de *Lysinibacillus sphaericus* (B371 et B455), une souche de *B. circulans* (B288) et une souche de *B. megaterium* (B317).

-Les souches indicatrices : Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés sur des microorganismes indicateurs (Tableau VIII) offerts par le Department of Food Science, Food Microbiology de l'Université de Copenhague (Danemark).

-Les souches de références : *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* DSM 15029 et *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10 (ATCC 6051), utilisées comme références dans les essais de PCR et de fermentation des graines, sont également la propriété de l'Université de Copenhague.

Toutes les souches de bactéries lactiques utilisées ont été conservées sous forme de stocks congelés à -80 °C dans un mélange de bouillon MRS 80% (V/V) (Oxoid CM0359, Basingstoke, Hampshire, England) et de glycérol 20% (V/V). Avant leur utilisation, les souches de bactéries lactiques ont été repiquées 2 fois dans un bouillon MRS puis incubées à 37 °C pendant 24 h.

Les autres souches bactériennes ont été conservées sous forme de stocks congelés à -80 °C dans un mélange de bouillon BHI 80% (V/V) (Oxoid CM0359, Basingstoke, Hampshire, England) et de glycérol 20% (V/V). Avant leur utilisation, ces souches ont été repiquées 2 fois dans un bouillon BHI puis incubées à 37 °C pendant 24 h.

Tableau VIII: Les bactéries indicatrices, leur code et leur origine

Souches indicatrices	Codes	Origines, references
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1291	Bc11	Gâteau d'anniversaire (intoxication), Brésil
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1561	Bc14	Poulet préparé (intoxication), Brésil
<i>Bacillus cereus</i> NVH391-98	Bc98	Intoxication alimentaire, fourni par INRA, France ^a
<i>Bacillus cereus</i> 007525	Bc00	Ragoût (intoxication alimentaire) ^b
<i>Bacillus cereus</i> F4810-72	BcF	Intoxication alimentaire ^c
<i>Bacillus cereus</i> NC7401	BcNC	Intoxication alimentaire ^d
<i>Bacillus cereus</i> Ba18H2	BcPA	Sonru ^e
<i>Bacillus cereus</i> C14	G1	Gergoush ^f
<i>Bacillus cereus</i> F16	G2	Gergoush ^f
<i>Bacillus cereus</i> L31	G3	Gergoush ^f
<i>Bacillus cereus</i> W2	G4	Gergoush ^f
<i>Bacillus cereus</i> W23	G5	Gergoush ^f
<i>Bacillus cereus</i> F6H1	G6	Afitin ^e
<i>Bacillus cereus</i> F6H3	G7	Afitin ^e
<i>Bacillus cereus</i> F6H7	G8	Afitin ^e
<i>Bacillus cereus</i> F12H6	G9	Afitin ^e
<i>Bacillus cereus</i> Ba48H3	G10	Sonru ^e
<i>Listeria monocytogenes</i> 057	Lm1	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Listeria monocytogenes</i> L028	Lm2	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Lm3	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Micrococcus luteus</i> SKN 624	Ml	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Infantis SKN 557	Si	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Oranienburg SKN 1157	So	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Nigeria SKN 1160	Sn	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Thompson SKN 565	Sth	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 533	St1	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 1152	St2	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 1155	St3	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>E. coli</i> 81 nr. 149 SKN 541	Ec	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Yersinia enterocolitica</i> 6A28 SKN 599	Ye1	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Yersinia enterocolitica</i> 8A30 SKN 601	Ye2	Collection de culture de l'Université de Copenhague

^aLund et al., 2000; ^bStenfors et Granum, 2001; ^cTurnbull et al., 1979; ^dAgata et al., 1994; ^eThorsen et al., 2010; ^fThorsen et al., 2011

2.1.2. Les milieux de culture (solides et liquides)

Ce sont :

- Bouillon cœur-cervelle (BHI) (Oxoid CM0225, Basingstoke, Hampshire, England)
- Gelose cœur-cervelle (BHI) (Oxoid CM0375, Basingstoke, Hampshire, England)
- Bouillon Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Oxoid CM0359, Basingstoke, Hampshire, England)
- Gélose MRS agar (Oxoid CM0361, Basingstoke, Hampshire, England)
- Gelose Brillance *Bacillus cereus* (OXOID CM1036)
- Supplément SR0230E pour la Gelose Brillance *Bacillus cereus* (OXOID)
- Diluant (Oxoid CM0733, Basingstoke, Hampshire, England)
- Oxgall bile (Sigma-Aldrich, Pcode: 30209037, Steinheim, Germany)

Tous les milieux de culture ont été préparés en suivant respectivement les instructions des fabricants.

2.1.3. Les tampons et les solutions

Ce sont :

- T.E. 10x : 100 mM Tris base ; 10 mM EDTA ; H₂O distillée q.s.p 1 L. Ajuster le pH à 8 avec HCl et autoclaver 20 min à 120 °C.
- T.B.E 10x : 108 g Tris base ; 55 g acide borique ; 7,44 g EDTA ; eau distillée q.s.p 1 l. Ajuster le pH à 8,3.
- Solutions HCl et NaOH (1N) pour l'ajustement du pH.
- Solution de MgSO₄, 10 g/l
- Solution de MnSO₄, 7,5 mg/l
- Solution de FeCl₃, 6,75 g/l
- 1x PBS, Phosphate buffered saline

2.1.4. Les enzymes, les kits et les primers

Ce sont :

- Catalase du foie bovin (numéro de série C1345, Sigma -Aldrich),
- Papaïne du latex de *Papaya* (numéro de série P2322, Sigma -Aldrich),

- Protéase de *Streptomyces griseus* (numéro de série P2325, Sigma -Aldrich),
- Protéinase K de *Tritirachium album* (numéro de série P2548, Sigma -Aldrich)
- Trypsine du pancéas bovin (numéro de série P2328, Sigma -Aldrich)
- Taq DNA polymérase (Fermentas): enzyme utilisée pour les réactions d'amplifications par PCR.
- Kit de purification de l'ADN QIA quick (Qiagen, Courtaboeuf, France)

2.1.5. Les graines de baobab

Les graines de baobab utilisées dans la présente étude proviennent de Toulfé, un village de la commune de Titao, situé à environ 225 km au Nord de Ouagadougou.

2.1.6. Cadre de l'étude

Les expériences sur les bactéries aérobies mesophiles ont été réalisées dans le laboratoire de Microbiologie Alimentaire du Département Sciences Alimentaires à l'Université de Copenhague (Danemark). Quant à l'étude sur les bactéries lactiques, elle a été réalisée dans le laboratoire de Microbiologie du Département Technologie Alimentaire (IRSAT/CNRST).

2.2. Protocoles des études réalisées

2.2.1. Etude de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de *Bacillus* spp. et *Lysinibacillus* spp. isolées du *maari*

2.2.1.1. Préparation des inocula des souches de *Bacillus* spp. et *Lysinibacillus* spp. isolées du *maari*

Les souches de *Bacillus* spp. et *Lysinibacillus* spp., conservées à -80°C dans du glycérol, ont été repiquées sur la gélose Brain Heart Infusion broth (BHI) (Oxoid CM0225, Basingstoke, Hampshire, England) pendant 24 h d'incubation en aérobie à

37°C. Pour chaque souche, un tube à essai contenant 10 ml de bouillon BHI stérile à pH 7 a été inoculé avec une boucle de culture prélevée sur une colonie isolée sur la gélose BHI puis a été mis à incuber à 37°C pendant 18 h. La culture obtenue a été centrifugée à 5000 g/ 4°C pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérante (Hettich Universal 30 RF). Le surnageant a été éliminé puis 10 ml de solution saline constituée de 8,5 g/l NaCl et de 1,5 g/l bactopeptone (BD, France) à pH 7 ont été ajoutés au culot. La concentration en cellules (ufc/ml) des suspensions bactériennes obtenues a été déterminée par microscopie en utilisant une lame spéciale (Neubauer). Des dilutions ont été ainsi effectuées en utilisant la solution saline pour obtenir la concentration bactérienne désirée.

2.2.1.2. Préparation de l'extrait de culture

Chacune des souches de *Bacillus* spp. et *Lysinibacillus* spp. a été cultivée dans 50 ml de bouillon BHI (Oxoid CM0225) à 37°C sous agitation à 120 tpm pendant 18 h. Le surnageant a été récupéré par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4°C et ajusté à pH 7 avec du NaOH 1N pour éliminer l'effet des acides organiques. L'extrait a été ensuite filtré sur filtres Millipore stériles de diamètre 0,45 µm. L'activité antimicrobienne a été déterminée pour les 10 souches dominantes de *Bacillus* spp. et *Lysinibacillus* spp. isolées du *maari*.

2.2.1.3. Essais de l'activité antimicrobienne en aérobie, en micro-aérobie et en anaérobie

La méthode de diffusion en puits (**Motta et Brandelli, 2002**) a été appliquée pour évaluer l'activité antimicrobienne des 10 souches dominantes de *Bacillus* spp. et *Lysinibacillus* spp. isolées du *maari* contre 31 souches indicatrices. Les 31 souches indicatrices ont été cultivées dans des tubes à essai contenant 10 ml de bouillon BHI stérile à pH 7 et incubées à 37°C pendant 18 h. Un volume de 100 µl de la culture obtenue (10^7 ufc/ml) a été mélangé dans une boîte de Pétri avec 10 ml de gélose BHI. Après solidification, 2 puits (diamètre 6 mm) par boîte de Pétri ont été réalisés puis

remplis avec 50 µl du surnageant filtré. Après incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 h, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits ont été mesurés en mm. Le bouillon BHI à pH 7 a été utilisé comme témoin négatif sur chaque boîte de Pétri. 3 répétitions ont été réalisées.

Le même essai a été réalisé en incubant les boîtes de Pétri en anaérobiose (< 1% oxygen, 9-13% CO₂; Anaerogen, Oxoid) et en microaérobie (6% O₂, 12 % CO₂; Campygen, Oxoid).

2.2.1.4. Effet des enzymes, du pH et de la chaleur sur l'activité inhibitrice

Les effets des enzymes, du pH et de la température sur l'extrait de culture ont été réalisés en utilisant la méthode décrite par **Cladera-Olivera et al. (2004)**.

L'effet du pH a été mis en évidence en variant le pH de l'extrait de culture à des valeurs allant de 3 à 11 à l'aide de NaOH 1N et HCl 1N. Après incubation pendant 4 heures à 37 °C, l'activité antimicrobienne a été ensuite testée vis-à-vis de *Bacillus cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion des puits. Le bouillon BHI, ajusté à pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 a été utilisé comme contrôle.

Pour la détermination de la thermorésistance de la substance inhibitrice, l'extrait de culture a été soumis à un traitement thermique à 40 °C, 60 °C, 80 °C et 100 °C pendant 30 mn et à un cycle d'autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement à 37 °C, l'activité antimicrobienne a été vérifiée vis-à-vis de *Bacillus cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion des puits. Le bouillon BHI à pH 7 soumis au même traitement a été utilisé comme témoin.

La sensibilité de la substance inhibitrice aux enzymes a été testée en incubant à 37 °C pendant 2 h, l'extrait de culture de chaque souche additionné de l'enzyme à une concentration finale de 1 mg/ml. L'activité antimicrobienne a été ensuite vérifiée vis-à-vis de *Bacillus cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion des puits. L'extrait de culture non traité a été utilisé comme témoin. Les enzymes, provenant de Sigma-Aldrich, comprennent : la catalase (numéro de série C1345), la papaïne (numéro de série P2322), la protéase obtenue de *Streptomyces griseus* (numéro de série P2325), la protéinase K (numéro de série P2548) et la trypsine (numéro de série P2328).

2.2.1.5. Détermination du poids moléculaire des substances antimicrobiennes

20 ml de surnageant des souches B3, B122 et B222 ont été précipités en y ajoutant 50% w/v d'acide trichloracétique (TCA) pour obtenir une concentration finale de 11% TCA. Après centrifugation à 15 000 g pendant 30 min à 4°C à l'aide de la centrifugeuse Sorvall RC6, SS-34 (Norwalk, CT, USA), le culot a été lavé 2 fois dans 10 ml d'acétone. Les protéines ont été ensuite solubilisées dans 100 µl d'un mélange de solution (10 mM MES, pH 6 et 1 mM EDTA) avant de tester leur activité antimicrobienne contre *Bacillus cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion des puits. Les protéines ont été ensuite séparées à l'aide du gel 20% RunBlue SDS-PAGE selon le protocole indiqué par le fabricant. Le marqueur de protéine utilisé est Invitrogens Mark 12 (LC5677) (2,5-200 kDa). Après migration, le gel a été coupé en deux parties.

La partie contenant l'échantillon et le marqueur de protéine a été traitée 1 heure durant par une solution de bleu brillant Coomassie (Biorad) (Coomassie R-250 0,1 %, éthanol 40 %, acide acétique 10 %) puis déteinte pendant 1 heure à l'aide d'une solution contenant 7,5 % acide acétique et 10 % ethanol avant d'être lavée dans l'eau pendant 4 heures. Le gel est enfin utilisé pour la détection directe de l'activité antimicrobienne contre *Bacillus cereus* NVH391-98 (**Bizani et al., 2005**).

La deuxième partie du gel obtenu a subi une coloration à l'argent. Pour ce faire, le gel a été trempé 1 h durant dans un mélange de solution (éthanol 40%, acide acétique 10%) puis lavé 3 fois pendant 30 s dans l'eau distillée. Le gel a été ensuite trempé dans une solution de thiosulfate de sodium 0,02% pendant 5 minutes avant d'être traité dans un mélange de solution glacé (nitrate d'argent 0,1%; formaldéhyde 0,02%) pendant 1h. Après 3 rinçages de 1 min chacun, le gel a été traité avec un mélange de solution (carbonate de sodium 3%, formaldéhyde 0,05%). Enfin le gel a été trempé dans une solution d'acide acétique 5% puis scanner.

2.2.1.6. Recherche des gènes codant pour la subtiline, la subtilosine, la sublancine et l'éricine

L'ADN des souches de *Bacillus subtilis* DSM 10, DSM 15029, B3, B122 et B222 a été extrait selon la méthode décrite par **Hansen et Hendriksen (2001)**. Pour ce faire, les souches ont été repiquées sur la gélose Luria-Bertani (LB) (**Bertani, 1951**) puis incubées à 25°C pendant 18 h. Une colonie a été ensuite mise en suspension dans 250 µl de 1xTE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,5) puis l'ensemble a été soumis à une lyse à 100°C pendant 10 minutes avant d'être centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant ainsi obtenu a été utilisé pour l'essai PCR. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification des gènes codant pour la synthèse de la subtiline, de la sublancine, de la subtilosine A et de l'éricine sont listées dans le tableau IX et ont été élaborées à l'aide du logiciel Primer3 (v. 0.4.0) (**Rozen et Skaletsky, 2000**).

Tableau IX : les primers utilisés

Bacteriocine	Gènes	Primers	Sequences (5'→3')	Accession no. Primer pos. ^b	reference
Subtilosine	<i>ywiB</i>	osboP1N ^a	5'-CCTCATGACCAGGACTTCGCCTT-3'	AL009126	Présente étude/ Zeng et al. (1999)
	<i>sboA</i>			3835545-3835567→	
	<i>sboX</i>			3836764-3836745←	
	<i>albA</i>	osboP2N ^a	5'-CGGTGCCGAGCGCTTCAGGT-3'		
	<i>spoA</i>	sbo-alb_F	5'-CATGCTCGATCGGAGCCGCT-3'	AL009126	
	<i>sboX</i>			3836098-3836117→	
	<i>albA</i>			3836633-3836614←	
Subtiline	<i>spaS</i>	spaS_Fwd	5'-CAAAGTTCGATGATTTGATTTGGATGT-3'		(Sutyak et al., 2008)
		spaS_Rev	5'-GCAGTTACAAGTTAGTGTGTTGAAGGAA-3'		
Sublancine	<i>sunT</i>	SUNT-F1	5'-GCTTTGTTAGAAGGGGAGGAAT-3'		(Chung et al., 2008)
		SUNT-R1	5'-CTTGTCCCAACCCATAGGATAA-3'		
Ericine	<i>eriC</i>	Eric_F	5'-TCAACTGACCGGGCAGGAGC-3'	AF233755	Présente étude
	<i>eriSa</i>	Eric_R	5'-AAGTATTTGGCCTACAGCGACTCG-3'	6427-6446 →	
	<i>eriSb</i>			7866-7843 ←	

^a Sur la base des primers développés par **Zheng et al., 1999**, les primers originaux étaient :

osboP1 : CCTCATGACCAGGACTTCGCCTT**CGCTTACTTT** et osboP2 CGGTGCCGAGCGCTTCAGGT**AAGCTTTCCAAA**.

^b →upper-strand sequence; ← lower-strand sequence.

Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide du Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Cambridge Biosystems UK). La réaction PCR (25 µl) contenait 2x PCR Master Mix/ DreamTaq Green (12,5 µl) (Fermentas, Germany), l'eau distillée milli Q (9,5 µL), 1 µl de chaque primer (10 pmol/ µl) et 1 µl DNA (100 ng/ µl). Le programme de la réaction a comporté les conditions d'amplification suivantes: un cycle initial de dénaturation (95 °C pendant 3 minutes) suivi de 30 cycles de dénaturation (95 °C pendant 30 secondes), hybridation (58 °C pendant 30 s), et de polymérisation (72 °C pendant 1 min) et une étape finale d'extension à 72 °C pendant 10 minutes.

2.2.1.7. Séquençage des produits PCR

Les produits PCR ont été purifiés avec un kit de purification QIA quick (Qiagen, Courtaboeuf, France) puis envoyés à MacroGen Inc. (Corée du Sud) pour être séquencés. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel Chromas, version 2.33 (<http://www.technehsysiu.com.au/chromas.html>) puis traitées à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) du National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) selon la méthode décrite par **Altschul et al., (1997)**.

2.2.1.8. Cinétique de croissance et de production de bactériocine par les souches B3, B122, B222

Les souches de *Bacillus subtilis* B3, B122 et B222 ont été repiquées sur la gélose BHI et incubées à 37 °C pendant 18 heures. Une colonie de chaque souche a été ensemencée dans 10 ml de bouillon BHI puis incubée à 37 °C sous agitation (120 tpm). Quand la culture a atteint une densité optique (DO_{600}) = 1, 50 µl ont été transférés dans un Erlenmeyer de 100 ml contenant 50 mL de bouillon BHI. Les Erlenmeyers contenant les cultures ont ensuite été incubés à 37 °C sous agitation (120 tpm) puis 2 ml de chaque culture ont été prélevés chaque heure pour déterminer l'activité

antimicrobienne, la DO₆₀₀, le pH ainsi que la population bactérienne par ml (ufc/ml). Après centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes, le pH des surnageants obtenus ont été ajustés à pH 7 puis filtrés à travers des filtres Millipore stériles de diamètre 0,45 µm (**Xie et al., 2009**). L'activité antimicrobienne des filtrats a ensuite été vérifiée vis-à-vis de *B. cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion des puits. La DO₆₀₀ a été obtenue à l'aide du spectrophotomètre Shimadzu (Kyoto, Japan) et le pH à l'aide du pHmètre PHM 210 (Radiometer, Denmark).

2.2.1.9. Effet de l'aération sur la croissance et la production de bactériocine

25 ml, 50 ml et 75 ml de bouillon BHI (pH 7) contenus chacun dans un Erlenmeyer de volume 100 ml ont été inoculés avec une culture de 18 h de chaque souche de *B. subtilis* (concentration finale 10⁶ ufc/ml). Les flacons ont été mis sous agitation (120 tpm) à 37°C. Le même essai a été réalisé en condition statique. 10 h et 20 h après l'incubation, des prélèvements de culture ont été effectués pour déterminer l'activité antimicrobienne, la DO₆₀₀, le pH ainsi que la population bactérienne par ml (ufc/ml) tels que décrits précédemment.

2.2.2. Influence des conditions de culture sur la production de substances antimicrobiennes par les souches sélectionnées de *B. subtilis*

2.2.2.1. Influence de la composition du milieu d'incubation

Les graines de baobab ont été moulues à l'aide du moulin Bosch MKM 6003 et la poudre obtenue a été incorporée au bouillon BHI dans les proportions suivantes :

- Erlenmeyer 1 : 100% bouillon BHI;
- Erlenmeyer 2 : 99,95% BHI + 0,05% mouture de graines de baobab;
- Erlenmeyer 3 : 99,5% BHI + 0,5% mouture de graines de baobab;
- Erlenmeyer 4 : 95% BHI + 5% mouture de graines de baobab;

Erlenmeyer 5 : 50% BHI + 50% mouture de graines de baobab;

Erlenmeyer 6 : 100% mouture de graines de baobab;

Erlenmeyer 7 : 100% graines entières de baobab.

50 ml d'eau distillée ont été ajoutés à chaque mélange. Les différents mélanges ont été cuits pendant 5 heures en ajustant chaque fois le volume à 50 ml. A la fin de la cuisson, les différents mélanges ont été refroidis à 37°C avant d'y inoculer *B. subtilis* B3 à la concentration finale de 10^6 cellules/ml. Les cultures obtenues ont été incubées à 37°C sous agitation (120 tpm). Des échantillons ont été prélevés à t_0 , 10 et 20 heures après l'incubation pour déterminer l'activité antimicrobienne, la DO_{600} , le pH ainsi que la population bactérienne par ml (ufc/ml) tels que décrits précédemment. 3 essais ont été réalisés. La même expérience a été répétée en inoculant les souches B122 et B222.

2.2.2.2. Effet de l'adjonction de minéraux

Le bouillon *maari* a été obtenu en faisant cuire dans un Erlenmeyer de contenance 100 ml, 5 g de graines de baobab moulues dans 50 ml d'eau pendant 5 heures. A la fin de la cuisson, le mélange a été refroidi à 37°C. Avant d'y inoculer *B. subtilis* B3 à la concentration finale de 10^6 cellules/ml, les sels minéraux ont été incorporés séparément au bouillon *maari*, à des concentrations finales suivantes : 0,2 g/l $MgSO_4$; 0,15 mg/l $MnSO_4$ et 0,135 g/l $FeCl_3$ (**Tabbene et Slimene, 2009**). Les cultures obtenues ont été ensuite incubées sous agitation (120 tpm). Des échantillons ont été prélevés à t_0 , 10 et 20 heures après l'incubation pour déterminer l'activité antimicrobienne, la DO_{600} , le pH ainsi que la population bactérienne par ml (ufc/ml) tels que décrits précédemment. 3 essais ont été réalisés. La même expérience a été répétée en inoculant les souches B122 et B222.

2.2.2.3. Survie de *B. cereus* en co-culture avec les souches sélectionnées de *B. subtilis* dans le bouillon BHI, le bouillon *maari* et les graines cuites de baobab et de néré

Dans des Erlenmeyers contenant 50 ml de bouillon BHI, 50 ml de bouillon *maari*, 50 g de graines cuites de baobab, 50 g de graines cuites de néré, la souche *B. subtilis* B3 a été inoculée en monoculture (à une concentration finale de 10^6 ufc/ml) ainsi qu'en co-culture avec *B. cereus* NVH391-98 (concentration finale 10^3 ufc/ml). Après incubation à 37 °C sous agitation (120 tpm), des prélèvements ont été effectués à 0, 5, 10, 20, 30 et 40 heures pour déterminer le pH, le nombre de cellules viables (ufc/ml) de B3 ainsi que le nombre des cellules viables (ufc/ml) de *B. cereus* NVH391-98 (**Røssland et al., 2005**). Le nombre de cellules viables (ufc/ml) de B3 a été obtenu en incubant à 37 °C pendant 24 h, 1 ml du prélèvement inoculé dans la gélose BHI. Le nombre des cellules viables (ufc/ml) de *B. cereus* NVH391-98 a été obtenu en incubant à 37 °C pendant 24 h, 1 ml du prélèvement inoculé dans la gélose brillance *B. cereus* (Oxoid). 3 essais ont été réalisés. La même expérience a été répétée en inoculant les souches B122 et B222.

2.2.3. Propriétés antimicrobiennes, effets de l'acidité et de la bile sur les souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari*

2.2.3.1. Préparation des inocula des souches de bactéries lactiques isolées du *maari*

Chacune des 9 souches de bactéries lactiques a été repiquée sur la gélose MRS (Oxoid CM0361, Basingstoke, Hampshire, England) puis incubée en anaérobiose (GasPak system; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) pendant 48 h à 37 °C (**De Man et al., 1960**). Une colonie a étéensemencée dans 10 ml de bouillon MRS, pH 5,7 puis incubée à 37 °C pendant 18 h. La culture obtenue a été centrifugée à 5000 g (4 °C) pendant 15 min puis 10 ml de diluant stérile (Oxoid CM0733, Basingstoke,

Hampshire, England) à pH 6.5 ont été ajoutés au culot. La concentration cellulaire a ensuite été déterminée au microscope en utilisant la lame Neubauer (Wertheim, Germany).

2.2.3.2. Effet de l'acidité

La résistance à l'acide a été évaluée en utilisant le bouillon MRS pH 2,5 selon la méthode décrite par **Klingberg et al. (2005)**. 100 µl de suspensions cellulaires de chaque bactérie lactique contenant approximativement 10^7 ufc/ml ont été inoculés dans 10 ml de bouillon MRS (Oxoid CM0359), pH 2,5 puis incubés à 37 °C. Le même volume a été inoculé dans du bouillon MRS à pH 7. Des prélèvements ont été effectués à 0, 1, 2, 3 et 4 h. Chaque prélèvement a été ensemencé dans la gélose MRS (Oxoid CM0361). Les boîtes de Pétri ont été incubées en anaérobiose (GasPak system; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) à 37 °C pendant 48 h. A la fin de la période d'incubation, les colonies ont été dénombrées suivies de l'expression des résultats selon la norme **ISO 15214 (1998)**. Le taux de survie de chaque souche a été calculé comme étant le pourcentage des cellules obtenues à la fin de la période d'incubation par rapport à la concentration cellulaire initiale. Le pH a été également noté au début ($\text{pH}_{0\text{h}}$) et à la fin ($\text{pH}_{4\text{h}}$) de l'expérience. 3 essais ont été réalisés pour chaque souche.

2.2.3.3. Effet de la bile

La tolérance à la bile des souches de bactéries lactiques a été déterminée en utilisant la méthode décrite par **Klingberg et al. (2005)**. Pour ce faire, 100 µl de suspensions cellulaires de chaque bactérie lactique contenant approximativement 10^7 ufc/ml ont été inoculés dans 10 ml de bouillon MRS (Oxoid CM0359), pH 7 contenant 0,3% (w/v) bile oxgall (Sigma-Aldrich, Pcode: 30209037, Steinheim, Germany). Le même volume a été inoculé dans du bouillon MRS privé de bile oxgall. Les cultures ont ensuite été incubées à 37 °C et des prélèvements ont été effectués à 0, 1, 2, 3 et 4 h. Chaque prélèvement a été ensemencé dans la gélose MRS (Oxoid CM0361). Les boîtes de Pétri ont été incubées en anaérobiose (GasPak system; BBL Microbiology Systems, Cockeysville,

Md.) à 37°C pendant 48 h. A la fin de la période d'incubation, les colonies ont été comptées, suivies de l'expression des résultats selon la norme **ISO 15214 (1998)**. Le taux de survie de chaque souche a été calculé comme étant le pourcentage des cellules obtenues à la fin de la période d'incubation par rapport à la concentration cellulaire initiale. Le pH a été également noté au début (pH_{0h}) et à la fin (pH_{4h}) de l'expérience. 3 essais ont été réalisés pour chaque souche.

2.2.3.4. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des 9 souches lactiques a été évaluée par la méthode des spots (spot-on-lawn test) telle que décrite par **Jakobsen et al. (1999)**. 3 µl de chaque souche lactique (contenant 10⁵ cellules/ml) ont été déposés en double sur la gélose MRS modifiée (MRS contenant 0,2% glucose et 1,2% agar) préalablement séchée. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 30°C en anaérobiose (GasPak system; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). Après 24 h d'incubation, 7 ml de gélose MRS à 0,7% d'agar ont été mélangés avec une culture de 18 h de la souche indicatrice (concentration finale 10⁵ cellules/ml) puis versés à la surface de la gélose MRS modifiée. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C. Après 24 h d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des colonies ont été mesurés en mm. 3 essais ont été réalisés pour chaque souche.

2.3. Méthodes d'analyses statistiques des données

Les données ont été analysées et traitées sur EXCEL suivant une statistique descriptive avec des calculs de paramètres de position (moyenne) et de dispersion (écart-type).

CHAPITRE III :

RESULTATS ET DISCUSSION

3. 1. Etude de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de *Bacillus* spp. et *Lysinibacillus* spp. isolées du *maari*

3. 1.1. L'activité antimicrobienne en aérobie, en microaérobie et en anaérobie

10 souches dominantes de bactéries aérobies mésophiles isolées du *maari* (08 *Bacillus* spp. et 02 *Lysinibacillus* spp.) ont été examinées pour leur activité antimicrobienne contre des germes Gram positifs et Gram négatifs. Le tableau X regroupe les résultats de l'activité antimicrobienne de chacune des souches en aérobose, en microaérobie et en anaérobie. Les résultats ont révélé que l'activité antimicrobienne est fonction de la souche elle-même, du pathogène ainsi que des conditions d'incubations. Aucune inhibition n'a été observée en anaérobiose.

Aucune des souches testées n'a été à mesure d'inhiber les bactéries Gram négative, ce qui est en accord avec les résultats de **He et al. (2006)** et **Hyronimus et al. (1998)**. Excepté *B. circulans* B288 et *Lysinibacillus sphaericus* B371, toutes les autres souches testées ont inhibé au moins un pathogène. Les souches de *B. subtilis* B 3, B122 et B222 se sont montrées plus performantes en inhibant de manière remarquable la croissance de *B. cereus*, un des agents responsable de la diarrhée. La bactérie *Listeria monocytogenes* responsable d'altération des aliments est également sensible à l'activité antagoniste de B3, B122 et B222. Plusieurs auteurs (**Padonou et al., 2009**; **Parkouda et al., 2009**; **Parkouda et al., 2010**) ont signalé la forte concentration de *Bacillus cereus* (10^9 UFC/g) dans les aliments fermentés africains. L'inhibition de tels microorganismes opportunistes est donc d'un intérêt considérable pour améliorer les qualités hygiéniques et sanitaires du *maari* ainsi que d'autres condiments fermentés d'origine africaine. Certaines études ont montré que les souches de *Bacillus subtilis* produisent des substances antimicrobiennes comme la subtiline, la subtilosine et la sublancine (**Paik et al., 1998**; **Stein et al., 2004**) qui sont le plus souvent actives sur les bactéries Gram-positives (**Ouoba et al., 2007**).

Tableau X: Spectre d'activité antimicrobienne des 10 souches dominantes de bactéries aérobies incubées en aérobies, microaérobies et en anaérobies, à 37°C pendant 24 h par la méthode de diffusion des puits (zone d'inhibition exprimée en mm)

conditions d'incubation	Souches testées	Souches indicatrices															
		Bc 00	Bc11	Bc14	Bc98	BcF	BcNC	BcPA	Lm1	Lm2	Lm3	G1	G2	G3	G5	G7	*
Aérobies	B3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
	B47	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B55	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B122	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	B222	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	++	-	++	-
	B288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B317	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B360	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B371	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B455	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Microaérobies	B3	-	+	+	+	-	++	+	++	+	++	+	-	-	+	+	-
	B47	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B55	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B122	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	B222	+++	++	+	+++	-	-	-	++	+	++	+	+	++	-	++	-
	B288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B317	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B360	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B371	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B455	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaérobies	B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B317	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B371	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B455	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: aucune inhibition; +: 0 < zone Inhibition (IZ) < 3mm; ++: 3mm ≤ IZ < 5mm; +++: IZ ≥ 5mm.

*aucune inhibition n'a été observé contre les souches indicatrices M1, Si, Sn, So, St1, St2, St3, Sth, Ec, Ye1, Ye2, G4, G6, G8, G9 et G10

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation des souches de *Bacillus subtilis* B3, B122 et B222 en tant que cultures starter pourrait prévenir le développement des germes pathogènes durant la fermentation des graines de baobab conduisant à un produit final sain.

3. 1.2. Effet des enzymes, du pH et de la chaleur sur l'activité inhibitrice

Les substances antimicrobiennes produites par les souches sélectionnées de *B. subtilis* B3, B122 et B222 conservent leur activité antagoniste après avoir été soumises à des traitements thermiques allant jusqu'à 121 °C pendant 15 min ainsi qu'à une gamme de pH allant de 3 à 10 (Tableau XI). Ces caractéristiques qui sont en accord avec les résultats de **He et al. (2006)** et **Hyronimus et al. (1998)** confèrent aux substances antimicrobiennes un grand intérêt technologique pour leur utilisation dans la bioconservation des aliments (**Sutyak et al., 2008**).

Tableau XI: Effets des enzymes, de la température et du pH sur l'activité antimicrobienne des souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222

Traitements		<i>Bacillus spp./</i> Activité résiduelle (%)		
		B3	B122	B222
Enzymes	Catalase	100	100	100
	Papaïne	100	100	100
	Protéase (<i>Streptomyces</i>)	0	0	0
	ProteinaseK	100	100	100
	Trypsine	0	0	0
Température	4°C, 2 semaines	100	100	100
	40°C, 30 min	100	100	100
	60°C, 30 min	100	100	100
	80°C, 30 min	100	100	100
	100°C, 30 min	100	100	100
	121°C, 15 min	100	90	90
pH	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	100	100	100

L'activité antimicrobienne n'est pas affectée par l'addition de catalase. Ce résultat implique que l'inhibition de la croissance des cellules indicatrices n'est pas due à la

production de peroxydase d'hydrogène mais elle est vraisemblablement due à la production de biomolécule (s). L'activité inhibitrice des substances secrétées par B3, B122 et B222 persiste après contact avec la papaïne et la protéinase K mais disparaît complètement en présence de 2 enzymes protéolytiques (protéase obtenue de *Streptomyces griseus* et trypsine), ce qui indique la nature protéique du facteur antimicrobien produit par chacune des souches B3, B122 et B222. **Stein et al. (2002)** ont trouvé que la subtiline était résistante à la protéinase K alors que l'ericine S était résistante à la trypsine et à la pepsine. L'activité de la subtilosine disparaît complètement en présence de la pepsine et de la protéinase K et décroît de façon significative sous l'action de la trypsine et de la chymiotrypsine (**Sutyak et al., 2008**). Au regard de ces propriétés, on peut déduire que ces différentes substances antimicrobiennes produites sont des bactériocines (**Hyronimus et al., 1998**). Le fait que les substances antimicrobiennes retiennent leur activité après avoir été soumises à l'action de la papaïne et de la protéinase K montre que ce sont des peptides cycliques et de ce fait plus résistants à l'hydrolyse par les protéases (**Bizani et Brandelli, 2002**). La stabilité à haute température des substances antimicrobiennes produites par B3, B122 et B222 est similaire à celle observée pour la subtilosine et la subtiline (**Sutyak et al., 2008; Mannanov et Sattarova, 2001**).

3. 1.3. Poids moléculaire des substances antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne de la bactériocine produite par chacune des souches de *Bacillus subtilis* B3, B122 et B222 est associée à une seule bande protéique avec une masse moléculaire apparente d'environ 3,5 kDa comme le montre la Figure 6 (A et B). La masse moléculaire obtenue est voisine de celle de la subtilosine (3,40 kDa; **Marx et al., 2001**) et de la subtiline (3,32 kDa; **Stein, 2008**). La même bande est observée après 10 et 15 heures de croissance indiquant que l'activité antibactérienne observée en fin de phase stationnaire correspond à la même bactériocine possédant une bonne stabilité physique.

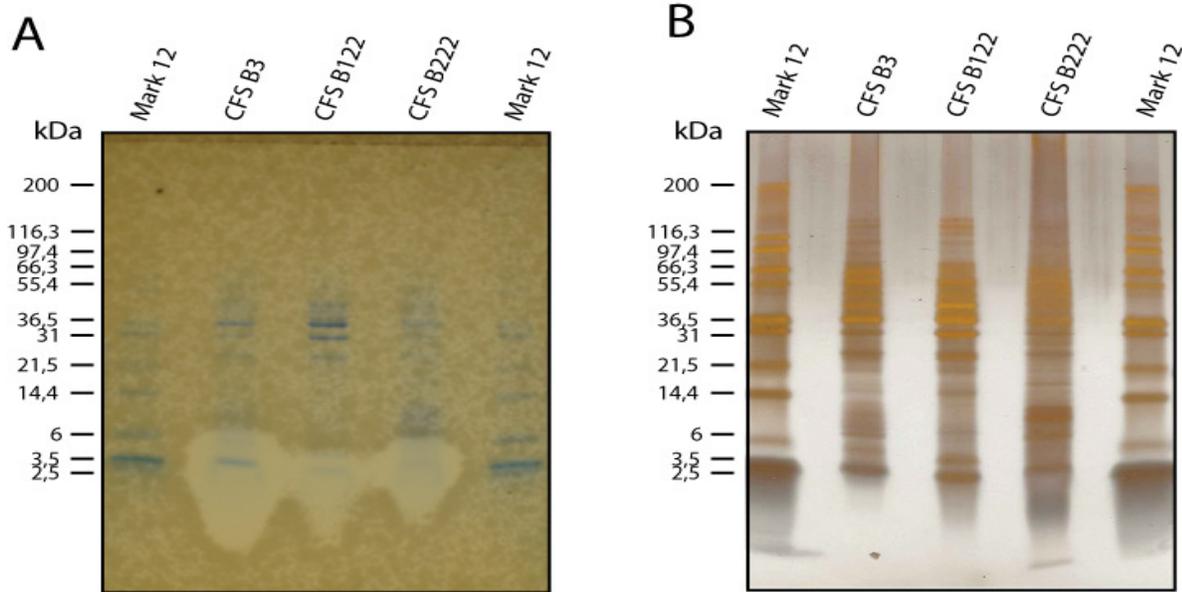


Figure 6: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines obtenues à partir des surnageants de B3, B122 et B222. A): Détection directe de l'activité antimicrobienne des protéines inhibitrices sur *B. cereus* NVH391-98 ; B): Gel traité à l'argent
 Mark 12: marqueur de poids moléculaire ; CFS B3, CFS B122 et CFS B222 représentent les surnageants respectifs de B3, B122 et B222

3. 1.4. Gènes codant pour la subtiline, la subtilosine, la sublancine et l'ericine

Les gènes intervenant dans la synthèse de la subtilosine (*osbo* et *sbo*) et de la subtiline (*spaS*) ont été identifiés dans chacune des souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 après amplification à l'aide d'amorces spécifiques (Figure 7 : a et b, tableau XII). Par contre les gènes *eriC* et *sunT* impliqués dans les synthèses respectives de l'ericine et de la sublancine n'ont pas été détectés au niveau de B3, B122 et B222.

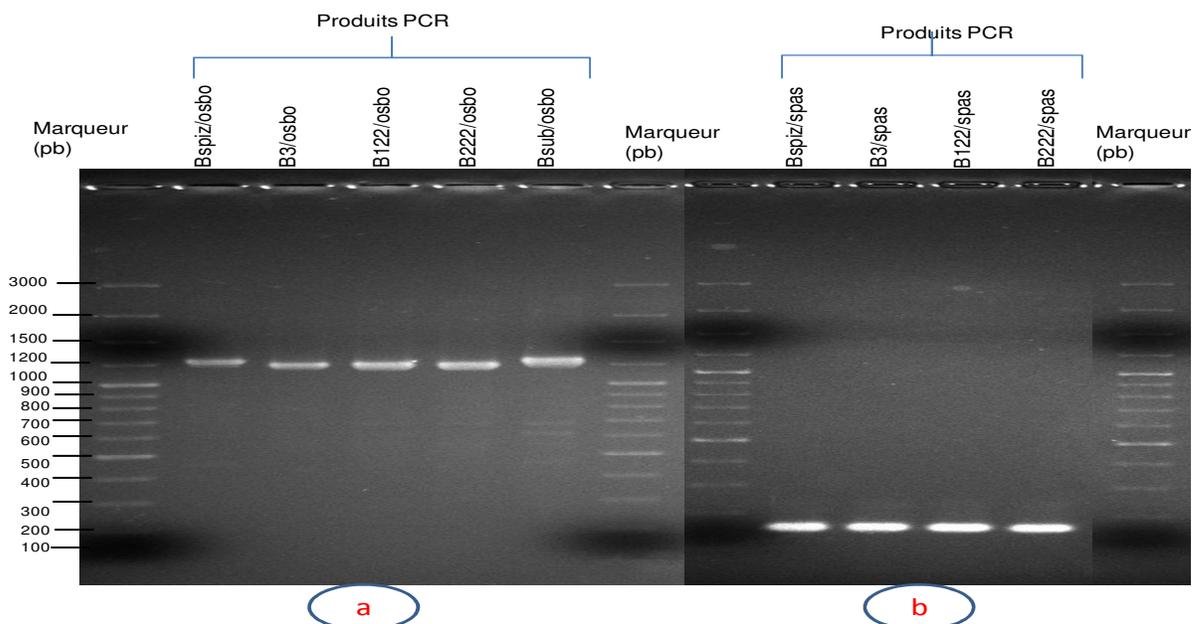


Figure 7. Electrophorèse des produits PCR obtenus à partir des surnageants de *Bacillus subtilis* B3, B122 et B222. Après PCR, 10 µl du produit ont été utilisés pour l'électrophorèse sur 1,5% gel agarose avec un marqueur de poids moléculaire (100 bp, Fermentas).

Programme de la PCR : 95°C/3min+30x{ 95°C/30 sec, 58°C/ 30sec, 72°C/ 1min}+ 72°C/10min

Bspiz/osbo : produit PCR de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* après action du primer osbo

Bsub/osbo : produit PCR de *B. subtilis* subsp. *subtilis* après action du primer osbo

B3/osbo, B122/osbo et B222/osbo : produits PCR obtenus par action du primer osbo sur les ADN des souches B3, B122 et B222 respectivement

Bspiz/spas : produit PCR de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* après action du primer spas

Bsub/spas : produit PCR de *B. subtilis* subsp. *subtilis* après action du primer spas

B3/spas, B122/spas et B222/spas : produits PCR de B3, B122 et B222 par action du primer spas respectivement

La subtiline est une bactériocine analogue à la nisine, appartenant à la classe 1 des bactériocine appelée lantibiotique (Klaenhammer, 1993). Plusieurs espèces de *B. subtilis* sont reconnues être des souches productrices de subtilosine (Stein et al., 2004; Sutyak et al., 2008). L'inhibition de *L. monocytogenes* et de *B. cereus* par la subtilosine (Sutyak et al., 2008) et la subtiline (Liu et Hansen, 1993) a déjà été reportée.

Tableau XII : Produits PCR obtenus /détectés

Bactériocine	Gènes	Primers	Sequences (5'→3')	Produits PCR attendus /détecté
Subtilosine	<i>ywiB</i>	osboP1N ^a	5'-CCTCATGACCAGGACTTCGCCTT-3'	1200 pb/oui
	<i>sboA</i>	osboP2N ^a	5'-CGGTGCCGAGCGCTTCAGGT-3'	
	<i>sboX</i>			
	<i>albA</i>			
Subtiline	<i>spoA</i>	sbo-alb_F	5'-CATGCTCGATCGGAGCCGCT-3'	536 pb/oui
	<i>sboX</i>	sbo-alb_R	5'-CGGCTGGCCCGGTTTCCAAG-3'	
	<i>spaS</i>	spaS_Fwd	5'-CAAAGTTCGATGATTTGATTTGGATGT-3'	152 pb/oui
	spaS_Rev	5'-GCAGTTACAAGTTAGTGTTTGAAGGAA-3'		
Sublancine	<i>sunT</i>	SUNT-F1	5'-GCTTTGTTAGAAGGGGAGGAAT-3'	974 pb/non
		SUNT-R1	5'-CTTGTCCCAACCCATAGGATAA-3'	
Ericine	<i>eriC</i>	Eric_F	5'-TCAACTGACCGGGCAGGAGC-3'	1440 pb/non
	<i>eriSa</i>	Eric_R	5'-AAGTATTTGGCCTACAGCGACTCG-3'	
	<i>eriSb</i>			

3. 1.5. Cinétique de croissance et de production de bactériocine

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les trois souches de *B. subtilis* sélectionnées présentent le même profil cinétique avec des densités optiques variables selon l'espèce comme le montre la figure 8. La production de bactériocine commence dès la fin de la phase exponentielle de croissance et atteint son maximum en quelques heures pendant la phase stationnaire avant de décroître puis disparaître ; ce qui pourrait s'expliquer par l'absorption par la cellule productrice ou la dégradation par les enzymes protéolytiques de la cellule productrice (**Parente et Ricciardi, 1999**). D'autres auteurs ont également signalé que la production respective de subtilosine (**Stein et al., 2004**) et de subtiline (**Kuboi et al., 1994**) commençait au début de la phase stationnaire.

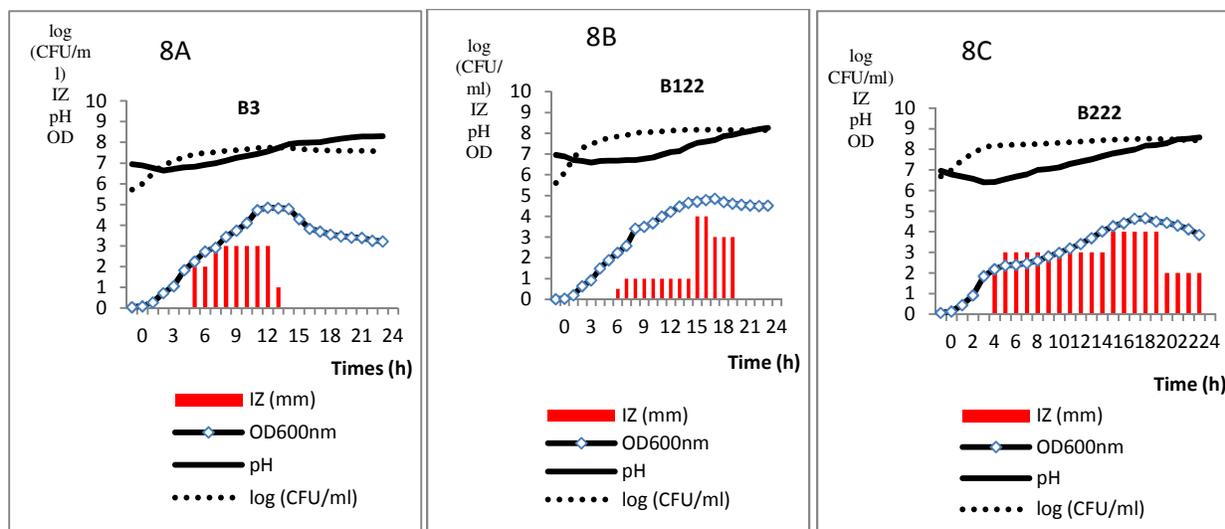


Figure 8. Cinétique de production de bactériocine pendant la croissance de *Bacillus subtilis* B3 (8A), B122 (8B) et B222 (8C) dans le bouillon BHI, à 37°C durant 24 h. La DO_{600nm} , la zone d'inhibition à l'encontre de *Bacillus cereus* NVH391-98 (IZ in mm), le pH et la population bactérienne (UFC/ml) sont déterminés chaque heure. Chaque point représente la moyenne de 2 essais.

3. 1.6. Effet de l'aération sur la croissance et la production de bactériocine

L'aération influence la production de bactériocine de chacune des 3 souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 et les rendements élevés sont atteints avec une concentration modérée en oxygène (50-75 ml BHI broth, 120 tpm) (Tableau XIII). Cependant aucune inhibition n'est observée en condition statique (25-75 ml bouillon BHI). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Nakano et al. (2000)** qui ont trouvé que la quantité de subtilosine était importante non seulement sous atmosphère modérée mais aussi en anaérobiose.

Tableau XIII: Effet de l'aération sur la production de bactériocine et la croissance bactérienne à 37 °C des souches sélectionnées de *B. subtilis* B3, B122 et B222

<i>Bacillus</i>	volume du BHI	Durée d'incubation	conditions statiques			Erlenmeyers en mouvement, 120 tpm			
			pH	log ₁₀ (ufc/ml)	IZ (mm)	pH	log ₁₀ (ufc/ml)	IZ (mm)	
<i>Bacillus subtilis</i> B3	25 ml BHI	0h	6,9	6,1	0	6,9	6,0	0	
		10h	7,0	8,7	0	7,2	8,8	0	
		20h	7,4	8,7	0	7,6	8,9	0	
	50 ml BHI	0h	6,9	6,1	0	6,9	6,1	0	
		10h	6,8	8,7	0	6,7	8,7	3	
		20h	6,9	8,6	0	7,7	8,8	0	
	75 ml BHI	0h	6,9	6,3	0	6,9	6,3	0	
		10h	6,7	8,3	0	6,6	8,3	2	
		20h	6,8	7,4	0	7,0	8,6	0	
	<i>Bacillus subtilis</i> B122	25 ml BHI	0h	6,9	6,2	0	6,9	6,2	0
			10h	6,9	8,2	0	7,5	8,3	1
			20h	7,1	8,2	0	8,6	8,7	0
50 ml BHI		0h	6,9	6,3	0	6,9	6,3	0	
		10h	6,8	8,5	0	6,7	8,7	2	
		20h	7,0	8,1	0	8,1	8,7	0	
75 ml BHI		0h	6,9	6,2	0	6,9	6,2	0	
		10h	6,7	8,1	0	6,3	8,4	1	
		20h	6,8	8,7	0	6,7	8,8	0	
<i>Bacillus subtilis</i> B222		25 ml BHI	0h	6,9	6,7	0	6,9	6,7	0
			10h	6,7	8,4	0	7,0	8,6	4
			20h	7,4	8,5	0,5	8,4	8,8	2
	50 ml BHI	0h	6,9	6,7	0	6,9	6,7	0	
		10h	6,6	8,1	0	6,7	8,3	1,5	
		20h	7,2	8,0	1	6,8	8,8	5	
	75 ml BHI	0h	6,9	6,7	0	6,9	6,7	0	
		10h	6,5	8,0	0	6,6	8,3	0	
		20h	6,9	8,0	0	6,8	8,6	3	

3. 1.7. Les séquences des produits PCR

Le séquençage a révélé la présence des gènes codant pour la subtiline et la subtilosine au sein de chacune des souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222. Les fragments séquencés ont présenté 100% d'homologie avec les gènes codant pour la subtilosine (*sboA*) isolés de *B. subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 contre 96,2% d'homologie avec les gènes codant pour la subtiline (*spaS*) isolé de *B. subtilis* subsp. *spizizeni* strain ATCC6633. Une délétion de 34 pb (correspondant à la position 3836300-3836333 dans le génome de *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168; GenBank: AL009126.3) a été observée à l'intérieur des gènes de *B. subtilis* B3, B122 et B222. La partie manquante appartient au gène *albA* (localisée à la position 3836323-3837669). Le premier gène de cet opéron *alb* appelé *albA* (*ywiA*) (Kunst et al., 1997) intervient dans la maturation de la prosubtilosine (Zheng et al., 1999). Ainsi, la délétion de cette partie modifie l'activité de la subtilosine finale. Alternativement, une petite délétion pourrait aussi inactiver la possibilité de B3, B122 et B222 de produire une subtilosine biologiquement active. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques obtenues ont bénéficié des numéros d'accèsion GenBank JN118835-JN118839.

3. 2. Influence du substrat sur la production de bactériocine par les souches sélectionnées de *B. subtilis* (isolées du *maari*)

3. 2.1. Influence du substrat

Les résultats obtenus (Tableau XIV) ont révélé une bonne croissance des 3 souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 ainsi que *B. subtilis* ATCC6051 (référence) dans les graines cuites de baobab ainsi que dans le bouillon *maari* bien qu'aucune activité antimicrobienne n'a été observée dans ces substrats. Par contre, l'activité antimicrobienne est observée dans le bouillon BHI non incorporé ainsi que dans le BHI incorporé à 0,05%, 0,5% et 5% avec la mouture de graines de baobab ; l'activité antimicrobienne s'est amoindrie dans le BHI incorporé à 50% avec la mouture de graines de baobab. Par ailleurs, il a été remarqué que l'activité antimicrobienne est

maximale dans le BHI incorporé à 5% avec la mouture de graines de baobab. La même tendance a été observée en utilisant la souche *B. subtilis* subsp. *spizizenii* comme contrôle positif qui, à la différence des souches du *maari*, a présenté toujours l'activité antimicrobienne dans les graines bouillies de baobab et de néré.

Tableau XIV: Effet de la supplémentation du BHI avec la mouture de graines de baobab sur l'activité antimicrobienne des souches de *Bacillus subtilis* B3, B122, B222, *B. spizizenii* et *B. subtilis* ATCC 6051 à l'encontre de *B. cereus* NVH391-98, à 37°C, pendant 20 h*

Souches testées	Conditions d'Incubation	B3			B122			B222			<i>B. subtilis spizizenii</i>			<i>B. subtilis</i> ATCC6051		
		pH	log (CFU/ml)	IZ (mm)	pH	log (CFU/ml)	IZ (mm)	pH	log (CFU/ml)	IZ (mm)	pH	log (CFU/ml)	IZ (mm)	pH	log (CFU/ml)	IZ (mm)
Bouillon BHI 100%	0h	7,051	6,32	0	7,047	6,32	0	7,019	6,15	0	7,134	6,20	0	7,122	6,32	0
	10h	6,809	8,56	2	6,794	8,41	1	6,688	8,56	4	6,558	8,15	0	6,629	8,64	1
	20h	7,106	8,86	0	7,224	8,86	2	6,995	8,53	6	6,750	8,67	0,5	6,660	8,87	2
BHI+ 0,05% mouture graine de baobab (w/w)	0h	7,086	6,43	0	7,002	6,36	0	7,252	6,20	0	7,009	5,82	0	7,059	5,87	0
	10h	6,921	8,58	2	6,884	8,52	2	6,814	8,70	3	6,488	8,53	0	6,508	8,72	1,5
	20h	7,222	8,91	0	7,379	8,89	2	7,251	8,79	6	6,701	8,81	1	6,603	8,91	2
BHI+ 0,5% mouture graine de baobab (w/w)	0h	7,058	6,32	0	7,015	6,38	0	7,232	6,18	0	7,048	5,82	0	7,005	5,85	0
	10h	6,906	8,56	2	6,915	8,66	3	6,784	8,56	4	6,589	8,72	1	6,689	8,69	1
	20h	7,500	8,89	1	7,469	8,91	3	7,212	8,85	7	6,802	8,85	2	6,494	8,90	2
BHI+ 5% mouture graine de baobab (w/w)	0h	7,070	6,28	0	7,013	6,34	0	7,222	6,08	0	7,091	5,83	0	7,053	5,86	0
	10h	6,908	8,53	5	6,999	8,49	5	6,766	8,51	5	6,600	8,61	2	6,700	8,70	1
	20h	7,599	8,79	7	7,528	8,87	5	7,262	8,94	8	6,803	8,86	3	6,803	8,94	2
BHI+ 50% mouture graine de baobab (w/w)	0h	7,097	6,40	0	7,017	6,04	0	7,032	6,15	0	7,023	5,86	0	7,001	5,87	0
	10h	6,693	8,59	1	6,875	8,20	0	6,285	8,53	0	6,509	8,59	3	6,509	8,71	1
	20h	7,650	8,89	2	7,274	8,85	2	6,852	8,91	1	6,777	8,85	3	6,402	8,92	2
100% mouture graine de baobab	0h	7,035	6,34	0	7,011	6,32	0	6,849	6,38	0	7,104	6,00	0	7,028	6,41	0
	10h	5,561	8,54	0	6,040	8,57	0	5,447	7,53	0	6,506	8,38	6	6,304	8,62	0
	20h	7,888	8,86	0	7,774	8,85	0	5,661	7,87	0	6,202	8,94	8	6,091	8,85	0
Graines de baobab cuites	0h	7,122	6,36	0	7,144	6,51	0	6,969	6,00	0	7,022	6,15	0	7,051	6,36	0
	10h	6,867	8,67	0	6,490	8,67	0	6,277	8,38	0	6,159	7,53	0	6,541	8,52	0
	20h	6,999	8,95	0	7,233	8,91	0	6,886	8,94	0	5,967	8,64	3	6,156	8,79	0

*La zone d'inhibition (IZ en mm), le pH, la population bactérienne (UFC/ml) ont été déterminés à 0, 10 et 20 heures d'incubation. Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais.

3. 2.2. Effet de l'adjonction de minéraux

Les éléments minéraux sont reconnus comme des facteurs importants dans la biosynthèse des substances antimicrobiennes et autres produits métaboliques par les microorganismes. L'incorporation combinée ou seule du FeCl_3 , du MgSO_4 et du MnSO_4 au bouillon *maari* n'a causé aucune activité antimicrobienne bien que ces éléments minéraux aient été rapportés comme facteurs importants améliorant la production de composés antimicrobiens par *B. subtilis* (Tabbene et Slimene, 2009).

3. 2.3. Survie de *B. cereus* en co-culture avec les souches sélectionnées de *B. subtilis* dans le bouillon BHI, le bouillon *maari* et les graines cuites de baobab et de néré

La survie de *B. cereus* NVH391-98 en coculture avec *B. subtilis* B3, B122 et B222 a été réalisée dans le BHI, le bouillon *maari* ainsi que dans les graines cuites de baobab et de néré. Les résultats montrent une inhibition totale de *B. cereus* NVH391-98 dans le BHI (Figure 9 : A) avec une croissance remarquable des souches B3, B122 et B222 (Figure 9 : B, C, D).

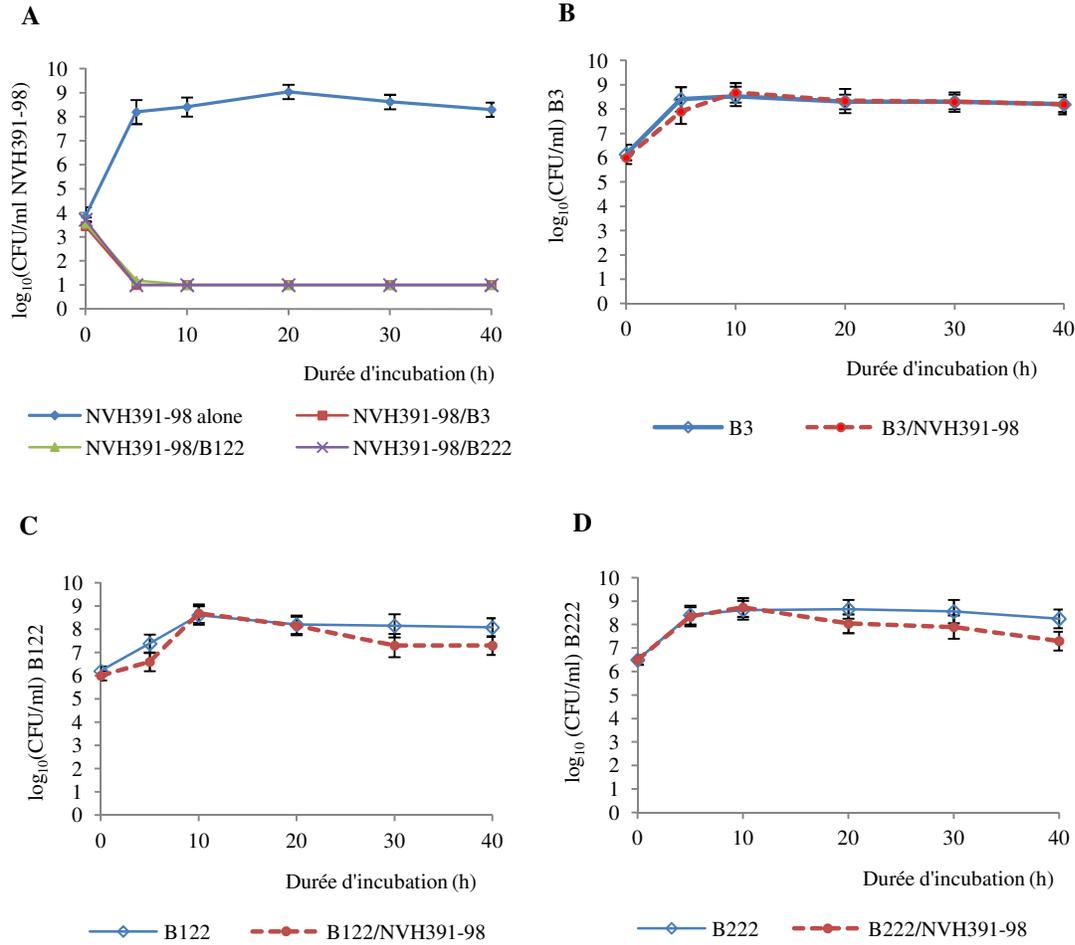


Figure 9. Evolution de la population bacterienne des 3 souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 ainsi que de *B. cereus* NVH391-98 en incubation dans le bouillon BHI à 37 °C pendant 40 h.

Même si aucune activité antimicrobienne n'a été observée dans les graines cuites et dans le bouillon *maari*, la croissance de *B. cereus* NVH391-98 a été retardée comme le montrent les figures 10, 11 et 12. En outre *B. subtilis* B3 et B222 comparativement à B122, se sont montrés plus efficaces dans l'inhibition de *B. cereus* NVH391-98.

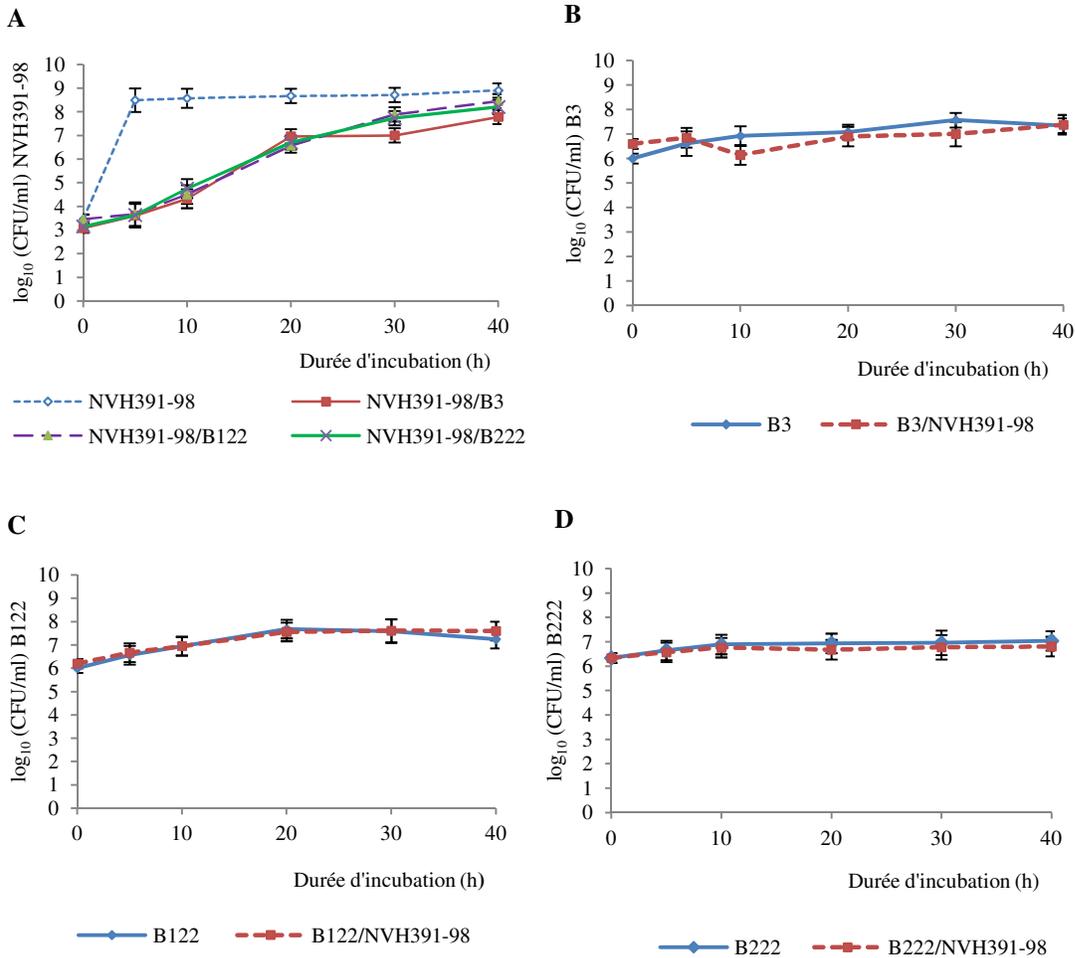


Figure 10. Evolution de la population bactérienne des 3 souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 ainsi que de *B. cereus* NVH391-98 en incubation dans le bouillon *maari* à 37°C pendant 40 h.

Ces résultats sont similaires à ceux de **Motta et Brandelli (2008)** qui ont rapporté que les souches de *Bacillus* spp. présentent une activité antimicrobienne plus élevée dans le bouillon BHI que dans le blé. Ce résultat pourrait s'expliquer par une faible activité protéolytique entraînant un faible métabolisme dans les substrats naturels (**Moreno et al., 2002**). Selon **Nascimento et al. (2010)**, l'absence d'activité antimicrobienne dans le substrat naturel est liée aux interactions entre les substances antimicrobiennes et les autres composés tels que les lipides. Cependant **Ouoba et al. (2007)** ont rapporté que les souches *B. subtilis* B7 et B15 isolées du *soumbala* (un autre condiment ayant des caractéristiques organoleptiques/sensorielles similaires au *maari*) inhibaient les germes pathogènes comme *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *B. cereus* pendant

la production du *soumbala* ; ce qui représente un avantage hygiénique pour le *soumbala* produit par ces *B. subtilis* B7 et B15.

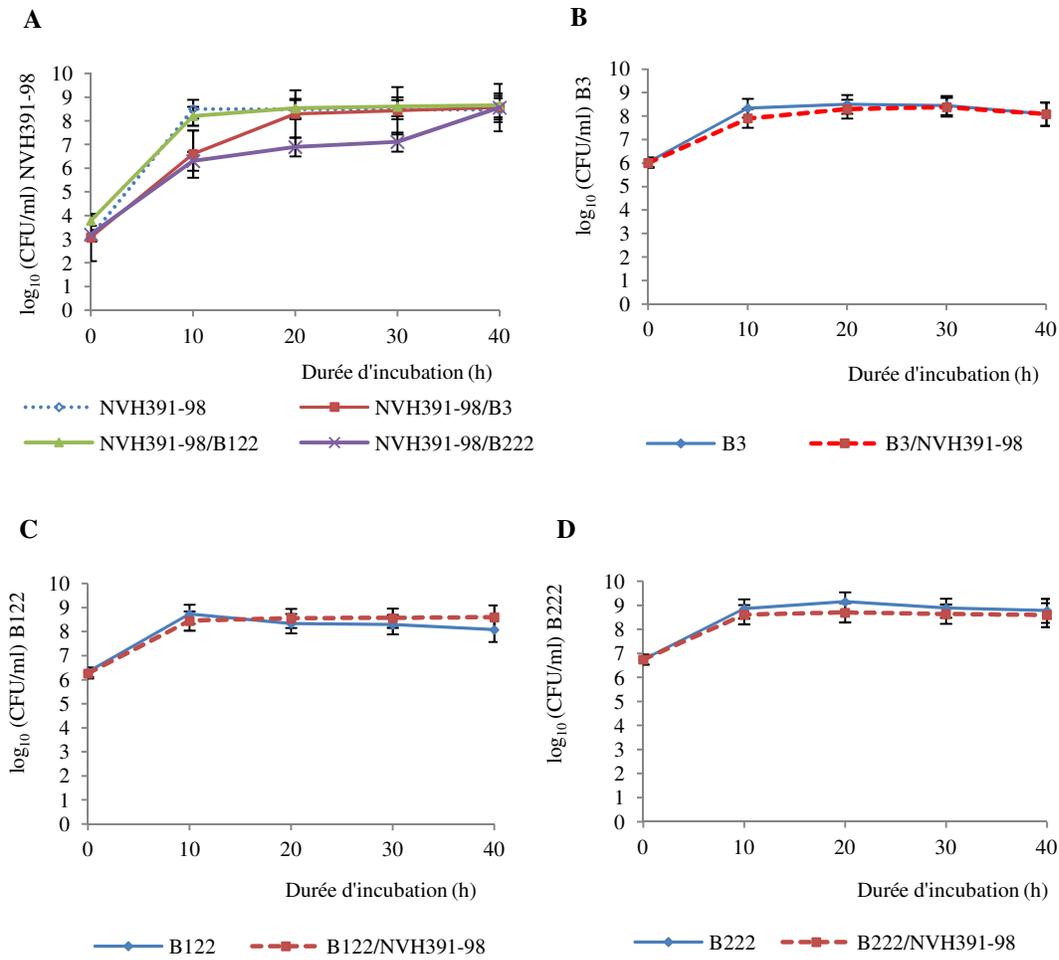


Figure 11. Evolution de la population bactérienne des 3 souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 ainsi que de *B. cereus* NVH391-98 en incubation dans les graines cuites de baobab à 37°C pendant 40 h.

La souche *B. cereus* NVH391-98 inoculée en monoculture dans le BHI et dans les graines cuites peut atteindre une population de 8-9 \log_{10} cfu/ml. Une tendance similaire de *B. cereus* a été observée dans les graines de soja (Nout et al. 1987), dans le lait non fermenté (Wong et Chen, 1988), dans le lait pasteurisé (Røssland et al., 2003) ainsi que dans une boisson à base de maïs appelée *mageu* (Byaruhanga et al., 1999). Ce qui implique que *B. cereus* NVH391-98 en monoculture pourrait atteindre un niveau toxique.

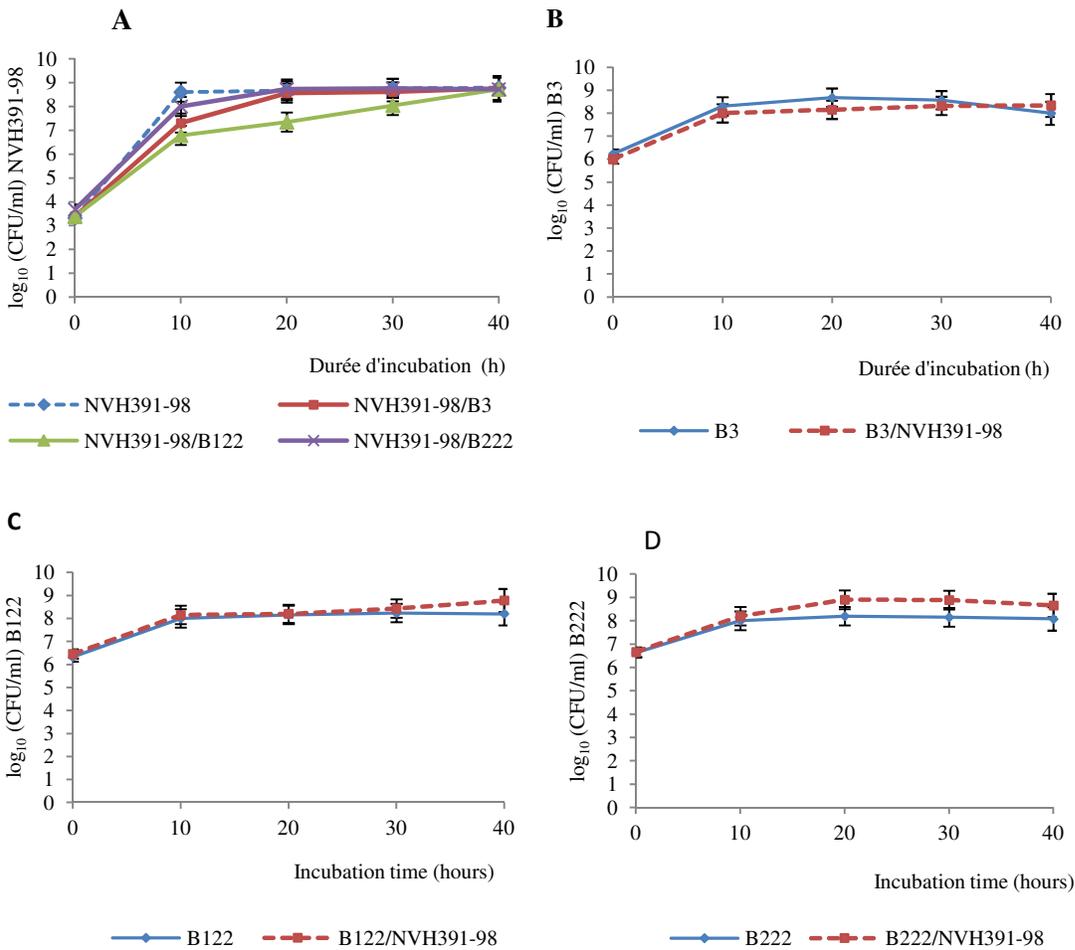


Figure 12. Evolution de la population bacterienne des 3 souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 ainsi que de *B. cereus* NVH391-98 au cours de l'incubation à 37°C pendant 40 h dans les graines cuites de néré

Dans la présente étude, les souches *B. subtilis* B3, B122 et B222 ont pu inhiber *B. cereus* NVH391-98 après 5-10 h d'incubation dans le bouillon BHI. Ces résultats sont en accord avec notre précédente étude qui a révélé que B3, B122 et B222 produisaient des substances antimicrobiennes notamment la subtiline et la subtilosine, plus actives contre *L. monocytogenes* et *B. cereus* (Kaboré et al., 2012). Røssland et al. (2005) ont montré que l'inhibition peut être due non pas seulement aux substances antimicrobiennes mais à la compétition de nutriments. En co-culture, les souches de *B. subtilis* ont un taux d'inoculum ($6 \log_{10}$ cfu/ml) supérieur à celui de *B. cereus* NVH391-

98 ($3 \log_{10}$ cfu/ml). Il est vraisemblable que la croissance rapide d'une forte population de *B. subtilis* pourrait empêcher la croissance des autres microorganismes tout simplement en s'accaparant de la majorité des nutriments assimilables et des cofacteurs ou même par occupation physique de l'espace disponible (**Rössland et al., 2005**).

Au regard des résultats obtenus, Il pourrait être suggéré l'utilisation de souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222 comme cultures starter pour inhiber la croissance de *B. cereus* NVH391-98 au cours de la production du *maari*. Cette suggestion s'appuie sur le fait que la croissance de *B. cereus* NVH391-98 a été retardée en co-culture avec les souches de *B. subtilis* B3, B122 et B222.

3. 3. Propriétés antimicrobiennes, effets de l'acidité et de la bile sur les souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari*

3. 3.1. Effet de l'acidité

Les résultats obtenus (Tableau XV) montrent que la souche *Pediococcus acidilactici* L87 a survécu au pH 2,5 pendant 4 h alors qu'une légère décroissance de la population de *Pediococcus acidilactici* L169 a été notée dans les mêmes conditions. La survie de *Enterococcus faecium* L154 a été considérablement affectée à pH 2,5.

Tableau XV: Résistance à l'acidité des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari*

Souches de BAL	pH du MRS	Viabilité cellulaire [log (CFU/ml)]					Taux survie	pH du MRS		
		0h	1h	2h	3h	4h	4h (%)	pH _{0h}	pH _{4h}	
<i>Enterococcus faecium</i>	L9	pH7	6,00	6,46	7,15	8,08	8,53	142,17	7,03	6,21
		pH2,5	6,15	6,18	3,38	1,15	<1	0	2,51	2,51
	L104	pH7	6,30	6,46	7,15	8,08	8,53	135,40	7,02	5,53
		pH2,5	6,41	1,18	<1	<1	<1	0	2,53	2,43
	L117	pH7	6,30	6,46	7,45	7,72	7,81	123,97	6,99	5,72
		pH2,5	6,38	5,91	2,51	<1	<1	0	2,53	2,45
	L134	pH7	6,26	6,34	6,99	7,48	7,95	127,00	7,01	6,07
		pH2,5	6,15	4,41	1,26	<1	<1	0	2,52	2,51
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	L154	pH7	6,23	5,94	6,30	6,95	7,73	124,08	6,97	5,82
		pH2,5	6,27	5,95	4,89	2,38	1,76	28,07	2,50	2,56
	L142	pH7	6,43	6,60	6,81	7,04	7,23	112,44	6,93	6,76
		pH2,5	6,30	6,11	5,48	<1	<1	0	2,50	2,55
<i>Pediococcus acidilactici</i>	L152	pH7	6,28	6,36	6,76	7,30	7,54	120,06	6,99	6,83
		pH2,5	6,15	5,97	5,78	<1	<1	0	2,52	2,59
	L169	pH7	6,38	6,32	6,46	6,60	7,30	114,42	6,95	6,06
		pH2,5	6,32	6,11	6,15	6,11	6,08	96,20	2,51	2,50
L87	pH7	6,34	6,97	6,82	6,98	7,48	117,98	7,01	6,80	
	pH2,5	6,20	6,67	6,69	6,69	6,69	107,90	2,50	2,49	

Des résultats obtenus, les 3 souches pourraient survivre dans les conditions acidiqes. Cependant, le pH 2,5 a été discriminatoire du fait que 3 souches sur un total de 9 ont survécu au pH 2,5 pendant 4 h. Le fait que *P. acidilactici* L87 ait survécu à pH 2,5 est en accord avec les résultats rapportés par **Erkkilä et Petäjä (2000)**.

3. 3.2. Effet de la bile

Gilliland et al. (1984) de même que **Goldin et al. (1992)** ont recommandé d'utiliser la bile à 0,3% comme concentration convenable pour la sélection des bactéries probiotiques. Bien que certains auteurs aient rapporté que cette concentration de la bile est discriminatoire (**Chateau et al., 1994; Papamanoli et al., 2003**), toutes les souches de bactéries lactiques testées dans la présente étude ont survécu à la bile à 0,3% comme le montre le tableau XVI. Des résultats similaires ont été rapportés par **Sukumar et Ghosh (2010)**. Selon **Klayraung et al. (2008)**, les sels biliaires ont la capacité d'accroître la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries.

Tableau XVI : tolérance à la bile des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari*

BAL	Codes	Population bactérienne [log ₁₀ (UFC/ml)] dans 0,3% oxgall					Taux survie 4h (%)	pH MRS	
		0h	1h	2h	3h	4h		pH _{0h}	pH _{4h}
<i>Enterococcus faecium</i>	L9	6,25	6,99	7,75	7,81	8,04	128,64	7,01	5,98
	L104	6,41	6,75	7,57	8,04	8,63	134,63	7,03	6,46
	L117	6,23	6,43	6,98	7,60	7,78	124,88	7,01	5,40
	L134	6,28	6,80	7,95	8,08	8,46	134,71	6,99	5,82
	L154	6,26	6,08	6,52	6,76	7,60	121,41	7,03	5,91
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	L142	6,30	6,41	6,53	6,66	6,98	110,79	7,04	7,01
	L152	6,23	6,53	6,78	7,04	7,40	118,78	7,05	7,03
<i>Pediococcus acidilactici</i>	L169	6,28	6,30	6,26	6,34	7,34	115,77	7,01	6,70
	L87	6,11	6,67	7,08	7,26	7,34	120,13	7,03	6,93

3. 3.3. Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que toutes les 9 souches testées (5 *Ent. faecium*, 2 *P. acidilactici* et 2 *Ent. casseliflavus*) sont capables d'inhiber la croissance de *B. cereus*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria* spp. et *M. luteus* (Tableau XVII). La figure 13 illustre l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques (L87, L154 et L169) par la méthode de spot avec des zones d'inhibition claires.

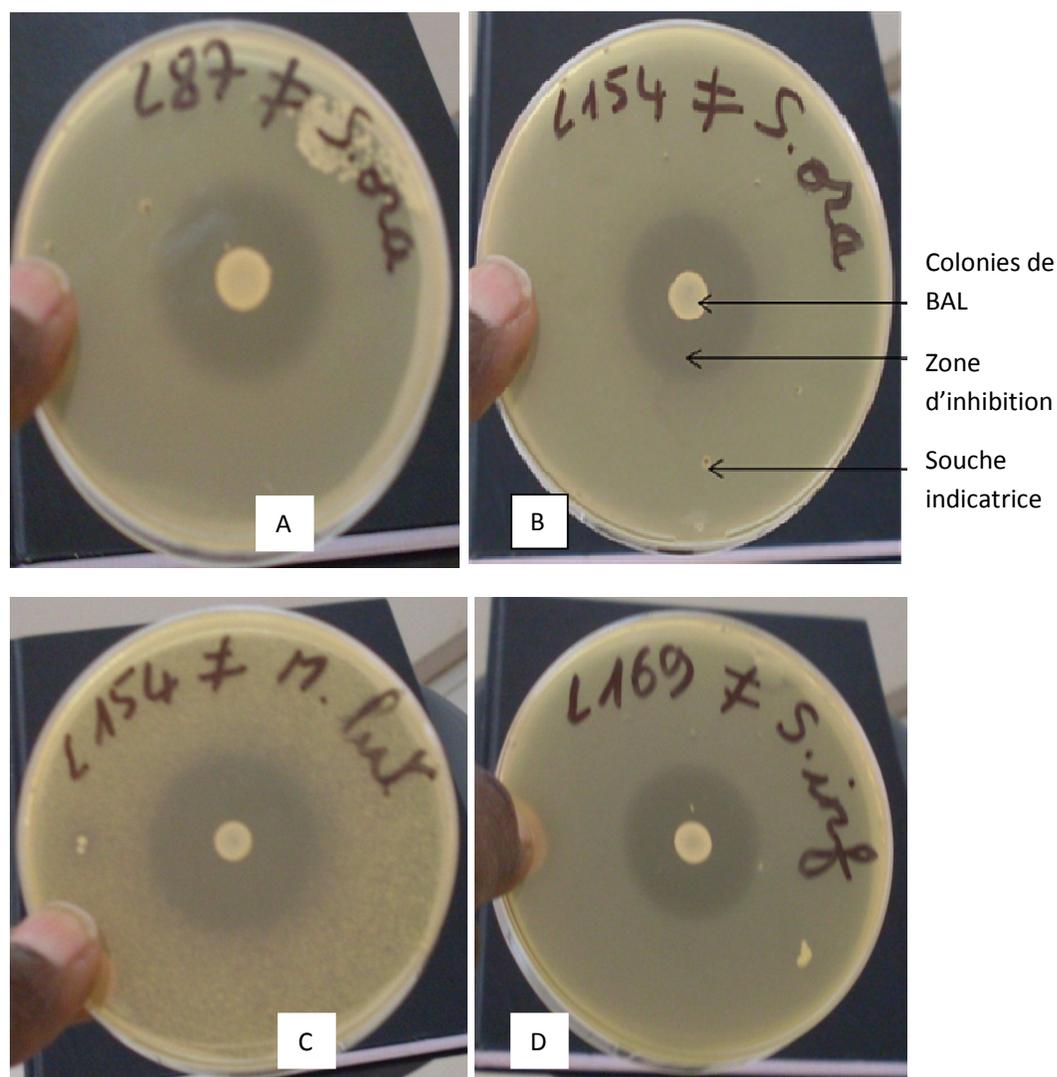


Figure 13. Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques (L87, L154 et L169) par la méthode de spot :
A: activité antimicrobienne de *Pediococcus acidilactici* L87 à l'encontre de l'indicateur SKN 1157 *Salmonella oranienburg*
B: activité antimicrobienne de *Enterococcus faecium* L154 à l'encontre de l'indicateur SKN 1157 *Salmonella oranienburg*
C: activité antimicrobienne de *Enterococcus faecium* L154 à l'encontre de l'indicateur SKN 624 *Micrococcus luteus*
D: activité antimicrobienne de *Pediococcus acidilactici* L169 à l'encontre de l'indicateur SKN 557 *Salmonella infantis*.

Tableau XVII. Spectre de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari*

Souches indicatrices	BAL	<i>Enterococcus faecium</i>					<i>Enterococcus casseliflavus</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>	
		L9	L104	L117	L134	L154	L142	L152	L87	L169
<i>Bacillus cereus</i> 11		++	++	++	++	++++	++	+	++	++
<i>Bacillus cereus</i> 14		+++	++	++	++	++	+	+	+++	+++
<i>Bacillus cereus</i> 391-98		+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++
<i>Bacillus cereus</i> 007525		++	++	++	++	++	+	+	++	+
<i>Bacillus cereus</i> F 4810-72		++	++	++	++	++	+	+	+++	+
<i>Bacillus cereus</i> NC 7401		+++	++	++	++	++	+	+	+++	+
<i>Bacillus cereus</i> PA24		++	+	+	+	++	+	+	++	++
SKN 557 <i>Salmonella infantis</i>		++	++	++	++	++	+	+	++	+++
SKN 1157 <i>Salmonella oranienburg</i>		++	++	++	++	++	+	+	++	+++
SKN 1160 <i>Salmonella nigeria</i>		++	++	+	++	++	+	+	++	++
SKN 565 <i>Salmonella thompson</i>		++	++	++	++	++	+	+	++	++
SKN 533 <i>Salmonella typhimurium</i>		++	++	++	++	++	+	+	+++	++
SKN 1152 <i>Salmonella typhimurium</i>		+++	++	++	++	++	+	+	++	++
SKN 1155 <i>Salmonella typhimurium</i>		+++	++	++	++	++	+	+	++	++
SKN 541 <i>E. coli</i> 81 nr. 149		++	++	++	++	++	+	+	++	++
SKN 599 <i>Yersinia enterocolitica</i> 6A28		-	-	-	-	-	-	-	-	-
SKN 601 <i>Yersinia enterocolitica</i> 8A30		-	-	-	-	-	-	-	-	-
SKN 1018 <i>Listeria monocytogenes</i> 057		++	++	++	++	++	+	+	++	++
SKN 1009 <i>Listeria monocytogenes</i> L028		+	++	+	++	++	+	+	++	++
SKN 1014 <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A		++	+	++	++	++	+	+	++	++
SKN 624 <i>Micrococcus luteus</i>		++	+	++	++	++	+	+	++	++

Zone d'inhibition (IZ) exprimée en mm ; chaque valeur représente la moyenne de 2 essais
 -: aucune inhibition; +: 0 < Zone d'inhibition (IZ) ≤ 5mm; ++: 6mm ≤ IZ ≤ 10mm; +++: 11mm ≤ IZ ≤ 15mm; ++++: IZ ≥ 16mm

Des résultats similaires ont été rapportés sur l'activité antimicrobienne des espèces *Ent. faecium*, *Ent. casseliflavus* et *P. acidilactici* (Osmanagaoglu et al., 1998; Kučerová et al., 2009; Sukumar et Ghosh, 2010; Bhakta et al., 2010; Yuksekdog et Aslim, 2010). En outre l'activité ant-listeria des entérocoques est bien connue et

pourrait s'expliquer par le fait que les entérocoques et les listeria soient phylogenetiquement proches (**Kučerová et al., 2009**). Les bactéries lactiques peuvent produire des substances antimicrobiennes comme les acides organiques, l'eau oxygénée ou le diacétyle capable d'inhiber la croissance des germes pathogènes (**Yuksekdag et Aslim, 2010**). Aucune souche n'a été à mesure d'inhiber le genre *Yersinia*, ce qui concorde avec les résultats rapportés par **Yuksekdag et Aslim (2010)**. **Visser et al. (1996)** ont mis en évidence la présence d'un facteur YadA contribuant à la résistance de *Y. enterocolitica* face aux substances antimicrobiennes.

Au vu des résultats obtenus, les souches *P. acidilactici* (L87 et L169) et *Ent. faecium* strain L154 pourraient contrôler la croissance des germes indésirables dans le *maari*. Les espèces *P. acidilactici* et *Ent. faecium* ont déjà été suggérées comme cultures starter dans certaines fermentations (**Sukumar et Ghosh, 2010; De Castro et al., 2002; Leroy et al., 2003**). Cependant, il convient de pousser les investigations sur l'innocuité de la souche *Ent. faecium* L154 car elle a été citée dans certaines infections nosocomiales (**Giraffa, 2003**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les souches dominantes de bactéries aérobies mésophiles isolées des graines fermentées de baobab ont été évaluées et les résultats ont montré que 3 souches de *Bacillus subtilis* (B3, B122 et B222) étaient dotées de propriétés antimicrobiennes à l'encontre des microorganismes pathogènes notamment *L. monocytogenes* et *B. cereus*. La caractérisation physico-chimique a montré que les substances secrétées par les 3 souches sont des bactériocines. Il s'est avéré que l'aération joue un rôle important sur la croissance cellulaire et la production de bactériocines par les 3 souches de *Bacillus subtilis* (B3, B122 et B222) étant donné qu'une forte sécrétion de bactériocine a été observée sous aération modéré. Les gènes de structure de la subtiline et de la subtilosine ont été identifiés dans le génome de B3, B122 et B222 par amplification à l'aide d'amorces spécifiques d'ADN. Le séquençage d'une partie des gènes impliqués dans la production de bactériocine a permis d'identifier une organisation génétique originale. Par ailleurs, la composition du milieu d'incubation influence fortement la production de bactériocine par les souches sélectionnées de *B. subtilis* B3, B122 et B222 (isolées du *maari*). En ce sens, un maximum d'activité antimicrobienne a été observé dans le milieu BHI incorporé avec 5% de mouture de graines de baobab pour B3, B122 et B222. La capacité de production de bactériocine fait des *B. subtilis* B3, B122 et B222, des souches prometteuses pour former un consortium de cultures starter avec activité inhibitrice de la croissance des germes pathogènes durant la production du *maari*.

L'activité antimicrobienne, la résistance à l'acidité ainsi que la tolérance à la bile ont été étudiées au sein des souches dominantes de bactéries lactiques isolées du *maari*. Deux souches de *P. acidilactici* (L87 et L169) et une souche *Ent. faecium* (L154) ont présenté une activité antimicrobienne contre une gamme importante de germes pathogènes notamment 7 espèces de *B. cereus*, 7 espèces de *Salmonella* spp., 3 espèces de *L. monocytogenes*, une espèce de *E. coli* et une espèce de *M. luteus*. Les souches L87, L169 et L154 ont également présenté une bonne capacité à survivre dans les conditions acides ainsi qu'en présence de la bile. Ces différentes propriétés font des souches L87, L154 et L169, des candidats prometteurs pour constituer une culture starter pour le contrôle et l'optimisation de la fermentation du *maari*.

Au regard des résultats obtenus, un consortium de cultures starters composés des souches sélectionnées de *B. subtilis* (B3, B122 et B222) et de bactéries lactiques

(L87, L154 et L169) s'avère efficace pour la fermentation contrôlée des graines de baobab.

Cette étude est une contribution à la connaissance et à la valorisation des produits fermentés traditionnels du Burkina Faso notamment le *maari*. Elle a permis de:

- déterminer les propriétés antimicrobiennes des souches dominantes isolées au cours de la fermentation des graines de baobab ;
- déterminer l'influence de la composition du milieu d'incubation sur la production de bactériocine par les souches sélectionnées de *B. subtilis* isolées du *maari* ;
- disposer de données scientifiques sur les souches dominantes isolées du *maari* ;
- disposer de données sur le baobab.

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de souches sélectionnées comme cultures starter permettrait de contrôler la fermentation des graines de baobab, d'améliorer la qualité bactériologique du *maari* final en limitant les risques de contamination, d'assurer la sécurité sanitaire du *maari* et de préserver la santé du consommateur. Le présent travail devra cependant être poursuivi et complété par d'autres études notamment:

- la réalisation de fermentations contrôlées par inoculation de cultures starter de *B. subtilis* et de bactéries lactiques avec l'application des Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH) et des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), suivie de la caractérisation biochimique, microbiologique et organoleptique de la matière première, des produits intermédiaires et des produits finis ;
- le développement de cultures starter à l'état lyophilisé ou déshydraté, plus pratiques pour les unités de production ;
- l'étude de la capacité de dégradation des protéines, des lipides et des glucides au niveau des souches de *B. subtilis* (B3, B122 et B222) et de bactéries lactiques (L87, L154 et L169).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abriouel H., Franz C.M.A.P., Omar N.B. and Gálvez A. (2010).** Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS), Microbiology Reviews*, 35: 201–232.
- Achinewhu S.C. (1986).** Some biochemical and nutritional changes during the fermentation of fluted pumpkin (*Telferia occidentialis*). *Qualitas Plantarum: Plant Foods for Human Nutrition*, 36: 97–106.
- Addy E.O.H., Salami L.I., Igboeli L.C. and Remawa H.S. (1995).** Effect of processing on nutrient composition and anti-nutritive substances of african locust bean (*Parkia filicoidea*) and baobab seed (*Adansonia digitata*), *Plant Food Human Nutrition*, 48: 113-117.
- Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I. and Isobe M. (1994).** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters*, 121: 31-34.
- Allangheny N.O., Banu Z.A., Campbell-Platt G. and Owens J.D. (1996).** Control of ammonia formation during *Bacillus* fermentation of legumes. *International Journal of food Microbiology*, 20: 321-333.
- Allgaier H., Jung G., Werner R. G., Schneider U. and Zahner H. (1986).** Epidermin sequencing of a heterodet tetracyclic 21- peptide amide antibiotic. *European Journal of Biochemistry*, 160: 9-22.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J.H., Zhang, Z., Miller W. and Lipman D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- Arnold T.H., Wells M.J. and Wehmeyer A.S. (1985).** Khoisan food plants: taxa with potential for future economic exploitation. In: *Plants for Arid Lands*, Wickens, G.E.; Goodin, J.R.; Field, D.V. (eds.), Allen and Unwin, London, UK, 69-86.
- Avonts L. and De Vuyst L. (2001).** Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 66: 543-50.
- Azokpota P., Hounhouigan D.J. and Nago M.C. (2006).** Microbiological and chemical changes during the fermentation of African locust bean *Parkia biglobosa*, to

produce *afitin*, *iru* and *sonru*, three traditional condiments produced in Benin, *International Journal of Food Microbiology*, 107: 304–309.

- Banerjee S. and Hansen J.N. (1988).** Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 9508–9514.
- Becker B. (1983).** The contribution of wild plants to human nutrition in the Ferlo (Northern Senegal). *Agroforestry Systems*, 1: 257-267.
- Bertani L. (1951).** Studies on lysogenesis. I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62: 293-300.
- Bhakta J.N., Ohnishi K., Munekage Y. and Iwasaki K. (2010).** Isolation and probiotic characterization of arsenic-resistant lactic acid bacteria for uptaking arsenic. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 71: 470-477.
- Bierbaum G., Brötz H., Koller K.P. and Sahl H.G. (1995).** Cloning, sequencing and production of the lantibiotic mersacidin. *FEMS Microbiology Letters*, 127: 121–126.
- Bizani D., Dominguez A.P.M. and Brandelli A. (2005).** Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 269–273.
- Bizani D. and Brandelli A. (2002).** Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus sp.* strain 8A. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 512–519.
- Bourgeois C.M. and Larpent J.P. (1996).** *Microbiologie Alimentaire, Tome 2 : Les aliments fermentés et fermentations alimentaires*, 2^{ème} éd., Lavoisier Tec & Doc., Paris, 523 p.
- Buchaman R.E. and Gibsons N.E. (1975).** Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., The Williams and Wilkins company, Baltimore, 529-576.
- Byaruhanga Y.B., Bester B.H. and Watson T.G. (1999).** Growth and survival of *Bacillus cereus* in *mageu*, a sour maize beverage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15: 329–333.
- Camire A.L. and Clydesdale F.M. (1981).** Effect of pH and heat treatment on the binding of calcium, magnesium, zinc and iron to wheat bran and fractions of dietary fiber. *Journal of Food Science*, 46: 548.

- Campbell-Platt G. (1994).** Fermented foods: a world perspective. *Food Research International*, 27: 253-257.
- Chadare F.J., Gayet D.P., Azokpota P., Nout M.J.R., Linnemann A.R., Hounhouigan J.D. and van Boekel M.A.J.S. (2010).** Three traditional fermented baobab foods from Benin, Mutchayan, Dikouanyouri and Tayohounta: preparation, properties and consumption. *Ecology of Food and Nutrition*, 49: 1-19.
- Chadare F.J., Linnemann A.R., Hounhouigan J.D., Nout M.J.R. and Van Boekel M.A.J.S. (2009).** Baobab Food Products: A Review on their Composition and Nutritional Value. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 49: 254-274.
- Chan W.C., Bycroft B.W., Leyland M.L., Lian L.Y. and Roberts G.C.K. (1993).** A novel post-translational modification of the peptide antibiotic subtilin: isolation and characterization of a natural variant from *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 6633. *Biochemical Journal*, 291: 23-27.
- Chateau N., Deschamps A.M. and Sassi A.H. (1994).** Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 42–44.
- Chehimi S., Delalande F., Sable S., Hajlaoui M.R., Van Dorselaer A., Limam F. and Pons A.M. (2007).** Purification and partial aminoacid sequence of thuricin S, a new anti-Listeria bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Canada Journal of Microbiology*, 53: 284–90.
- Chen Y., Ludescher R. D. and Montville T. J. (1997).** Electrostatic interactions but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4770-4777.
- Chung S., Kong H., Buyer J.S., Lakshman D.K., Lydon J., Kim S.D. and Roberts D.P. (2008).** Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80:115-123.
- Cladera-Olivera F., Caron G.R. and Brandelli A. (2004).** Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 251-256.
- Claus D. and Berkeley R.C.W. (1986).** Genus *Bacillus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. *Current Drug Targets*, 3: 107-122.

- Compaoré S.C. (2009).** *Suivi de la production et étude des caractéristiques biochimiques et microbiologiques du maari: un condiment fermenté à base de graines de baobab (Adansonia digitata).* Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, 60 p.
- Coulibaly B. (1993).** *Politique Forestière Cynégétique Halieutique du Burkina Faso.* Projet TCP/BKF/2357, Appui à la Préparation de la Réunion Sectorielle sur l'Environnement, FAO, Rome, 22 p.
- Coulidiati L.D. (2011).** Sécurité alimentaire au Burkina Faso. Rome, 32 p.
- Dakwa S., Sakyi-Dawson E., Diako C., Annan N.T. and Amoa-Awua W.K. (2005).** Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into *dawadawa* soy-dawadawa, *International Journal of Food Microbiology*, 104: 69–82.
- De Caluwé E., Halamová K. and Van Damme P. (2010).** *Adansonia digitata* L. – A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Afrika focus*, 23: 11-51.
- De Castro A., Montano A., Casado F.J., Sanchez A.H. and Rejano L. (2002).** Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, 19: 637–644.
- De Man J.C., Rogosa M. and Sharpe M.E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
- De Vuyst L. and Vandamme E.J. (1993).** Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications* (De Vuyst, L and Vandamme, E. J., Eds), London: Chapman et Hall, 151-221.
- Delves-Broughton I. (1990).** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44: 100 p.
- Desmazeaud M.J. (1996).** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. Alimentation et santé-1, *Cahiers Agricultures*, 5:331-43.
- Diawara B., Sawadogo L., Amoa-Amwa W.K.A. and Jakobsen M. (1998).** HACCP system for traditional African fermented foods: Soubala. Taastrup: ISBN 87-90737-00-8 WAITRO, Danish Technological Institute, 77p.
- Diawara B., Sawadogo L. and Kabore I.Z. (1992).** Contribution à l'étude des procédés traditionnels de fabrications de *soumbalaa* Burkina Faso. Aspects

biochimiques, microbiologiques et technologiques, *Science and Technology*, 20: 5–14.

- Dike E.N. and Odunfa S.A. (2003).** Microbiological and biochemical evaluation of a fermented soyabean product: *Soyadawadawa*, *Journal of Food Science and Technology*, 40: 606–610.
- Diop A.G., Sakho M., Dornier M., Cissé M. and Reynes M. (2005).** Le baobab africain (*Adansonia digitata* L.): principales caractéristiques et utilisations. *Fruits*, 61: 55-69.
- Dirar H.A. (1993).** The indigenous fermented foods of Sudan. A study in African food and nutrition. Wallingford: CAB International, 552 p.
- Doi R.H. (1989).** Sporulation and germination in *Bacillus*. ed. Harwood C.R., London: Plenum Press, 255-291.
- Dortu C. and Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13 :143-154.
- Drouault S. and Corthier G. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32:101–117.
- Ekpenyong T.E. and Borchert S.R.L. (1980).** Effect of cooking on the chemical composition of winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus*). *Journal of Food Science*, 45: 1559-1566.
- Erkkilä S. and Petäjä E. (2000).** Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 297-300.
- FAO (1988).** Traditional food plants. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 24: 63–67.
- Fardiaz D. and Markakis P. (1981).** Degradation of phytic acid in oncom (fermented peanut press cake). *Journal of Food Science*, 46: 523–525.
- Galverz A., Abriouel H., Lopez R.L. and Omar N.B. (2007).** Bacteriocin- based strategies for food bioservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120:51-70.
- Gilliland S.E., Staley T.E. and Bush L.J. (1984).** Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67:3045-3051.

- Giraffa G. (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88:215-222.
- Glew R.H., VanderJagt D.J., Lockett C., Grivetti L.E., Smith G.C., Pastuszyn A. and Millson M. (1997).** Amino acid, fatty acid and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10: 205-217.
- Godon B. (1996).** Protéines végétales. Lavoisier Tec & Doc., Paris, 666p.
- Goldin B.R., Gorbach S.L., Saxelin M., Barakat S., Gualtieri L. and Salminen S. (1992).** Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Science*, 37: 121-128.
- Gray E.J., Lee K.D., Souleimanov A.M., Di Falco M.R., Zhou X., Ly A., Charles T.C., Driscoll B.T. and Smith D.L. (2006).** A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 545–554.
- Green D.H., Wakeley P.R., Page A., Barnes A., Baccigalupi L., Ricca E. and Cutting S.M. (1999).** Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4288-4291.
- Hansen B.M. and Hendriksen N.B. (2001).** Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:185-189.
- Harlander S. K. (1993).** Regulatory aspects of bacteriocin use. In: Hoover, D.G. and Steenson, L. R., Editors. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Academic Press, New York, 233-236.
- Harwood C.R. (1989).** *Bacillus*. London: Plenum Press, 406 p.
- He L., Chen W. and Liu Y. (2006).** Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research*, 161:321-326.
- Holzappel W. (1997).** Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*, 8:241-258.
- Hounhouigan D.J., Nout M.J.R., Nago C.M., Houben H.J. and Rombouts M.F. (1993).** Composition and microbiological and physical attributes of *Mawè*, a fermented maize dough for *kenkey* production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology*, 19: 135-143.

- Hyronimus B., Le Marrec C. and Urdaci M.C. (1998).** Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *Journal of Applied Microbiology*, 85:42–50.
- Ibrahim M.H. and Antai S.P. (1986).** Chemical changes during the fermentation of African locust bean (*Parkia filicoidea* Welw) seeds for production of Daddawa. *Qualitas plantarum, Plant Foods for Human Nutrition*, 36:179-184.
- Igboeli L.C., Addy E.O.H. and Salami L.I. (1997).** Effects of some processing techniques on the antinutrient contents of baobab seeds (*Adansonia digitata*). *Bioresource Technology*, 59:29-31.
- International Organization for Standardization ISO 15214 (1998).** Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria-Colony count technique at 30°C, iso@iso.ch, 7p.
- Jack T. and Ray B. (1995).** Bacteriocins of Gram-Positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59:171-200.
- Jakobsen C.N., Nielsen V.R., Hayford A.E., Møller P.L., Michaelsen K.F., Pærregaard A., Sandstro B., Tvede M. and Jakobsen M. (1999).** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4949–4956.
- Jay J. (1996).** Modern Food Microbiology, 5th edn. London: Chapman and Hall, 661 p.
- Jideani I.A.O. and Okeke C.R. (1991).** Comparative-study of microorganisms and sensory attributes of condiments from the fermentation of different seeds, *Plant Foods for Human Nutrition*, 41: 27–34.
- Kaboré D., Thorsen L., Nielsen D.S., Berner T.S., Sawadogo-Lingani H., Diawara B., Dicko M. and Jakobsen M. (2012).** Bacteriocin formation by dominant aerobic sporeformers isolated from traditional *maari*. *International Journal of Food Microbiology*, 154:10-18.
- Kaboré D., Sawadogo-Lingani H., Dicko M.H., Diawara B. and Jakobsen M. (2011).** A review of baobab food products. *African Journal of Food Science*, 5(16): 833-844.
- Kamoun F., Mejdoub H., Aouissaoui H., Reinbolt J., Hammami A. and Jaoua S. (2005).** Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98:881–888.

- Kazanas N. and Fields M.L. (1981).** Nutritional improvement of sorghum by fermentation. *Journal of Food Science*, 49:819–821.
- Kiss A., Balikó G., Csorba A., Chuluunbaatar T., Medzihradszky K.F. and Alföldi L. (2008).** Cloning and characterization of the DNA region responsible for megacin A-216 production in *Bacillus megaterium* 216. *Journal of Bacteriology*, 190: 6448-6457.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Logan-Buck B. and Azcarate-Peril M.A. (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, 29:393-409.
- Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, 12:39–86.
- Klaenhammer T.R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70:337-349.
- Klayraung S., Viernstein H., Sirithunyalug J. and Okonogi S. (2008).** Probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from Thai traditional food. *Science and Pharmacology*, 76:485–503.
- Klingberg T.D., Axelsson L., Naterstad K., Elsser D. and Budde B.B. (2005).** Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105:419-431.
- Kuboi R., Maruki T., Tanaka H. and Komasaawa I. (1994).** Fermentation of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and production of subtilin in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78:431-436.
- Kučerová K., Korbová I., Horacková S., Šviráková S. and Plocková M. (2009).** Influence of *Enterococci* and *Lactobacilli* on *Listeria*. *Czech Journal of Food Sciences*, 27: S2-12–S2-17.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton I.F., Cummings N.J., Daniel R.A., Denizot F., Devine K.M., Düsterhöft A., Ehrlich S.D., Emmerson P.T., Entian K.D., Errington J., Fabret C., Ferrari**

E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S.Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E.J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B.J., Haga K., Haiech J., Harwood C.R., Hénaut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M.F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S.M., Levine A., Liu H., Masuda S., Mauël C., Médigue C., Medina N., Mellado R.P., Mizuno M., Moestl D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'Reilly M., Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S.H., Parro V., Pohl T.M., Portetelle D., Porwollik S., Prescott A.M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S.J., Serror P., Shin B.S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H., Takemaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Tognoni A., Tosato V., Uchiyama S., Vandenbol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler E., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H.F., Zumstein E., Yoshikawa H. and Danchin A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390:249–256.

Lamien N. and Traore S. (2002). Commercialisation des produits non ligneux des arbres de la zone semi-aride du Burkina Faso : cas des feuilles sèches de baobab (*Adansonia digitata*).

Laokole J. (1994). Contribution à l'étude biochimique et microbiologique du soumbala. Mémoire de D.E.A en microbiologie appliquée, FAST, Université de Ouagadougou, 77 p.

Lee H., Churey J.J. and Worobo R.W. (2009). Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 299: 205–213.

- Leroy F., Foulquie-Moreno M.R. and De Vuyst L. (2003).** *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 235–240.
- Liu W. and Hansen J.N. (1993).** The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:648-651.
- Lopez P., Sala F. and De La Fuente J. (1994).** Inactivation of proxidase, lipoxygenase and polyphenol oxydase by manothermosoniction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 252-256.
- Lund T., De Buyser M.L. and Granum P.E. (2000).** A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, 38:254-61.
- Mannanov R.N. and Sattarova R.K. (2001).** Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. *Chemistry of natural compounds*, 37:117-123.
- Marx R., Stein T., Entian K-D. and Glaser S.J. (2001).** Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by ¹H-NMR and matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry*, 20:501-506.
- Ministère de l'Economie et des Finances (MEF) (2011).** Guide d'intégration de l'environnement et des liens Pauvreté-Environnement lors de l'élaboration des politiques sectorielles au Burkina Faso, 47 p.
- Merino L.A., Hrenuk G.E., Alonso J.M. and Ronconi M.C. (2000).** Interêt de l'antibiotypieet la bactériocinotypie pour différencier les souches de Shigella isolées en Argentine. Manuscrit n° 2166 «Bactériologie».
- Motta A.S. and Brandelli A. (2008).** Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* spp. strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:641–646.
- Motta A.S and Brandelli A. (2002).** Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92:63–71.
- Moreno M.R.F., Rea M.C., Cogam T.M. and de Vuyst L. (2002).** Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 81:73-84.

- Murray S.S., Schoeninger M.J., Bunn H.T., Pickering T.R. and Marlett J.A. (2001).** Nutritional composition of some wild plant foods and honey used by Hadza foragers of Tanzania. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14: 3-13.
- Nakano M.M., Zheng G. and Zuber P. (2000).** Dual control of *Sbo-alb* operon expression by the Spo0 and ResDE systems of signal transduction under anaerobic conditions in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 182:3274–3277.
- Nascimento M.S., Moreno I. and Kuaye A.Y. (2010).** Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* fair-e 198 against Gram-positive pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:74-81.
- Ndir B., Gningue R.D., Keita N.G., Souane M., Laurent L., Cornelius C. and Thonart P. (1997).** Microbiological and organoleptic characteristics of commercial *netetu*. *Cahiers d'étude et de recherche francophones / Agricultures*, 6: 299–304.
- Ndir B., Hbid C., Cornelius C., Roblain D., Jacques P., Vanhentenryck F., Diop M. and Thonart P. (1994).** Propriétés antifongiques de la microflore sporulée du *netétu*. *Cahiers Agricultures*, 3: 23–30.
- Nkafamiya I.I., Osemeahon S.A., Dahiru D. and Umaru H.A. (2007).** Studies on the chemical composition and physicochemical properties of the seeds of baobab (*Adansonia digitata*). *African Journal of Biotechnology*, 6:756–759.
- Nnam N.M. and Obiakor P.N. (2003).** Effect of fermentation on the nutrient and antinutrient composition of baobab (*Adansonia digitata*) seeds and rice (*Oryza sativa*) grains. *Ecology of Food and Nutrition*, 42: 265-277.
- Nordeide M.B., Harløy A., Følling M., Lied E. and Oshaug A. (1996).** Nutrient composition and nutritional importance of green leaves and wild food resources in an agricultural district, Koutiala, in Southern Mali. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47: 455-468.
- Nour A.A., Magboul B.I. and Kheiri N.H. (1980).** Chemical composition of baobab fruit (*Adansonia digitata* L.). *Tropical Science*, 22: 383-388.
- Nout M.J.R., Beernink G. and Bonantsvanlaarhoven T.M.G. (1987).** Growth of *Bacillus cereus* in soyabean tempeh. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 293– 301.

- Obizoba I.C. and Atti J.V. (1991).** Effect of soaking, sprouting, fermentation and cooking on nutrient composition and some antinutritional factors of sorghum (guinea) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 41: 203–212.
- Obizoba I.C. and Amaechi N.A. (1993).** The effect of processing methods on the chemical composition of baobab (*Adansonia digitata* L.) pulp and seed. *Ecology of Food and Nutrition*, 29: 199-205.
- Odunfa S.A. (1985).** Biochemical changes during “iru” fermentation. *Journal of Food Technology*, 20:295-303.
- Odunfa S.A. (1983).** Biochemical changes during production of “ogiri”, a fermented melon (*Citrus vulgaris* Schard) product. *Qualitas Plantarum: Plant Foods for Human Nutrition*, 32:45–52.
- Odunfa S.A. and Oyewole O.B. (1998).** African fermented foods. In *Microbiology of Fermented Foods* ed. Wood, London B.J.B., 713-752.
- Odunfa.S.A. and Oyewole O.B. (1986).** Identification of *Bacillus* species from *iru*, a fermented African locust bean product. *Journal of Basic Microbiology*, 26:101–108.
- Odunfa S.A. and Adewuyi E.Y. (1985).** Optimization of process conditions for the fermentation of African Locust bean (*Parkia biglobosa*): effect of time, temperature and humidity. *Food Chemistry Microbiology Technology*, 9: 6–10.
- Oguntoyinbo F.A., Sanni A.I., Franz C.M.A.P. and Holzapfel W.H. (2007).** In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of *okpehe*, a traditional African fermented condiment. *International Journal of Food Microbiology*, 113:208–218.
- Oscariz J.C. and Pisabarro A.G. (2000).** Characterisation and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 1–10.
- Oscariz J.C., Cintas L., Holo H., Lasa I., Nes I.F. and Pisabarro A.G. (2006).** Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 254:108–115.
- Osman M.A. (2004).** Chemical and nutrient analysis of baobab (*Adansonia digitata*) fruit and seed protein solubility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59: 29-33.

- Osmanagaoglu Ö., Gündüz U., Beyatli Y. and Çökmüs C. (1998).** Purification and characterization of pediocin F, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. *Turkish Journal of Biology*, 22: 217-228.
- O'Toole D.K. (1999).** Characteristics and use of Okara, the soybean residue from soy milk production: a Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 363-371.
- Ouoba L.I.I., Diawara B., Jespersen L. and Jakobsen M. (2007).** Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for *soumbala* production. *Journal of Applied Microbiology*, 102:963-970.
- Ouoba L.I.I., Diawara B., Amoa-Awua W.K., Traore A.S. and Moller P.L. (2004).** Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean *Parkia biglobosa*, to produce *soumbala*. *International Journal of Food Microbiology*, 90:197–205.
- Ouoba L.I.I. (2003).** Caractérisation génotypique, biochimique et activité antimicrobienne de *Bacillus* spp. en vue de la mise au point de starters pour la production contrôlée du *Soumbala*. Memoire de doctorat, UFR-SVT, Université de Ouagadougou, 124 p.
- Padonou W.S., Nielsen D.S., Hounhouigan J.D., Thorsen L., Nago M.C. and Jakobsen M. (2009).** The microbiota of *Lafun*, an African traditional cassava food product. *International Journal of Food Microbiology*, 133: 22-30.
- Paik S.H., Chakicherla A. and Hansen J.N. (1998).** Identification and characterization of structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, Sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, 273:134–23 142.
- Paik H.D., Bae S.S., Park S.H. and Pan J.G. (1997).** Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19:294-298.
- Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. and Kotzekidou P. (2003).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65:859–867.

- Parkouda C., Thorsen L., Compaoré C.S., Nielsen D.S., Tano-Debrah K., Jensen J.S., Diawara B. and Jakobsen M. (2010).** Microorganisms associated with *maari*, a baobab seed fermented product. *International Journal of Food Microbiology*, 142:292–301.
- Parkouda C., Nielsen D.S., Azokpota P., Ouoba L.I.I., Amoa-Awua W.K., Thorsen L., Hounhouigan J.D., Jensen J.S., Tano-Debrah K., Diawara B. and Jakobsen M. (2009).** The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Critical Reviews in Microbiology*, 35:139–156.
- Parkouda C., Diawara B. and Ouoba L.I.I. (2008).** Technology and physico-chemical characteristics of *bikalga*, an alkaline fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*. *African Journal of Biotechnology*, 7: 916–922.
- Parente E. and Ricciardi A. (1999).** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52:628-638.
- Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B., Chirife J. and Boquet R. (1982).** Effect of heat treatment on sorption isotherms and solubility of flour and protein isolated from bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*, 47:1288-1296.
- Pitt T.L. and Gaston A.M. (1995).** Bacteriocin typing. Methods in molecular biology. Edited by Haward J. and Whitecombe D.M. Edition: Human press. Inc. Totowa, New Jersey, 46:5-14.
- Rayman M.K., Aris B. and Hurst A. (1981).** Nisin: a possible alternative of adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 41:375-380.
- Riley M.A. and Wertz J.E. (2002).** Bacteriocin diversity: ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7: 129-133.
- Rozen S. and Skaletsky H. (2000).** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132:365-386.
- Røsland E., Langsrud T. and Sørhaug T. (2005).** Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 103:69–77.
- Røsland E., Borge G.I.A., Langsrud T. and Sørhaug T. (2003).** Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 89:205– 212.

- Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R.P. and Hill C. (1998).** Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2287-2290.
- Saka J.D.K. and Msonthi J.D. (1994).** Nutritional value of edible fruits of indigenous wild trees in Malawi. *Forest Ecology and Management*, 64: 245-248.
- Sander M.E., Morelli L. and Tompkin S. (2003).** Spore formers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:101-110.
- Sanni A.I. (1993).** The needs of optimization of African fermented foods and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 18: 85-95.
- Sarkar P.K., Hasenack B. and Nout M.J.R. (2002).** Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans Indian *kinema* and African locust beans *soumbala*, *International Journal of Food Microbiology*, 77: 175–186.
- Sawadogo-Lingani H., Diawara B., Traoré A.S. and Jakobsen M. (2008).** Technological properties of *Lactobacillus fermentum* involved in the processing of dolo and pito, West African sorghum beers, for the selection of starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 104:873-882.
- Sena L.P., VanderJagt D.J., Rivera C., Tin A.C., Muhamadu I., Mahamadou O., Millton M., Pastuszyn A. and Glew R.H. (1998).** Analysis of nutritional components of eight famine foods of the Republic of Niger. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52: 17-30.
- Sibibe M. and Williams J.T. (2002).** Baobab – *Adansonia digitata*. Fruits for the future. International Centre for Underutilized Crops, Southampton, UK, 96 p.
- Stanley D.W and Aguilera J.M. (1985).** A review of textural defects in cooked reconstituted legumes. The influences of structure and composition. *Journal of Food Biochemistry*, 9: 277.
- Stenfors L.P. and Granum P.E. (2001).** Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 197:223-228.
- Stein T. (2008).** Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22:1146-1152.

- Stein T., Düsterhus S., Stroh A. and Entian K.D. (2004).** Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-alb* cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2349–2353.
- Stein T., Borchert S., Conrad B., Feesche J., Hofemeister B., Hofemeister J. and Entian K.D. (2002).** Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A 1/3. *Journal of Bacteriology*, 184:1703-1711.
- Sukumar G. and Ghosh A.R. (2010).** *Pediococcus* spp. – A potential probiotic isolated from *Khadi* (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *African Journal of Food Science*, 4:597 – 602.
- Sutyak K.E., Wirawan R.E., Aroutcheva A.A. and Chikindas M.L. (2008).** Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 104:1067–1074.
- Tabbene O. and Slimene I.B. (2009).** Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus Subtilis* B38. *Biotechnology Progress*, 25: 1267-1274.
- Taïta P., Bognounou O. and Guinko S. (2005).** Plantes alimentaires forestières de la réserve de la biosphère de la mares aux hippopotames, Burkina Faso. In : Boussim J.I., Lykke A.M., Nombré I., Nielsen I. and Guinko S. (eds) : Homme, plantes et environnement au Sahel occidental. SEREIN. Occasional paper n° 19, Copenhagen Danmark, 53-67.
- Thorsen L., Abdelgadir W.S., Rønsbo M.H., Abban S., Hamad S.H., Nielsen D.S. and Jakobsen M. (2011).** Identification and safety evaluation of *Bacillus* species occurring in high numbers during spontaneous fermentations to produce Gergoush, a traditional Sudanese bread snack. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 244–252.
- Thorsen L., Azokpota P., Hansen B.M., Hounhouigan D.J. and Jakobsen M. (2010).** Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology*, 142:247-250.
- Turnbull P.C., Kramer J.M., Jorgensen K., Gilbert R.J. and Melling J. (1979).** Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and

necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32:219-228.

- Xie J., Zhang R., Shang C. and Guo Y. (2009).** Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 8:5611-5619.
- Uwaegbute A.C. (1996).** African locust bean (*Parkia filicoidea* Welw). In Food and feed from legumes and oilseeds. eds. Nwokolw N and Smartt J., 124-129. London: Chapman and Hall.
- Vertuani S., Braccioli E., Buzzoni V. and Manfredini S. (2002).** Antioxidant capacity of *Adansonia digitata* fruit pulp and leaves. *Acta Phytotherapeutica*, 86:2-7.
- Visser L.G., Hiemstra P.S., Van den Barselaar M.T., Ballieux P.A. and van Furth R. (1996).** Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infection and Immunity*, 64:1653-1658.
- Von Tersch M. and Carlton B. (1983).** Bacteriocin from *Bacillus megaterium* ATCC 19213: Comparative studies with megacin A-216. *Journal of Bacteriology*, 155:866-871.
- Wong H.C. and Chen Y.L., (1988).** Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54:2179– 2184.
- Yuksekdag Z.N. and Aslim B. (2010).** Assessment of potential probiotic and starter properties of *Pediococcus spp.* isolated from Turkish-Type fermented sausages (Sucuk). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:161-168.
- Zheng G.L., Yan L.Z., Vederas J.C. and Zuber P. (1999).** Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *Journal of Bacteriology*, 181:7346-7355.

ANNEXES: PUBLICATIONS

Liste des publications issues de la thèse

- Article 1.** Kaboré D., Thorsen L., Nielsen D.S., Berner T.S., Sawadogo-Lingani H., Diawara B., Dicko M. and Jakobsen M., 2012. Bacteriocin formation by dominant aerobic sporeformers isolated from traditional *maari*. *International Journal of Food Microbiology*, 154:10–18.
- Article 2.** Kaboré D., Sawadogo-Lingani H., Dicko M.H., Diawara B. and Jakobsen M., 2012. Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant LAB isolated from traditional *maari*, baobab seeds fermented condiment. *African Journal of Biotechnology*, 11(5): 1197-1206.
- Article 3.** Kaboré D., Sawadogo-Lingani H., Dicko M.H., Diawara B. and Jakobsen M., 2011. A review of baobab food products. *African Journal of Food Science*, 5(16): 833-844.
- Article 4.** Kaboré D., Nielsen D.S., Sawadogo-Lingani H., Diawara B., Dicko M.H., Jakobsen M. and Thorsen L., 2012. Influence of growth substrate on bacteriocin production by three *Bacillus subtilis* strains isolated from *maari*, a baobab seeds fermented condiment. Submitted: *International Journal of Food Microbiology*.