

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par le
**Centre International d'Études Supérieures
en Sciences Agronomiques
Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **Sciences des Procédés -
Sciences des Aliments**
Et de l'Unité Mixte de Recherche Qualisud

Spécialité : **Biotechnologie, Microbiologie**

Présentée par Yasmine HAMDUCHE

Discrimination des procédés de transformation post-récolte du Cacao et
du Café par analyse globale de l'écologie microbienne

Soutenue le 22 Septembre 2015
devant le jury composé de :

M. Didier MONTET,	Dr, Cirad, Montpellier	Directeur de thèse
M. Jean-Christophe MEILE,	Dr, Cirad, Montpellier	Encadrant
M. Rémy CACHON,	Pr, AgroSup, Univ. de Bourgogne, Dijon	Président et Rapporteur
M. Pascal BONNARME,	Dr, AgroParisTech INRA, Grignon	Rapporteur
Mme. Corinne TEYSSIER,	Dr, Cirad, Univ. de Montpellier	Examineur
M. Sévastianos ROUSSOS,	Dr, IRD, Univ. d'Aix Marseille.	Examineur

Remerciements

Je désire remercier grandement tous ceux qui m'ont, de près ou de loin, aidé à réaliser ce travail:

Je voudrais tout d'abord remercier la société HUBBARD en particulier M. Jean François HAMON pour le financement accordé durant ces trois ans de thèse. Je voudrais également remercier l'UMR Qualisud au CIRAD de Montpellier pour m'avoir reçu dans ses laboratoires. Je remercie vivement mon directeur de thèse, Dr Didier MONTET, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise, sa sympathie et son efficacité certaine que je n'oublierai jamais. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon encadrant de thèse, Dr Jean Christophe MEILE pour son attention sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Sa confiance a été un élément moteur pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui.

Un grand merci à Mme Corinne TEYSSIER, maître de conférence à l'Université de Montpellier de n'avoir jamais cessé de m'apporter son soutien moral. Je la remercie également d'avoir contribué grandement à la réalisation de ce travail et d'avoir accepté d'être examinatrice. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail.

Je suis très honorée de la présence de mon jury de thèse et je tiens à remercier :

M. Rémy CACHON, Professeur à Université de Bourgogne à Dijon pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse en tant que président et rapporteur. Je lui exprime ma profonde gratitude.

M. Pascal BONNARME, directeur de recherche à INRA à Grignon pour sa participation en qualité de rapporteur de mon travail, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, pour ces remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je lui en suis très reconnaissante.

M. Sevastianos ROUSSOS, Directeur de Recherche à l'IRD à Marseille de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je lui exprime ma profonde gratitude.

J'associe à ces remerciements M. Marc LEBRUN, M. Renaud BOULANGER et M. Noël DURAND pour leur implication dans mes travaux et leur sympathie. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux.

J'adresse de sincères remerciements à Mme Marie-Pierre OBEDE pour sa sympathie, la relecture et la mise en forme de ce mémoire.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Mme Isabelle PIRO-METAYER et M. Laurent BERTHIOT pour leur bonne humeur et leur aide indispensable.

Je voudrais remercier à Mesdames Nathalie PAILLUSSON et Chantal CANALES pour leur aide et leur disponibilité.

A titre plus personnel, Je remercie chaleureusement mon amie Adiara, pour l'encouragement et l'aide précieuse. Je tiens à la remercier surtout pour son soutien moral ininterrompu.

Je tiens à remercier Amine BELBAHI et Gabrielle DEUNEUX pour leurs coups de main indispensables et sans oublier tous mes amis de Montpellier Ali, Thiziri, Magali, Adeline.

Je tiens à remercier du fond du cœur Céline avec qui j'ai partagé le même bureau pendant ces trois années de thèse. Merci pour les moments inoubliables qu'on a passé ensemble !

Je tiens à remercier Mme Catherine BRABET, Mme Angélique FONTANA, Mme Pascaline ALTER, Mme Nelly FORESTIER-CHIRON, M. Eric TARDAN, M Gille Morel.....et tous ceux que j'oublie.

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien au cours de ces trois années et sans lesquels je n'en serai pas là aujourd'hui.

A mes chers parents

A mes frères

A El-Hadj El-Rabi

A toute la famille HAMDOUCHE

Liste des abréviations

AAB Bactéries acétiques
AC Café coque Arabica
ACC Analyse Canonique des Correspondances
ACP Analyse en Composantes Principales
ADN Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal
ADNr 26S ADN codant pour la sous unité 26S de l'ARN ribosomal
ADNr 28S ADN codant pour la sous unité 28S de l'ARN ribosomal
ADNr Acide désoxyribonucléique ribosomique
ANOVA Analyse de la variance
ANV Café vert Arabica obtenu par voie sèche
AP Café parche Arabica
APS Persulfate d'ammonium
ARDRA amplified ribosomal DNA restriction analysis
ARNr ARN ribosomal
AV Café vert Arabica obtenu par voie humide
Aw Activité de l'eau
B1, B2 et B3 fermes à Bafoussam
CAH Classification Ascendante Hiérarchique
CIRAD Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement
D1, D2 et D3 fermes à Dschang
DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DO Densité Optique
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid
ESB Encéphalopathie spongiforme bovine
F1, F2 et F3 fermes à Bafia
GPC Chromatographie en phase gazeuse
HPLC Chromatographie Liquide Haute Performance
ICO International coffee organization
ICCO International cocoa organization
IK Indice de Kovats
ITS Internal transcribed spacer

LAB Bactéries lactiques
M Molarité
MATAB Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide
MS Spectrométrie de masse
MS% Pourcentage en matière sèche
NCBI National Center for Biotechnology Information
NIRS Spectroscopie proche infrarouge
OCDE Atlas régional de l'Afrique de l'Ouest
OGM Organismes génétiquement modifiés
OTA Ochratoxine A
pb Paires de bases
PCR Polymerase Chain Reaction
pH Potentiel hydrogène
PSM Pulp Simulation Media
RADP randomly amplified polymorphic DNA
RC Café coque Robusta
RFLP restriction fragment length polymorphism
rpm Rotation par minute
RV Café vert Robusta obtenu par voie humide
SDS Sodium dodecyl sulphate
SPME Micro-extraction en phase solide
SSCP Single-Stranded Conformation Polymorphism
T1, T2 et T3 fermes à Batouri
TAE Tris/ Ammonium/ EDTA (tampon)
TE Tris/ EDTA (tampon)
TEMED N, N, N', N' Tétraméthyléthylènediamine
TGGE Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TRFLP terminal RFLP
UFC Unités formant colonies
UV Ultraviolet
VH Café vert obtenu par voie humide
VN Café vert obtenu par voie naturelle par Luwak
VS Café vert obtenu par voie sèche
VSH Café vert obtenu par voie semi-humide

Listes des figures

Première partie : Synthèse bibliographique

Figure 1 : Répartition géographique de la culture du café.

Figure 2 : Cerises du café.

Figure 3 : Représentation schématique des tissus présents dans le fruit de *Coffea sp.*

Figure 4 : Schéma montrant les différents types de traitements du café.

Figure 5 : Traitement du café par voie sèche.

Figure 6 : Lavage du café par voie humide.

Figure 7 : Fruit du cacaoyer ou cabosse

Figure 8 : Graines de cacao avec et sans pulpe.

Figure 9: Structure chimique de la théobromine (a) et de la caféine (b).

Figure 10 : Principaux pays producteurs de cacao.

Figure 11 : Écabossage du cacao.

Figure 12 : Fermentation en tas du cacao.

Figure 13 : Fermentation en caisse du cacao.

Figure 14 : Techniques de brassage au cours de la fermentation du cacao.

Figure 15 : Structure chimique de quelques composés d'arôme du cacao.

Figure 16 : Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse des échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires.

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

Figure 17 : Carte du Cameroun indiquant les régions de prélèvement.

Figure 18 : Étapes de traitement des cerises fraîches aux grains de café au Cameroun.

Figure 19 : Représentation des trois voies de traitement de café en Indonésie.

Figure 20 : Échantillonnage au cours du procédé post-récolte du cacao.

Figure 21 : Représentation schématique de l'ITS (ITS1 et ITS4) de l'unité répétée de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes. Les flèches représentent les sites de fixation des amorces.

Figure 22 : Calcul de la position relative (PR) de chaque bande par exploitation d'un gel DGGE.

Figure 23 : Photo des tubes contenant le milieu liquideensemencé.

Figure 24 : Photos des tubes contenant des fèvesensemencées.

Figure 25 : Les différentes étapes d'extraction des composés volatiles par SPME.

Troisième partie : Résultats et Discussions

I. Discrimination des procédés post-récolte du café par analyse de la structure des communautés microbiennes

Figure 26 : Schéma représentant les différentes questions de recherche avec les différents échantillons de café utilisés pour répondre à ces questions.

Figure 27 : Etapes des procédés de traitement de café, de la cerise fraîche au grain de café vert au Cameroun.

Figure 28 : Profils DGGE des ADN bactériens obtenus à partir des échantillons de cafés lors des deux voies de traitement (voie sèche et voie humide) dans deux régions au Cameroun, Bafoussam (a) et Dschang (b).

Figure 29 : Analyses en Composantes principales réalisées sur les profils d'ADNr 16S obtenus pour les cafés du Cameroun traités par deux voies de traitements.

Figure 30 : L'Analyse Canonique des Correspondances (ACC) des profils d'ADN Bactérien montrant l'effet des étapes du traitement du café.

Figure 31 : Profils DGGE des ADN fongiques obtenus à partir des échantillons du café au cours des deux voies de traitement dans deux régions au Cameroun, Bafoussam (a) et Dschang (b).

Figure 32 : Analyses en Composantes principales réalisées sur les profils d'ADN 26S obtenus des cafés du Cameroun traités par deux voies de traitements.

Figure 33 : Analyse Canonique des Correspondances (ACC) des profils d'ADN fongique montrant l'effet des étapes du traitement du café.

Figure 34 : Analyse Canonique des Correspondances (ACC) des profils d'ADN Bactérien. (a) et fongique (b) montrant l'effet des variétés du café.

Figure 35 : Profils DGGE des ADN bactériens (a), des levuriens (b) et des moisissures (c) extraits du café vert Robusta.

Figure 36 : Dendrogrammes par analyse Cluster des profils DGGE des ADN bactérien (a), fongique (26S ADNr) (b) et (28S ADNr) (c).

Figure 37 : Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) de l'ensemble des profils d'ADN bactérien (a) et fongique (b) obtenus à partir des cafés Camerounais.

Figure 38 : Profils DGGE de l'ADN des bactéries (a), des levures (ADNr 26S) (b) et des moisissures (c) extraits à partir des cafés Arabica récoltés en 2013 et 2014.

Figure 39 : Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur les profils DGGE d'ADNr 16S (a), d'ADNr 26S (b) et l'ADNr 28s obtenus sur les cafés récoltés sur deux années de récolte et traités par voie humide.

Figure 40 : Profils DGGE des ADN bactériens (a) et fongiques (ADNr 28S) (b) obtenus à partir des échantillons de café traités par trois méthodes différentes en Indonésie.

Figure 41 : Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) des profils DGGE d'ADN bactérien (a) et fongique (b) des cafés verts obtenus par les trois traitements en Indonésie.

Figure 42 : Analyse Canonique des Correspondances (ACC) réalisée sur l'ensemble des profils d'ADN bactérien et fongique à partir des cafés verts obtenus par les trois traitements en Indonésie.

Figure 43 : Gel DGGE représentant les profils d'ADN bactérien (a) et fongique (26S) (b) obtenus à partir du café vert Arabica traité au Cameroun et Indonésie.

Figure 44 : Analyse Hiérarchique Ascendante des profils d'ADN bactérien (a) et fongique (b) des cafés verts traités par différentes voies au Cameroun et Indonésie.

Figure 45 : Réponses aux questions de recherche posées.

II. Discrimination des traitements post-récolte du cacao par analyse de la structure des communautés microbiennes

Figure 46: Procédé de transformation du cacao, du cacaoyer au cacao marchand.

Figure 47 : Schéma représentant les différentes questions de recherche avec les échantillons du cacao utilisés pour répondre à ces questions.

Figure 48: Profils DGGE des ADNr 16S des bactéries (a) et 26S des levures (b) des fèves fermentées provenant des cabosses stockés 2 (D2), 4 (D4) et 8 (D8) jours.

Figure 49 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les profils DGGE des ADNr 16S des bactéries (a) et 26S des levures (b) des fèves fermentées à des différentes durées issues des cabosses stockées 2, 4 et 8 jours.

Figure 50 : Analyse canonique des correspondances réalisées sur les profils DGGE d'ADNr 16S des bactéries et 26S des levures des fèves fermentées à des différentes durées issues des cabosses stockées 2 jours, 4 jours et 8 jours.

Figure 51 : Profils DGGE des ADN bactériens (a) et levuriens (b) obtenus sur des fèves de cacao fermentées dans des caisses en bois (CB), dans des caisses en plastique (CP) et dans des feuilles de bananier (FB) à trois intervalles de temps (2, 4 et 6 jours).

Figure 52: Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) des profils d'ADN des bactéries (a) et des levures (b) obtenus à partir des fèves fermentées dans des caisses en bois (CB), caisses en plastique (CP) et feuilles de bananier (FB).

Figure 53: Profils DGGE de l'ADN des bactéries (a) et des levures (b) obtenus à trois intervalles de temps de fermentation (2, 4 et 6 jours).

Figure 54 : Fermentation avec et sans brassage.

Figure 55: Comparaison des profils DGGE d'ADN bactériens (a) et levuriens au cours de la fermentation des fèves de cacao avec et sans brassage.

Figure 56: Profils DGGE des ADN des bactéries extraits des fèves de cacao au cours de la fermentation (caisses en bois) et du séchage.

Figure 57: Profils DGGE des ADN des levures extraits des fèves de cacao au cours de la fermentation (dans caisses en bois) et du séchage.

Figure 58: Analyse en composantes principales réalisée sur l'ensemble des profils DGGE (bactéries et levures) (a) réalisés sur les fèves de cacao au cours du traitement post-récolte (fermentation dans des caisses en bois et séchage).

Figure 59: Classification Hiérarchique Ascendante appliquée sur les profils DGGE d'ADN microbien (bactérien et levurien) obtenus à partir des fèves de cacao fermentées et récoltées en mars (a) et novembre (2013).

Figure 60: Réponse aux questions de recherche posées.

III. Discrimination des traitements post-récolte du cacao par l'analyse des composés aromatiques du cacao

Figure 61 : Histogrammes montrant la somme de tous les alcools détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a) et 8 jours (b) avant écabossage.

Figure 62 : Histogrammes montrant la surface des pics des alcools détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a, c et e) et 8 jours (b, d et f) avant écabossage.

Figure 63 : Histogrammes montrant la surface des pics du 2-méthylbutanal et du benzaldéhyde détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a et c) et 8 jours (b et d) avant écabossage.

Figure 64 : Histogrammes montrant les surfaces des pics de l'acétoïne détectées sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a) et 8 jours (b) avant écabossage.

Figure 65 : Histogrammes représentant la du pic d'acétate d'éthyle et l'intensité de la bande de *H. opuntiae* détectés sur les fèves fermentées avec et sans brassage provenant du délai de stockage 8 jours avant écabossage (a et b). Profils DGGE d'ADNr 26S des levures au cours de la fermentation avec et sans brassage des fèves provenant des cabosses stockées 8 jours (c)

Figure 66 : Histogrammes représentant la surface des pics de l'acide acétique et l'intensité des deux bandes d'*A. pasteurianus* détectés sur les fèves fermentées avec et sans brassage provenant du délai d'écabossage de 2 jours (a, c et e) et 8 jours (b, d et f).

Figure 67 : Profils DGGE d'ADNr 16S des bactéries au cours de la fermentation avec et sans brassage des fèves provenant des cabosses stockées 8 jours.

Figure 68 : Graphes représentant l'évolution de la surface des pics de l'éthanol (a) et du 2-pentanol (b) selon la durée de fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage 2 jours et 8 jours.

Figure 69 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de 2-méthylbutanal (a) de 3-méthylbutanal (b) et de benzaldéhyde (c) selon la durée de fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

Figure 70 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de l'acétoïne au cours de la fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

Figure 71 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de l'acétate d'éthyle selon la durée de fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

Figure 72 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de l'acide acétique au cours de la fermentation sans brassage (a) et avec brassage (b) des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

Figure 73 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics d'isobutanal et du 2-méthylbutanal au cours de la fermentation sans brassage (a) et avec brassage (b) des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

Figure 74 : Histogrammes montrant la somme des surfaces des pics des cétones (a), des esters (b) et des acides (c) détectés sur les fèves de cacao fermentées avec brassage provenant des cabosses stockées 2 et 8 jours.

Figure 75 : Histogrammes montrant les surfaces des pics du 2-méthoxyphénol détecté sur les fèves de cacao des fermentées provenant des cabosses stocké 8 jours avant écabossage.

Figure 76 : Analyse en Composante principale réalisée sur les surfaces des pics des composés volatils détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 et 8 jours avant écabossage.

Figure 77 : Analyse des Correspondances Canoniques (ACC) réalisée sur les profils DGGE d'ADN des levures et bactéries et les composés volatils détectés sur les fèves de cacao.

Figure 78 : Analyse des Correspondances Canoniques (ACC) réalisée sur les composés volatils des flores de fermentation (AAB, LAB et levures).

Figure 79 : Graphes montrant l'évolution de la concentration des acides organiques selon la durée de fermentation réalisée sans (a) ou avec brassage (b) sur des fèves provenant des cabosses stockées 8 jours.

Figure 80 : Graphes montrant l'évolution de la concentration des acides organiques non volatils présents dans les fèves selon le procédé de fermentation (a) et la durée de stockage des cabosses avant écabossage (b).

IV. Etude du profil aromatique des souches microbiennes isolées du cacao

Figure 81 : Profils DGGE de l'ADN de bactéries détectées sur des fèves récoltées et fermentées en mars 2013 (a) et novembre de 2013 (b), de l'ADN de levures détectées sur des fèves récoltées et fermentées en mars 2013 (c) et novembre de 2013 (d) et de l'ADN des souches pures (e) de *L. fermentum* (----) de *A. pasteurianus* (----) de *P. kudriavzevii* (----) et de *P. manshurica* (--).

Figure 82 : *L. fermentum* (a) et *A. pasteurianus* (b) colorées au Gram et observées au microscope (grossissement $\times 1000$)

Figure 83 : Cellules de *P. manshurica* (a) et *P. kudriavzevii* (b) observées au microscope (grossissement $\times 400$, état frais).

Figure 84 : Croissance de *L. fermentum* durant la fermentation en monoculture du cacao.

Figure 85 : Surfaces des pics d'acides (a), d'alcools (b), des cétones (c) et d'esters (d) au cours de fermentation par la monoculture de *L. fermentum*.

Figure 86 : Croissance d'*A. pasteurianus* durant la fermentation du cacao en monoculture.

Figure 87 : Surfaces des pics d'alcools (a), d'acides (b), du benzaldéhyde (c), d'esters (d) de D-limonène (e) et de cétones (f) au cours de la fermentation en monoculture d'*A. pasteurianus*.

Figure 88 : Croissance de *P. kudriavzevii* durant la fermentation du cacao en monoculture.

Figure 89 : Surface des pics d'alcools (a), d'acides (b) d'acétone (c) et d'esters (d) au cours de la fermentation de monoculture de *P. kudriavzevii*.

Figure 90 : Croissance de *P. manshurica* durant la fermentation du cacao en monoculture.

Figure 91 : Surfaces des pics des alcools (a), des acides (b), de cétones (c), et esters (d) détectés au cours de la fermentation en monoculture de *P. manshurica*.

Figure 92 : Fermentation de co-culture de *L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica*.

Figure 93 : Surfaces des pics des alcools (a), des acides (b), des cétones (c), et esters (d) détectés au cours de la fermentation de co-culture de *L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica*.

Liste des tableaux

Première partie : Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Composition biochimique de la graine (en % de Matière Sèche).

Tableau 2 : Composition de la poudre de cacao en protéines et acides aminés

Tableau 3 : Quelques exemples de composés volatils clés (Afoakwa *et al.*, 2009; Belitz *et al.*, 2009)

Tableau 4 : Composés volatils avec leurs caractéristiques odorantes trouvés dans le cacao fermenté, torréfié et le chocolat.

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

Tableau 5 : Données géographiques et environnementales des zones d'échantillonnage du café au Cameroun (données du mois de mai correspondant au mois de la récolte)

Tableau 6 : Séquence des amorces universelles utilisées pour les bactéries

Tableau 7 : Séquence des amorces universelles utilisées pour les levures

Tableau 8 : Séquence des amorces universelles utilisées pour les moisissures

Tableau 9 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN bactériens avant DGGE

Tableau 10 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN levuriens avant DGGE

Tableau 11: Conditions des réactions de PCR pour les ADN de moisissures avant DGGE

Tableau 12 : Composition des solutions de préparation des gels de DGGE

Tableau 13: Composition des milieux simulant la pulpe de cacao PSM-LAB et PSM-AAB (Lefeber *et al.*, 2010).

Troisième partie : Résultats et Discussions

I. Discrimination des procédés post-récolte du café par analyse de la structure des communautés microbiennes

Tableau 14 : Identification des bandes d'ADN bactériens issus des profils DGGE par séquençage de l'ADNr 16S.

Tableau 15 : Identification des bandes d'ADN fongiques issus des profils DGGE par séquençage de l'ADN 26S.

Tableau 16 : Identification de quelques bandes d'ADN microbiens obtenu sur le café indonésien.

II. Discrimination des traitements post-récolte du cacao

Tableau 17 : Identification des bandes d'ADN bactérien par séquençage.

Tableau 18 : Identification des bandes d'ADN des levures par séquençage.

Tableau 19 : Identification des bandes d'ADN bactérien par séquençage de l'ADN 16S.

Tableau 20 : Espèces de levures identifiées par séquençage de l'ADN 26S.

III. Discrimination des traitements post-récolte du cacao par l'analyse des composés aromatiques du cacao

Tableau 21 : Les composés volatils identifiés des fèves de cacao.

IV. Etude du profil aromatique des souches microbiennes isolées du cacao

Tableau 22 : Identification des souches isolées du cacao de Côte d'Ivoire par amplification et séquençage des gènes des ARN ribosomaux.

Tableau 23 : Composés volatils produits lors de la croissance des souches dans le PSM-LAB et PSM-AAB.

Tableau 24 : Identification des composés volatils détectés sur les fèves non fermentées.

Tableau 25 : Identification des composés volatils détectés au cours de la croissance en milieu liquide et au cours des micro-fermentations.

Table des matières

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. LE CAFE	4
<i>I. 1. Données botaniques et culturales sur les caféiers</i>	<i>4</i>
I.1.1. <i>Coffea arabica</i>	<i>4</i>
I.1.2. <i>C. canephora var. robusta</i>	<i>5</i>
<i>I. 2. Morphologie et composition chimique du café</i>	<i>5</i>
I.2.1. Morphologie	5
I.2.2. Composition chimique de la graine	6
<i>I. 3. Production mondiale de café</i>	<i>6</i>
<i>I.4. Récolte et traitement post-récolte du café</i>	<i>7</i>
I.4.1. Récolte du café	7
I.4.1.1. Récolte par arrachement	7
I.4.1.2. Récolte sélective	7
I.4.2. Les différents traitements post récolte	7
I.4.2.1. La voie sèche	9
I.4.2.2. La voie humide	9
I.4.2.3. Autres voies de traitement	11
<i>I.5. Les différentes microflores (microbiotes) associées au café</i>	<i>11</i>
<i>I.6. Le rôle des flores microbiennes dans l'élaboration du café</i>	<i>12</i>
<i>I.7. Les facteurs influençant la qualité du café</i>	<i>14</i>
I.7.1. Impact du procédé	14
I.7.2. Impact des paramètres physicochimiques	14
I.7.3. Impact de l'OTA sur la qualité sanitaire	15
I.7.4. Impact de l'origine géographique	15
II. LE CACAO	15
<i>II.1. Généralité sur le cacaoyer</i>	<i>15</i>
II.1.1. L'écologie du cacaoyer	16
II.1.2. Classification taxonomique du cacaoyer	16
II.1.2.1. Variété Criollo	16
II.1.2.2. Variété Forastero	17
II.1.2.3. Variété de Trinitario	17
<i>II.2. Morphologie et composition chimique du cacao</i>	<i>17</i>

II.2.1. Morphologie	17
II.2.1.1. Fruit.....	17
II.2.1.2. Graine.....	18
II.2.2. Composition chimique	18
II.2.2.1. Protéines et acides aminés	19
II.2.2.2. Théobromine et Caféine	20
II.2.2.3. Lipides	20
II.2.2.4. Glucides.....	21
II.2.2.5. Composés phénoliques	21
II.2.2.6. Acides organiques	21
II.2.2.7. Composés volatils	22
<i>II.3. Production mondiale du cacao</i>	<i>22</i>
<i>II.4. Récolte et traitement post-récolte du cacao</i>	<i>23</i>
II.4.1. Récolte des cabosses.....	23
II.4.2. Traitement post-récolte du cacao.....	23
II.4.1.1. Écabossage.....	23
II.4.1.2. Fermentation	24
II.4.1.3. Le brassage.....	30
II.4.1.4. Séchage	31
II.4.1.5. Stockage	32
<i>II.5. Généralités sur les arômes des aliments/Saveurs.....</i>	<i>32</i>
II.5.1. Impact des composés volatils sur l'arôme	34
II.5.2. Sources des composés aromatiques	34
II.5.3 Aromes du cacao	36
II.5.3.1. Généralités.....	36
II.5.3.2. Effet de l'origine, la variété et la culture sur les arômes	42
II.5.3.3. Développement des arômes durant les traitements post récolte du cacao	43
III. TRAÇABILITE.....	47
<i>III.1. Généralités.....</i>	<i>47</i>
<i>III.2. Méthodes d'analyse des communautés microbiennes</i>	<i>48</i>
III.2.1. Méthodes traditionnelles d'analyse des micro-organismes dépendantes de la culture	49
III.2.2. Méthodes indépendantes de la culture pour l'analyse de l'écologie microbienne des aliments et métagénomique	50
III.1.2.1. Le choix de l'ARN ribosomal (ARNr).....	52

III.1.2.2. Principe de la PCR-DGGE.....	52
III.1.2.3. Application de la PCR-DGGE dans le domaine agro-alimentaire	53
III.1.2.4. Limites de la PCR-DGGE	55
I. MATERIEL VEGETAL	57
I.1. Échantillonnage de café.....	57
I.1.1. Café du Cameroun.....	57
I.1.1.2. Café d'Indonésie.....	59
I.2. Échantillonnage du cacao.....	60
II. METHODES	62
II.1. Analyse des communautés microbiennes par des techniques de biologie moléculaire	62
II.1.1. Protocole d'extraction de l'ADN bactérien et fongique.....	62
II.1.1.1. Extraction des ADN totaux des souches de bactéries et levures en culture pure par choc thermique	62
II.1.1.2. Extraction des ADN totaux à partir des fèves de cacao et des grains de café.....	62
II.1.2. Vérification de l'extraction d'ADN.....	63
II.1.3. Amplification du gène de l'ARNr par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	64
II.1.3.1. Amplification du gène de l'ARNr 16S des bactéries.....	64
II.1.3.2. Amplification du gène l'ARNr 26S des levures.....	65
II.1.3.3. Amplification du gène de l'ARNr 28S des moisissures.....	66
II.1.4. Mélanges réactionnels et conditions de PCR	67
II.1.5. Vérification de l'amplification	69
II.1.6. Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)	69
II.1.6.1. Composition et préparation du gel de DGGE.....	69
II.1.6.2. Conditions de migration électrophorétiques de la DGGE.....	70
II.1.6.3. Traitement d'image et traitement statistique des profils DGGE	70
II.1.6.4. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE.....	73
II.2. Techniques de microbiologie conventionnelles	74
II.2.1. Microorganismes étudiés	74
II.2.2. Milieux de culture utilisés	74
II.2.3. Protocole d'isolement	75
II.2.4. Protocole de culture.....	76
II.3. Analyse biochimique des échantillons	79
II.3.1. Analyses des composés d'arôme par micro-extraction en phase solide SPME	79
II.3.1.1. Préparation des échantillons et extraction.....	80
II.3.1.2. Analyse GC-MS.....	81

II.3.1.3. Identification des composés volatils	82
II.3.1.4. Analyses statistiques	82
II.3.2. Dosage des acides organiques	82
II.3.2.1. Extraction des acides organiques.....	82
II.3.2.2. Dosage des acides organiques	82
RESULTATS ET DISCUSSION.....	84
CHAPITRE I. DISCRIMINATION DES PROCÉDES POST-RECOLTE DU CAFÉ PAR ANALYSE DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES.....	84
<i>I.1. Étude de la structure des communautés microbiennes associées au café camerounais.....</i>	<i>86</i>
I.1.1. Variation de la structure des communautés microbiennes en fonction du traitement appliqué.....	87
I.1.2. Variation de la structure des communautés microbiennes en fonction de l'espèce de café analysée	96
I.1.3. Variation de la structure des communautés microbiennes en fonction de l'origine géographique	99
I.1.4. Étude combinée des paramètres influençant la structure des populations microbiennes	103
I.1.5. Dynamique des communautés microbiennes au cours des deux années de récolte ...	106
<i>I.2. Discrimination des procédés de traitement post-récolte du café indonésien.....</i>	<i>110</i>
<i>I.3. Hiérarchisation des procédés post-récolte du café camerounais et indonésien.....</i>	<i>115</i>
<i>I.4. Conclusion partielle.....</i>	<i>120</i>
CHAPITRE II. DISCRIMINATION DES TRAITEMENTS POST-RECOLTE DU CACAO	122
<i>III.1. Impact des paramètres au cours de traitement post-récolte</i>	<i>123</i>
III.1.1. Impact du délai d'écabossage	123
III.1.2. Impact de l'étape de fermentation	129
III.1.2.1. Méthodes de fermentation	129
III.1.2.2. Durée de fermentation	134
III.1.2.3. Effet de l'aération durant la fermentation	135
<i>III.2. Dynamique des communautés microbiennes du cacao au cours du traitement post-récolte</i>	<i>137</i>
<i>III.3. Conclusion partielle.....</i>	<i>145</i>
CHAPITRE III. DISCRIMINATION DES TRAITEMENTS POST-RECOLTE DU CACAO PAR L'ANALYSE DE SES COMPOSÉS AROMATIQUES	149
<i>III. 1. Effet du brassage sur les composés volatils.....</i>	<i>149</i>

III.1.1. Effet du brassage sur les alcools obtenus durant la fermentation du cacao	150
III.1.2. Effet du brassage sur les aldéhydes obtenus durant la fermentation du cacao	152
III.1.3. Effet du brassage sur les cétones obtenues durant la fermentation du cacao.....	153
III.1.4. Effet du brassage sur les esters obtenus durant la fermentation du cacao	155
III.1.5. Effet du brassage sur les acides obtenus durant la fermentation du cacao	156
III.1.6. Effet du brassage sur les pyrazines obtenues durant la fermentation du cacao	159
<i>III.2. Effet de la durée de fermentation sur la production des composés volatils.....</i>	<i>160</i>
III.2.1. Effet de la durée de fermentation sur les alcools	160
III.2.2. Effet de la durée de fermentation sur les aldéhydes	161
III. 2. 3. Effet de la durée de fermentation sur les cétones.....	163
III.2.4. Effet de la durée de fermentation sur les esters.....	164
III.2.5. Effet de la durée de fermentation sur les acides	164
<i>III.3. Étude de l'effet du délai de stockage des cabosses avant écabossage sur les composés volatils avant fermentation</i>	<i>166</i>
<i>III.4. Application des analyses statistiques sur l'ensemble des données sur les composés volatils pour discriminer les procédés post-récolte</i>	<i>170</i>
<i>III.5. Effet des pratiques post-récolte sur les acides organiques non volatils</i>	<i>175</i>
<i>III.6. Conclusion partielle.....</i>	<i>177</i>
IV. ÉTUDE DU PROFIL AROMATIQUE DES SOUCHES MICROBIENNES ISOLEES DU CACAO	179
IV.1. Le choix des souches microbiennes.....	180
IV.2. Étude préliminaire du profil aromatique au cours de la croissance microbienne en milieu liquide	182
IV.3. Étude du profil aromatique au cours de micro-fermentations du cacao.....	185
IV.3.1. Fermentation du cacao en monoculture de LAB	186
IV.3.2. Fermentation du cacao en monoculture d'AAB.....	188
IV.3.3. Fermentation du cacao en monoculture de levures.....	192
IV.3.4. Fermentation du cacao en co-cultures de LAB, AAB et levures.....	195
IV.4. Conclusion partielle	200
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	202
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	209

INTRODUCTION

Introduction

Depuis l'époque coloniale, l'Afrique de l'Ouest est considérée comme pourvoyeuse de matières premières agricoles. Le cacao et le café, deux produits souvent considérés indissociables car cultivés dans les mêmes zones, constituent les emblèmes de cette époque (OCDE, 2007). Ces deux produits font partie des matières premières les plus échangées dans le monde. En ce qui concerne les produits agricoles et en particulier ceux de rente, ils occupent la première place mondiale en termes de volume et de valeur.

La culture du cacaoyer et du caféier requiert le climat chaud et humide des régions tropicales ou subtropicales. Les pays qui bénéficient d'une forte pluviométrie sont les plus grands producteurs de cacao et café. La production totale de cacao a été estimée à 4,1 millions de tonnes en 2014 (ICCO, 2014). Une cinquantaine de pays de la zone intertropicale cultivent la fève de cacao; trois d'entre eux dominent la production mondiale : la Côte d'Ivoire (39 %), le Ghana (21 %) et l'Indonésie (13 %). La Côte d'Ivoire est le premier producteur et exportateur mondial de cacao depuis les années 1960 – 1970. La production a atteint un record historique de 1,74 millions de tonnes en 2014. Le pays tire 15% de son produit intérieur brut de la production et l'exportation de cacao (OCDE).

La production totale de café pour la période 2012/2013 a été estimée à 145,1 millions de sacs, à comparer avec la consommation mondiale de l'année civile 2012 qui est évaluée à environ 142 millions de sacs (1 sac = 60 Kg). Il y a donc un excès manifeste de café sur le marché qui a fortement pesé sur les prix. En 2014, la production mondiale de café a atteint environ 148.7 millions de sacs de 60 Kg (ICO, 2014). Le Brésil est le plus gros producteur suivi du Viet Nam puis de la Colombie. Des pays du continent africain comme la Côte d'Ivoire et le Cameroun ont aussi leur part sur ce marché.

Cependant, même si la filière cacao-café est très florissante, on peut noter quelques freins à son développement tels que la chute des cours mondiaux et leur forte volatilité, la baisse des revenus par producteurs, l'amenuisement des terres cultivables, la faiblesse des rendements et les difficultés des planteurs à s'approprier les techniques modernes de production.

Mais nonobstant ces difficultés, l'essentiel de la production de cacao et de café est l'œuvre de petits producteurs qui pratiquent cette culture généralement sous ombrage, en association avec d'autres végétaux ou encore dans des régions d'agroforesterie semi-naturelle qui constitue par conséquent un habitat particulièrement riche et stable pour de nombreuses espèces.

Le cacao et le café possèdent un potentiel de qualité intrinsèque qui dépend fortement de la variété des arbres plantés, des conditions de culture, de la saison de récolte, de l'origine

géographique, du terroir et du savoir-faire agronomique du planteur. Mais ce potentiel peut être valorisé ou, au contraire, dégradé au cours des opérations post-récolte (Barel, 2013; Saltini *et al.*, 2013).

La transformation technologique du cacao en fèves marchandes et des grains de café en café vert est très longue et nécessite un processus primaire de manutention. En ce qui concerne le cacao, les différentes étapes du processus post récolte sont : l'écabossage, la fermentation, le séchage, le stockage et le transport (Beckett, 2009). Pour le café, on note le traitement par voie sèche et/ou humide, stockage et transport (Perraud-Gaime, 1995; Hicks, 2001)

Ces traitements post-récolte, assurés par les producteurs dont la fermentation est l'étape la plus importante, participent et impriment en général, les qualités marchande et organoleptique des produits destinés à la transformation (Schwan and Wheals, 2004). Un mauvais traitement des fèves de cacao et grains de café après récolte peut être à l'origine de l'apparition de certaines altérations (moisissement, pourriture, germination...) sur les produits causées notamment par des microorganismes (bactéries, levures et moisissures). Celles-ci vont avoir un impact sur la qualité marchande du produit entraînant d'énormes pertes surtout économiques.

C'est dans ce cadre que cette étude a été entreprise, avec comme objectif principal la discrimination des procédés de traitement post récolte du cacao ivoirien, du café camerounais et indonésien en mesurant l'impact de ces procédés sur la structure des communautés microbiennes de ces différents produits (cacao ivoirien, café camerounais et indonésien). Pour cela un outil d'analyse globale de biologie moléculaire couplé à différentes autres techniques analytiques a été utilisé afin de mieux comprendre tous les phénomènes biologiques, biochimiques et chimiques qui se développent au cours des procédés pratiqués par les producteurs sur la croissance, la succession et l'identité des microorganismes impliqués.

Une évaluation de la diversité et de la dynamique microbienne a été réalisée sur les procédés de traitements post récolte par l'analyse globale de l'écologie microbienne en utilisant un outil de la biologie moléculaire, la PCR-DGGE qui apparaît comme une nouvelle stratégie dans la détection des communautés microbiennes dans les aliments (Ercolini, 2004). Elle a déjà été utilisée pour discriminer les poissons (Le Nguyen, 2008), les fromages (Arcuri *et al.*, 2013) et les fruits selon leurs origines (Le Nguyen *et al.*, 2008 ; El Sheikha, 2010), leurs traitements pré-récoltes, en discrimination des produits issus de l'agriculture biologique (Bigot *et al.*, 2015). De manière spécifique, pour le cacao nous avons étudié l'influence des procédés sur la production d'arômes liée à la présence des micro-organismes.

Enfin, nous avons testé les effets de plusieurs souches microbiennes (bactéries et levures) isolées à partir du cacao sur la production de composés volatils afin de mieux comprendre le

rôle de ces micro-organismes dans l'élaboration de la qualité aromatique du cacao afin de pouvoir proposer une piste de starters de culture aux industriels de la filière. Les starters de culture sont des souches microbiennes qui sont soit pures ou en mélange, qui sont utilisées pour amorcer et accélérer le processus de fermentation du cacao. Ces micro-organismes sont choisis pour leur capacité à produire des métabolites qui donnent un arôme particulier.

Les différents procédés de transformation post-récolte appliqués sur le cacao et le café ont une influence sur l'écologie microbienne. Les questions de recherche posées lors de cette étude et auxquelles nous avons essayé de répondre sont donc les suivantes :

- L'effet des procédés sur les micro-organismes peut-il être mesuré par analyse moléculaire globale de l'écologie microbienne ?
- Peut-on discriminer les méthodes de traitement du cacao et du café par analyse de la diversité microbienne ?
- Comment les différents procédés post-récolte influencent-ils la qualité aromatique du cacao ?
- Peut-on combiner l'analyse globale de l'écologie microbienne (PCR-DGGE) et l'analyse des composés volatils (SPME-GC-MS) pour discriminer les différents procédés de transformation post récolte ?
- Quel est le rôle des souches microbiennes isolées du cacao dans la production aromatique ?

Mais avant tout nous allons présenter et donner une synthèse bibliographique sur les deux matrices aromatiques à savoir le café et le cacao, ensuite identifier les différentes techniques de traitements post-récolte effectuées par les producteurs.

PREMIÈRE PARTIE :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

I. Le café

Le café est une boisson réalisée à partir des graines d'un arbuste : le caféier.

I. 1. Données botaniques et culturelles sur les caféiers

Le caféier est probablement originaire d'Afrique, sa culture précoce a été rapportée dans les hauts plateaux éthiopiens et aussi sur l'autre côté de la mer Rouge (Yémen). Les caféiers poussent mieux dans les zones tropicales. Aujourd'hui, La **culture du café se situe dans une zone géographique comprise entre les tropiques du Cancer et du Capricorne** avec 70 pays producteurs répartis sur quatre continents (Figure 1), dont une quarantaine produit des cafés fins.

Les caféiers sont des arbustes appartenant au genre *Coffea*, de la famille des rubiacées, dans l'ordre des rubiales. Le genre *Coffea* comprend près de 70 espèces et plusieurs centaines de variétés. Les espèces les plus répandues et commercialisées sont : *Coffea arabica* et *Coffea canephora* variété *robusta*.

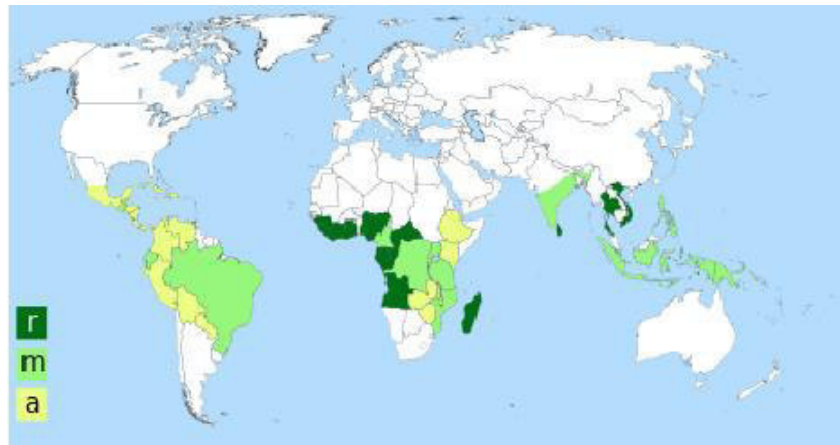


Figure 1 : Répartition géographique de la culture du café (r : Robusta, a : Arabica et m : Robusta et Arabica. (http://www.mon-cafe.fr/la-culture-du-cafe-ci-2_10.html)

I.1.1. *Coffea arabica*

C. arabica est le premier caféier à avoir été découvert et cultivé, il est originaire d'Éthiopie. L'arbuste peut atteindre 10 m de hauteur à l'état sauvage. Les principales zones de culture de l'Arabica sont les régions montagneuses de l'Amérique centrale et du sud mais aussi d'Afrique orientale.

Sa culture est délicate, nécessite un climat d'environ 20°C ; elle requiert une altitude de 800 à 2000 m et un sol riche (Lambard, 2003). *C. arabica* donne des feuilles vert-foncé et brillantes

ainsi qu'un tronc droit et des fruits de très bonne qualité avec une forme allongée, plus pointue que celle de *C. canephora* var. *robusta* (Coltro *et al.*, 2006). La pulpe est naturellement peu caféinée, mais riche en magnésium, en fer et en vitamines. Le café Arabica est considéré comme le haut de gamme des cafés, grâce à son arôme, à sa finesse et à sa douceur.

1.1.2. C. canephora* var. *robusta

L'arbuste *Coffea canephora* est un arbre de grande taille (pouvant atteindre jusqu'à 10 mètres de haut) poussant à des altitudes moins élevées que *C. arabica* et préférant la chaleur et l'humidité. Il est principalement cultivé dans les zones tropicales plus humides de basses altitudes dans les régions d'Afrique centrale et occidentale, dans l'ensemble du sud-est asiatique et dans certaines zones du Brésil (ICO, 2014). Ses feuilles sont d'un vert plus clair et ses cerises sont rondes, petites et plus épaisses que celles du *C. arabica* (Lambard, 2003). Le café robusta possède une teneur en caféine deux fois plus élevée que celle de l'arabica. Il se vend moins cher sur le marché.

I. 2. Morphologie et composition chimique du café

1.2.1. Morphologie

Le fruit du caféier est une cerise qui présente à maturité une baie de forme ovoïde de couleur verte, jaune et rouge, elle est classée comme «drupe» (Figure 2). La cerise est formée d'une pellicule externe appelée exocarpe et d'un endocarpe lignifié avec un mésocarpe pulpeux qui est formé d'une couche de cellules spongieuses avec une épaisseur approximative de 5 mm (De Castro and Marraccini, 2006) (Figure 3). La pulpe renferme deux graines ovales (ou fèves), et chacune présente un albumen corné et raphé très marqué en forme de sillon, l'embryon est petit et oblique.



Figure 2 : Cerises du café (www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/cafe.htm)

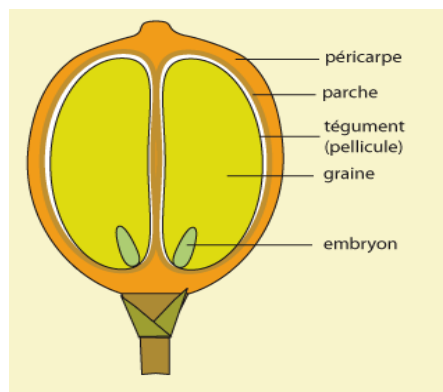


Figure 3 : Représentation schématique des tissus présents dans le fruit de *Coffea sp.*

(www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/cafe.htm)

1.2.2. Composition chimique de la graine

Le café est composé essentiellement de glucides, lipides, acides aminés et minéraux (Tableau 1). Cependant les valeurs représentées peuvent varier selon l'espèce et au cours du procédé du café (torréfaction) (Lockhart, 1957).

Tableau 1 : Composition biochimique de la graine (en % de Matière Sèche).

Constituants (%MS)	Arabica	Robusta
Caféine	0,9-1,2	1,6-2,4
Trigonelline	1,0-1,2	0,6-0,75
Acides chlorogéniques	5,5-8,0	7,0-10,0
Lipides	12,0-18,0	9,0-13,0
Acides aliphatiques	1,5-2,0	1,5-2,0
Oligosaccharides	6,0-8,0	5,0-7,0
Polysaccharides	50,0-55,0	37,0-47,0
Acides Aminés	2	2
Minéraux	3,0-4,2	4,0-4,5
Protéines	11,0-13,0	11,0-13,0

I. 3. Production mondiale de café

En 2014, la production mondiale de café a été estimée à 141.6 millions de sacs : le Brésil, le Vietnam et la Colombie assurant la majeure partie. L'Afrique représente 11,5% de la production mondiale, l'Éthiopie demeurant le plus grand pays producteur africain avec 6,6 millions de sacs

en 2014, suivi de la Côte d'Ivoire (2,1 millions de sacs). La région comprenant l'Asie et l'Océanie représente 29,2% de cette production. Le Vietnam, l'Inde et l'Indonésie ont enregistré 27,5 millions, 5,7 millions et 9 millions de sacs respectivement. L'Amérique du Sud est la plus grande région productrice grâce au Brésil (45,3 millions de sacs) et la Colombie (12,5 millions de sacs) (ICO, 2014).

I.4. Récolte et traitement post-récolte du café

I.4.1. Récolte du café

Il existe plusieurs types de récolte. Le choix de la technique se fait en fonction de la qualité du café que l'on veut produire et du type d'exploitation caféière.

I.4.1.1. Récolte par arrachement

- L'égrappage ou streeping : les rameaux sont saisis à la main pour en arracher l'ensemble des fruits qu'ils portent, à maturité ou non. Ce type de récolte ne permet pas de faire un tri des fruits et n'est pas approprié pour produire un café de grande qualité.
- La récolte mécanique : comme pour le streeping, les rameaux sont débarrassés de l'ensemble de leurs drupes, mûres ou non mais cette fois de manière mécanique, souvent grâce à des tracteurs à chenille équipés de brosses. Pour les mêmes raisons que le streeping, ce type de récolte s'accorde difficilement avec la production d'un café de grande qualité.

I.4.1.2. Récolte sélective

Le picking ou récolte à la main : type de récolte recommandée pour réaliser un **café de très haute qualité**. Le picking consiste à cueillir à la main une à une les baies mûres. Le picking demande ainsi une grande attention. Le café récolté est homogène, cette cueillette manuelle et sélective des cerises mûres donne les meilleurs résultats dans la mesure où les fruits verts sont laissés sur l'arbre jusqu'à maturation alors que les cerises fermentées sont éliminées.

I.4.2. Les différents traitements post récolte

Différents traitements sont appliqués sur les cerises : deux principales voies de traitement de café sont utilisées (Figure 4). Le choix de la méthode est basé sur deux critères principaux : la variété et l'origine géographique. Pour la variété, la méthode est choisie en tenant compte de la quantité de pulpe que contient le type de café : lorsque peu de pulpe est présente comme le café Robusta, les cerises sont faciles à sécher et dans ce cas on applique la voie sèche. A l'inverse si

la pulpe est abondante, ce qui est le cas pour le café Arabica, cette matière ralentit le séchage, il faut donc d'abord l'éliminer avant de sécher le café, et dans ce cas la voie humide est appliquée. La disponibilité des ressources d'eau dans la région de culture du café rentre dans les critères de choix de la méthode. Par exemple au Brésil où se cultive l'Arabica, le manque d'eau oblige la pratique de la voie sèche sur cette espèce de café, alors que le contraire est observé au Cameroun. La récolte durant les saisons des pluies rend le séchage des cerises difficile ce qui oblige les planteurs à utiliser la voie humide dans les traitements des Robustas (Barel, 2008).

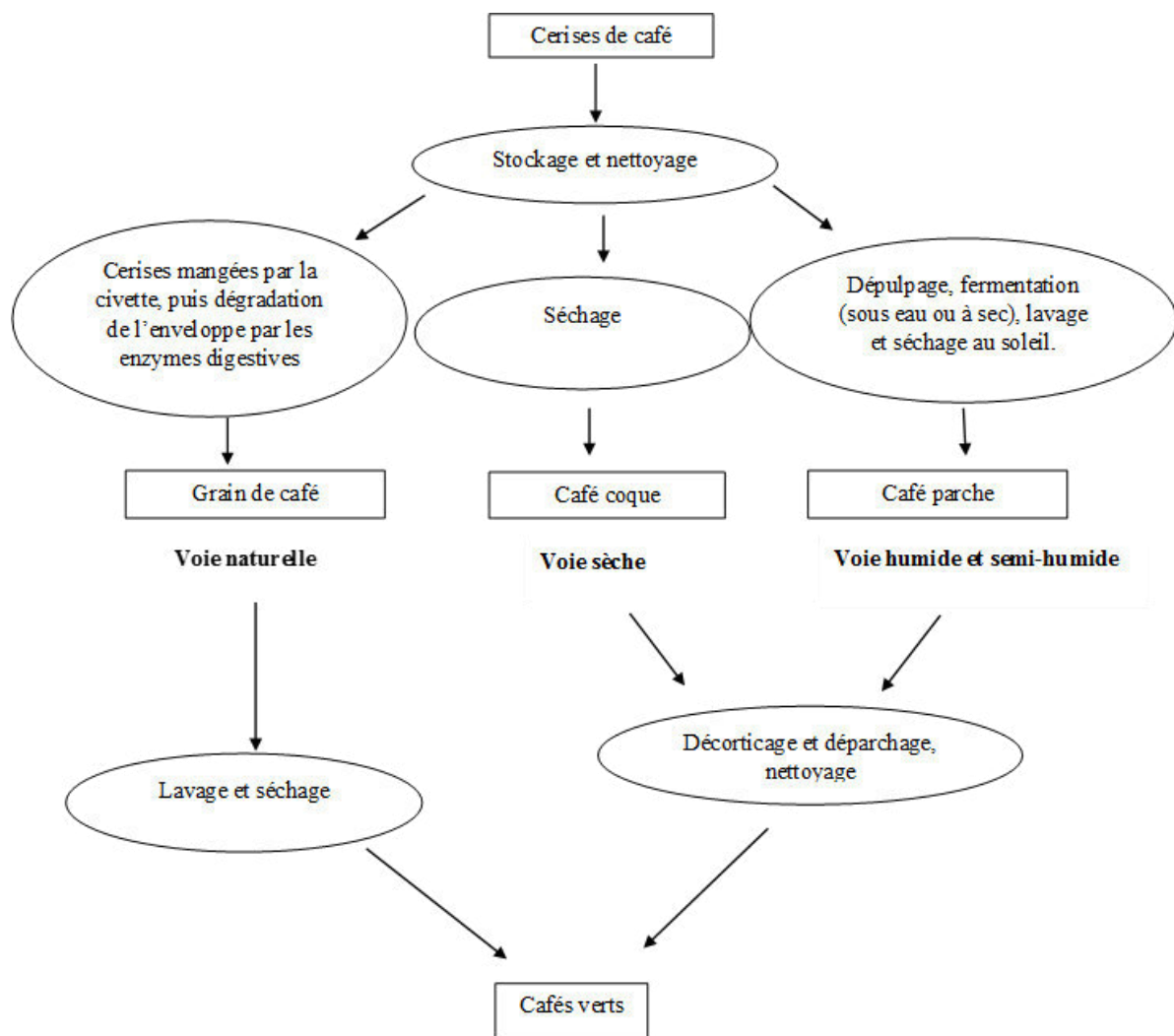


Figure 4 : Schéma montrant les différents types de traitements du café.

I.4.2.1. La voie sèche

La voie sèche (également appelée méthode naturelle) est la plus ancienne, la plus simple et ne nécessite que peu de matériel. Au cours de cette méthode les cerises récoltées sont directement mises à sécher pendant 3 - 4 semaines.

Il existe deux types de séchage :

- séchage naturel : sur bâche, sur claie ou aire cimentée (Figure 5). Les cerises étalées sont régulièrement remuées pour empêcher la formation de moisissure.



Figure 5 : Traitement du café par voie sèche (<http://cafe.maxicoffee.com/>)

- séchage artificiel : utilisé par certaines grandes fermes. Il s'agit de séchoirs statiques ou rotatifs ou à brassage d'air chaud (Lambard, 2003).

Le café séché est appelé « café en coque ». Il sera décortiqué à l'aide d'une machine pour produire le café vert.

La voie sèche est utilisée pour environ 95% de l'Arabica produit au Brésil, pour la plupart des cafés produits en Éthiopie, à Haïti, au Paraguay et en Équateur. La quasi-totalité des Robusta est traitée selon cette méthode. Elle ne convient pas dans les régions très pluvieuses où l'hygrométrie est trop élevée et où il pleut souvent durant la cueillette.

I.4.2.2. La voie humide

La voie humide nécessite un matériel spécial et de grandes quantités d'eau. Lorsqu'elle est faite selon les règles de l'art, elle préserve mieux les qualités intrinsèques des grains, produit un café vert homogène avec peu de grains défectueux. Le café traité selon cette méthode est donc généralement considéré comme de meilleure qualité et se négocie à des prix plus élevés.

Les méthodes par voie humide nécessitent une maturation uniforme des fruits, ainsi la récolte manuelle du type « picking » est la plus appropriée. Cette méthode est plus longue et comporte différentes étapes (Figure 4), cueillette, dépulpage, fermentation, lavage, puis séchage, départage (Barel, 2008).

➤ **Dépulpage**

Les cerises arrivent en général dans un bac de réception, elles sont transférées dans un siphon qui va séparer les cerises flottantes, défectueuses, des cerises lourdes qui sont entraînées par un courant d'eau vers le dépulpeur. Le dépulpeur est une machine qui utilise un disque ou un tambour à axe horizontal, recouvert d'aspérités. Le dépulpeur arrache la peau et une partie de la pulpe des cerises, libérant chacun des deux grains entourés de leur dernière enveloppe (la parche).

➤ **Démucilagination**

Cette opération libère les grains du reste d'une substance visqueuse qui les recouvre encore après le dépulpage. Il existe plusieurs techniques de démucilagination, mécanique ou microbienne.

- ✓ Technique microbienne : elle est appelée fermentation et consiste à déposer le café dépulvé par l'action de l'eau dans des bacs soit en béton ou en métal (Barel, 2008). La durée de fermentation varie de 24 à 90 h tout dépend de la température ambiante et du degré de maturité des cerises.
- ✓ Certains auteurs conseillent de pratiquer cette fermentation qu'ils considèrent solide car le milieu est suffisamment acidifié afin de permettre aux changements biochimiques intrinsèques au café vert de se produire sous l'eau (Wootton, 1963).
- ✓ Technique mécanique : elle se réalise dans des machines à tambour cannelé par friction. Le café démucilagné par cette technique ne présente aucun risque de fermentation indésirable mais il ne présente pas une aussi bonne qualité que le café fermenté par l'action des microorganismes.

➤ **Lavage**

Le but du lavage est d'éliminer toutes traces de mucilage sur la parche du grain. Il peut s'effectuer dans des cuves de fermentation en ajoutant de l'eau et en remuant les grains avec la main ou mécaniquement lorsque les couches des grains sont épaisses (Figure 6).

➤ Séchage

Après le lavage, le grain parche contient 50 à 60% d'eau ce qui pourrait l'altérer s'il était stocké en l'état. Le séchage peut se faire de façon naturelle ou artificielle, jusqu'à l'obtention d'une humidité de 11 à 12% (café parche).



Figure 6 : Lavage du café par voie humide (<http://www.comptoirsrichard.fr/>)

I.4.2.3. Autres voies de traitement

Originnaire d'Asie, il existe un type de café appelé Kopi Luwak qui est traité par une voie naturelle particulière. Kopi signifie « Café » en indonésien et Luwak désigne l'animal asiatique que l'on nomme communément en français « Civette ». *Paradoxurus hermaphroditus* est un petit mammifère solitaire et nocturne originaire d'Asie qui aime passionnément manger les cerises du caféier. Les cerises recueillies sont consommées par l'animal, ensuite la pulpe est digérée par l'action des enzymes digestives de l'animal. Les grains de café entiers sont rejetés dans les excréments de la civette, puis sont nettoyés, lavés et séchés.

I.5. Les différentes microflore (microbiotes) associées au café

Les principaux taxons fongiques endophytes retrouvés sur les plants de café sont *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, et *Xylariaceae* (Vega *et al.*, 2010). *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, et *Stenotrophomonas* sont les principaux genres bactériens endophytes associés aux divers tissus du café (Vega *et al.*, 2005).

La concentration en micro-organismes retrouvée sur un gramme de café fermenté ou séché varie entre 4 à 9 log UFC/g en bactéries, de 3 à 6 log UFC/g en levures, et de 2 à 4 UFC/g log en moisissures (Silva *et al.*, 2000 ; Vilela *et al.*, 2010). Les principaux genres bactériens isolés à partir du café appartiennent aussi bien aux bactéries à Gram négatif (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Serratia*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*) qu'aux bactéries à Gram positif. (*Bacillus*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brochothrix*, *Dermabacter* et *Lactobacillus*).

La plupart des levures isolées sont fermentatives et appartiennent aux genres *Pichia*, *Candida*, *Arxula*, *Debaryomyces*, *Saccharomycopsis*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Rhodotorula*. Les principales espèces de levures identifiées appartenant aux genres cités précédemment sont *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida quercitrusa*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia caribbica*, *Pichia guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspora delbrueckii* et *Rhodotorula mucilaginosa* (Vilela *et al.*, 2010 ; de Melo Pereira *et al.*, 2014 ; Evangelista *et al.*, 2014).

Les principaux genres des moisissures retrouvées sont *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Monilia*, *Rhizoctonia* et *Arthrobotrys* (Silva *et al.*, 2000 ; Silva *et al.*, 2008 ; Vilela *et al.*, 2010). Certaines espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium*, isolées à partir de grains de café verts sont potentiellement ochratoxinogènes (Batista *et al.*, 2003). *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus* and *Aspergillus sclerotiorum* sont les espèces les plus productrices d'ochratoxine A (Batista *et al.*, 2009).

1.6. Le rôle des flores microbiennes dans l'élaboration du café

Les micro-organismes jouent un rôle important dans la dégradation du mucilage qui entoure le café. Cette pseudo-fermentation conduit à la dégradation des sucres par les levures et les bactéries lactiques (LAB), et la dégradation des pectines et des protéines sous l'action des micro-organismes (Entérobactéries) pectinolytique et protéolytique.

Avallone *et al.* (2001) ont montré qu'au cours de la fermentation du café, 60% des sucres simples sont dégradés par la microflore. Les levures et les bactéries lactiques jouent le rôle principal dans la « fermentation » du café. La majorité des LAB ne produisent pas d'enzymes pectinolytiques, alors que d'autres bactéries comme *Erwinia herbicola* et *Klebsiella pneumoniae* sont pectinolytiques et produisent une enzyme pectate-lyase capable de dépolymériser les pectines estérifiées dans le mucilage (Avallone *et al.*, 2002). De nombreuses autres espèces bactériennes et fongiques isolées à partir du fruit de café ont démontré une forte activité protéolytique en sécrétant une enzyme nommée Caséinase comme *Bacillus*

megaterium, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter agglomerans*, *Kurthia sp*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Tatumella tyseos*, *Aspergillus dimorphicus*, *A. ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Penicillium fellutanum* et *Penicellium waksmanii*. Quelques levures sont protéolytiques comme *Citeromyces matritensis* (Rodarte *et al.*, 2011). Certains micro-organismes sont impliqués dans la dégradation de la caféine tels que les deux genres de moisissures *Aspergillus* et *Penicillium* et le genre bactérien *Pseudomonas sp.* (Mazzafera, 2002).

Les levures jouent un rôle primordial dans l'élaboration des précurseurs aromatiques lors du traitement du café, comme les alcools, les acétates, les terpènes, les aldéhydes et les acides volatils. Cependant, les résultats des travaux de Bonilla-Hermosa *et al.* (2014) ont indiqué que les résidus de café présentent un excellent potentiel en tant que substrats pour la production de composés volatils comme c'est le cas de *Hanseniaspora uvarum* qui a démontré une bonne capacité de fermentation à partir de ces résidus. Evangelista *et al.* (2014) ont étudié la performance de quelques souches de levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii*) comme des starters de culture au cours du traitement par voie sèche afin d'améliorer la qualité des boissons de café.

Le métabolisme secondaire de certaines espèces fongiques donne des substances toxiques : les mycotoxines. Elles peuvent également être définies comme des métabolites produits après l'arrêt de la réduction des groupes cétoniques pendant la biosynthèse des acides gras chez les moisissures (Gimeno, 2000). Les grains de café sont essentiellement contaminés par l'Ochratoxine A (OTA) qui est principalement produite par le genre *Aspergillus*, et en particulier les deux espèces ochratoxinogènes que sont *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus westerdijkiae* (Joosten *et al.*, 2001 ; Durand, 2012). Les contaminations du café par les moisissures toxigènes affectent sérieusement la qualité de ce dernier. Certaines études ont été réalisées avec comme objectif de limiter les contaminations afin d'améliorer la qualité du café. Des bactéries lactiques isolées des grains du café ont été testées sur des souches ochratoxinogènes d'*Aspergillus* isolées du café. Ces bactéries ont montré une activité antifongique efficace contre *Aspergillus carbonarius* (Djossou *et al.*, 2011). Durand (2012) a étudié le phénomène de compétition entre différents couples de souches d'*Aspergillus* potentiellement compétitrices isolées de café qui ont un impact sur la réduction de la production d'OTA. Les mécanismes de compétition-inhibition ne sont pas liés à des mécanismes d'antibiose mais plutôt à une compétition nutritionnelle liée à des vitesses de croissance différentes.

1.7. Les facteurs influençant la qualité du café

1.7.1. Impact du procédé

La contamination des grains de café vert par les moisissures ochratoxinogènes est généralement liée aux types de procédés appliqués et à certaines étapes critiques. L'étape du séchage au cours de la voie sèche est identifiée comme étant critique car favorisant le développement des moisissures et la production d'OTA particulièrement en conditions tropicales humides. Lors du traitement du café par voie humide, après le dépulpage, les grains de café peuvent être fortement contaminés suite à la présence de composés solubles dans le grain qui favorisent la croissance des moisissures. Les étapes de transport et de stockage peuvent également avoir une influence sur la contamination par l'OTA, car les grains mal séchés peuvent être contaminés dans la mesure où le développement des moisissures requiert une activité de l'eau (A_w) minimale de 0,65 (Bucheli and Taniwaki, 2002).

Les cerises traitées par voie humide présentent une meilleure qualité que celles traitées par voie sèche probablement grâce au contact et aux échanges avec l'eau (Barel, 2008). Par ailleurs le type de dépulpage appliqué au cours de cette voie a un impact sur la flaveur du café : le dépulpage par voie microbienne produit un café de meilleure qualité aromatique (Gonzalez-Rios *et al.*, 2007). Les autres étapes de transformation ont également un impact sur l'évolution des composés aromatiques du café principalement la torréfaction, le broyage et le brassage (Bhumiratana *et al.*, 2011).

1.7.2. Impact des paramètres physicochimiques

Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer l'influence de l'activité de l'eau, la température, la durée d'incubation et leurs interactions sur la croissance fongique et la production d'ochratoxine par *A. ochraceus* et *Aspergillus* section Nigri (Astoreca *et al.*, 2010) sur un milieu défini et sur le café (Pardo *et al.*, 2005a), l'orge (Ramos *et al.*, 1998) et le raisin (Mitchell *et al.*, 2004 ; Belli *et al.*, 2004 ; Pardo *et al.*, 2005b).

Mais la température constitue un facteur très important dans la production d'OTA. Des études préliminaires indiquent des conditions optimales entre 32 et 35°C (Heenan *et al.*, 1998; Varga *et al.*, 1996). *Aspergillus niger* se développe de façon optimale à des températures élevées, avec un optimum entre 35-37°C. *Penicillium verrucosum*, quant à lui, est capable de croître à basse température (entre 0 et 31°C, l'optimum est à 20°C). La patuline, l'acide pénicillique et l'OTA sont élaborés à des températures généralement inférieures à celles de la croissance.

1.7.3. Impact de l'OTA sur la qualité sanitaire

Un grand nombre de produits alimentaires comme les céréales, la bière, le café, le cacao, les fruits secs, le raisin, le jus de raisin et le vin, les abats de porc ou de volaille et le lait sont contaminés par l'OTA (Pittet *et al.*, 1996 ; WHO, 1996 ; Blanc *et al.*, 1998 ; Hurst et Martin, 1998 ; Jorgensen, 1998 ; Skaug, 1999 ; Thirumala-Devi *et al.*, 2001 ; Miraglia et Brera, 2002 ; Mounjouenpou *et al* 2008 ; Dachoupakan *et al.*, 2009).

A cause de sa thermostabilité et de sa résistance à l'acidité (Boudra *et al.*, 1995,), l'OTA est également retrouvée dans les produits transformés fermentés, séchés et/ou torréfiés (Chiavaro *et al.*, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002).

L'OTA suscite une attention particulière pour ses effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes (Abarca *et al.*, 1994 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999).

Les niveaux de contamination du café par l'OTA varient en fonction des différentes régions d'origine. Cette différence est tributaire des conditions climatiques de chaque région et aux traitements post-récolte utilisés. En général, tous les cafés lavés et non lavés provenant d'Amérique Centrale et du Sud ont une faible teneur en OTA. Des taux plus élevés ont été observés dans le café des pays producteurs des variétés Robusta ou Arabica non lavés. Cependant, ces observations ne peuvent pas exclure la possibilité que la contamination par l'OTA puisse se produire à la dernière étape en raison de mauvaises conditions de transport et de stockage (Heilman *et al.*, 1999).

1.7.4. Impact de l'origine géographique

L'origine du café peut avoir un impact sur sa qualité. Des études ont relié l'origine géographique à la composition aromatique du café (Freitas and Mosca, 1999), à la composition chimique du café (Anderson and Smith, 2002), au polymorphisme des bases génétiques du café (Anthony *et al.*, 2008) et à la structure des communautés fongiques associée au grain de café (Nganou *et al.*, 2012).

II. Le cacao

II.1. Généralité sur le cacaoyer

Le cacaoyer est un petit arbre haut de 6 à 9 m cultivé dans les forêts tropicales de la zone intertropicale (20° de latitude Nord au Sud de l'équateur). Cette zone tropicale comprend l'Afrique occidentale, l'Amérique centrale et du Sud ainsi que l'Asie et l'Océanie. Les cacaoyers se présentent sous diverses formes à l'état adulte (10 ans) et peuvent atteindre 12 à

15 m de hauteur lorsqu'ils poussent à l'état sauvage. Il atteint son plein développement vers l'âge de dix ans (Mossu, 1990).

II.1.1. L'écologie du cacaoyer

La culture du cacaoyer dépend de la température, de la pluviosité et de la composition du sol. L'optimum de croissance du cacaoyer se situe entre 24 et 26°C. À moins de 18°C, l'arbre rencontre des difficultés de croissance, alors qu'au-delà de 32°C sa production est réduite. Il exige une humidité située autour de 80% et une pluviosité annuelle supérieure à 1700 mm (Wood et Lass, 1985 ; Despréaux, 1998). La culture du cacaoyer exige un certain type de sols. Les exigences en particulier pour les propriétés physiques des sols, dépendent beaucoup du régime des précipitations et de l'adaptation à l'ombrage et au climat. En ce qui concerne la nature chimique des sols, le cacaoyer préfère des sols plutôt riches en matière organique et/ou neutre (Barel, 1997).

II.1.2. Classification taxonomique du cacaoyer

Le cacaoyer appartient à la super division Spermatophyta, à la division Magnoliophyta, à la classe Magnoliopsida, à l'ordre des Malvales, à la famille des Sterculiaceae et au genre *Theobroma*. Le genre *Theobroma* regroupe une vingtaine d'espèces de petits arbres, il s'agit de : *Theobroma bicolor*, *T. cacao*, *T. herrania*, *T. grandiflora*, *T. microcarpa* et *T. speciosa* (Braudeau 1969 ; Kennedy, 1995).

Le cacaoyer *Theobroma cacao* L. présente une très grande diversité. Cette diversité repose sur les caractéristiques morphologiques des cabosses ou des graines, qui présentent toutes une très grande variabilité. Seules les fleurs sont morphologiquement peu variables. On distingue trois grandes variétés : Criollo, Forastero amazonien et Trinitario. De ces trois grands groupes sont nés par croisement des hybrides fertiles qui constituent la majorité des cultivars utilisés en plantation.

II.1.2.1. Variété Criollo

Les cacaoyers de la variété Criollo sont très peu cultivés car ils sont moins robustes et plus sensibles aux maladies, aux insectes du cacaoyer et aux intempéries climatiques. Les Criollo donnent de grosses fèves avec des cotylédons « à casse claire » très aromatique, qui ne présentent qu'une légère amertume. Les cacaoyers Criollo purs sont principalement cultivés dans la zone mésoaméricaine (Mexique, Nicaragua, Guatemala, Colombie, Venezuela...), dans

l'arc antillais, à Madagascar, Sri Lanka, Indonésie et aux îles Samoa. Ces cacaoyers représentent seulement 1 à 5% de la production mondiale du cacao.

II.1.2.2. Variété Forastero

Cette variété est rencontrée à l'état sauvage en haute Amazonie. Elle est très diversifiée et largement utilisée en plantation dans tous les pays producteurs. Les cabosses des cacaoyers sont vertes avec des formes très variables. Leurs fèves sont plates avec des cotylédons de couleur pourpre foncé donnant un cacao de saveur amère et un goût acide. Les Forastero sont aujourd'hui très largement cultivés dans les pays producteurs (principalement Côte d'Ivoire et Ghana) et fournissent plus de 80% de la production mondiale de cacao.

II.1.2.3. Variété de Trinitario

Cette variété est issue du croisement entre Criollo et Forastero. Les Trinitario possèdent des caractéristiques intermédiaires entre les deux groupes. Les arbres de première génération peuvent être vigoureux et hautement producteurs. Les cabosses sont de couleur intermédiaire entre le clair des Criollo et le sombre des Forastero. Aujourd'hui, les Trinitario sont cultivés dans tous les pays où furent autrefois cultivés les Criollo (Mexique et Amérique Centrale, Trinidad, Venezuela, Colombie...). Ils sont présents également en Afrique et le Cameroun est le premier pays où les Trinitario ont été introduits massivement. Les Trinitario représentent 10 à 15 % de la production mondiale

II.2. Morphologie et composition chimique du cacao

II.2.1. Morphologie

II.2.1.1. Fruit

Le fruit est appelé « chérelle » pendant sa croissance et porte le nom de cabosse (Figure 7) lorsqu'il devient mature. Sa croissance et sa maturation nécessitent entre 5 et 7 mois. La couleur du fruit est considérée comme un marqueur de maturité car la cabosse passe de la couleur verte ou rouge au jaune ou orangé. Le fruit est porté par un pédoncule ligneux qui provient du développement en épaisseur du pédicelle de la fleur. Le fruit est constitué d'un péricarpe charnu, dur, partiellement lignifié qui contient un mucilage et 30 à 60 graines appelées fèves. La taille et le poids de la cabosse varient respectivement entre 10 et 35 cm et entre 200 et 800 grammes (Mossu, 1990).



Figure 7 : Fruit du cacaoyer ou cabosse (http://www.le-jardin-ethnobotanique.com/cabosse-de-cacao-Theobroma-cacao-cabosse-Feves_a283.html)

II.2.1.2. Graine

La graine ou la fève de cacao possède la forme d'une amande plus au moins bombée, elle mesure de 2 à 4 cm de longueur, de 1 à 1,7 cm de largeur et de 0,7 à 1,2 cm d'épaisseur. Elle est entourée d'une pulpe mucilagineuse de couleur blanche, de saveur sucrée et acidulée. Elle est constituée de l'extérieur vers l'intérieur d'une coque mince, résistante, rosée, nervurée, d'une fine pellicule, translucide, brillante et de deux cotylédons (Figure 8) (Mossu, 1990).



Figure 8 : Graines de cacao avec et sans pulpe
(http://fr.academic.ru/pictures/frwiki/67/Cocoa_seeds.jpg)

II.2.2. Composition chimique

La pulpe de cacao contient entre 82 et 87% d'eau, 10 à 15% de sucres (60% de saccharose et 39% du mélange de glucose et fructose), 1 à 1,5% de pectine et 1 à 3% d'acide citrique. Les

protéines, les acides aminés, les vitamines (principalement la vitamine C), et sels minéraux constituent également la pulpe de cabosse mûre (Dias *et al.*, 2003 ; Schwan and Wheals, 2004). La composition chimique de la pulpe et de la fève évolue drastiquement au cours de la transformation du cacao et notamment lors de la fermentation.

Les fèves de cacao non fermentées représentent 4,2% d'eau, 21,6% de protéines, 55,2% d'acides gras, et 15,5% de glucides. Après fermentation ces valeurs diminuent légèrement à 4,0% d'eau, 18,8% de protéines, 53,4% d'acide gras et 21,0% de glucides (Afoakwa *et al.*, 2013a).

II.2.2.1. Protéines et acides aminés

Les protéines représentent environ 16,85% de la teneur totale des fèves fermentées (Tableau 2). Les acides aminés libres constituent la fraction d'azote non protéique dont 0,02% sous forme d'ammoniac formé pendant la fermentation des fèves. Diverses enzymes sont rencontrées dans les fèves, à savoir : α -amylase, β -fructosidase, β -glucosidase, β -galactosidase, pectinestérase, polygalacturonase, protéinases, phosphatases alcalines et acides, lipase, catalase. Des activités de peroxydase et de polyphénol oxydase, ont été détectées dans les fèves fraîches du cacao. Ces enzymes sont inactivées dans une large mesure au cours des traitements thermiques liés à la fermentation.

Tableau 2 : Composition de la poudre de cacao en protéines et acides aminés

(<http://skipthepie.org/>).

Constituants	Quantité / tasse (86g)	% de MS
<i>Protéines</i>	16.856g	34%
<i>Acides aminés essentiels</i>		
Histidine	0.29154 g	42%
Isoleucine	0.6536 g	47%
Leucine	1.02254 g	37%
Lysine	0.84538 g	40%
Méthionine	0.17372 g	
Phénylalanine	0.80926 g	
Thréonine	0.66736 g	64%
Tryptophane	0.25198 g	90%
Valine	1.01222 g	56%

II.2.2.2. Théobromine et Caféine

La Théobromine (3,7-diméthylxanthine) représente 1,2% de la matière sèche du cacao. Elle a un effet stimulant (toutefois inférieur à celui de la caféine dans le café) et par conséquent, une grande importance physiologique. La caféine est également présente, mais en quantités beaucoup plus faibles (en moyenne 0,2%). Une tasse de cacao contient environ 0,1 g de théobromine et 0,01 g de caféine. Dans les fèves de cacao fermentées, la présence de théobromine peut être souvent liée aux tanins libérés par la formation d'acide acétique au cours de la fermentation. Une partie de cette théobromine diffuse ensuite dans la coque de la fève (Belitz *et al.*, 2009).



Figure 9: Structure chimique de la théobromine (a) et de la caféine (b).

II.2.2.3. Lipides

Le beurre de cacao est un mélange de triglycérides (Ali, 1996). Il se présente sous différents aspects : cristallisé, plus ou moins onctueux suivant le pourcentage de triglycérides liquides et solides composant le beurre. Ce qui nous amène à définir le beurre de cacao comme étant une solution solide de triglycéride. Ce dernier se différencie des autres graisses naturelles par un nombre limité d'acides gras insaturés.

La détermination de la composition en acides gras est basée sur une analyse chromatographique en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras. Ceux-ci sont obtenus par hydrolyse acide ou basique du beurre de cacao (Liendo *et al.*, 1997 ; Simoneau *et al.*, 1999 ; Torres-Moreno *et al.*, 2015). Le beurre de cacao représente 13.69 mg/ g de poudre de cacao. La plupart des travaux montrent que le beurre de cacao constitué de 95% d'acides gras qui sont les acides oléique, palmitique et stéarique. C'est la composition particulière des triglycérides du beurre de cacao qui lui confère une plage de fusion qui va donner aux chocolats ses caractéristiques de fusion intéressante dans la bouche.

II.2.2.4. Glucides

L'amidon est l'hydrate de carbone le plus abondant. Il est présent dans les fèves fraîches et non pas dans le fruit. Les fibres de cacao sont composées de pentosanes, galactanes, mucines contenant de l'acide galacturonique, et de la cellulose. Reineccius *et al.* (1972) ont rapporté que les fèves de cacao non fermentées contiennent 15,8 mg / g de saccharose et des traces de fructose, le sorbose, le mannitol et l'inositol. Berbert (1979) a suggéré la teneur en saccharose à 24,8 mg / g de haricots non fermentés formés d'environ 90% de sucres totaux (27,1 mg / g), avec la réduction de sucres fructose et de glucose formant environ 6% (0,9 et 0,7 mg / g, respectivement) et d'autres (y compris le mannitol et l'inositol) <0,50 mg / g. Les différences ont été attribuées à la méthode, au temps de la récolte, au type et à l'origine des fèves de cacao (Reineccius *et al.*, 1972).

II.2.2.5. Composés phénoliques

Les cotylédons sont composés de deux types de cellules du parenchyme. Plus de 90% des cellules sont de petite taille et contiennent le protoplasme, des granules d'amidon, des grains d'aleurone et des globules gras. Les cellules plus grandes sont dispersées et contiennent l'ensemble des composés phénoliques et les purines. Ces cellules pigmentaires représentent 11 à 13% du tissu et contiennent des anthocyanines. Trois groupes de phénols sont présents dans la fève de cacao : leucoanthocyanines (environ 58%), catéchines (environ 37%) et anthocyanines (environ 4%). La catéchine principale est la (-) – épicatechine. Les autres catéchines sont les (+) - catéchine, (+) - gallocatéchine et (-) - epigal-ocatechine. La fraction anthocyanes se compose essentiellement de cyanidine-3-arabinoside et cyanidine-3- galactoside (Belitz *et al.*, 2009).

II.2.2.6. Acides organiques

Dans la pulpe de cacao non fermentée, les acides présents sont l'acide citrique (44-45 mg/g), l'acide malique (7-8 mg/g) et l'acide succinique (5-6 mg/g). Sur les fèves fermentées, une concentration de (13-14 mg/g) d'acide citrique, (1-2 mg/g) d'acide malique et (7-8 mg/g) d'acide oxalique a été détectée (Ho *et al.*, 2014). Parmi les acides organiques (1,2 à 1,6%) détectés sur les fèves fermentées et torréfiées et qui contribuent au goût de cacao, on trouve les acides citrique, acétique, lactique, succinique et l'acide malique. Les acides acétique et lactique sont formés pendant la fermentation. L'acide citrique est présent naturellement dans la pulpe. La quantité d'acide acétique libérée par la pulpe et retenue par les cotylédons dépend de la durée de la fermentation et de la méthode de séchage utilisée. Les fèves contiennent 1,22 à 1,64%

d'acides totaux, 0,79 à 1,25% d'acides volatils dont 0,19 à 0,71% d'acide acétique (Belitz *et al.*, 2009).

D'autres travaux ont montré que les concentrations d'acides trouvées sur des fèves fermentées et séchées varient de 1,3 à 11,8 g/kg pour l'acide acétique, 1,6 à 9,9 g/kg pour l'acide citrique, de 0,6 à 11,1 g/kg pour l'acide lactique et de 2,1 à 6,5 g/kg pour l'acide oxalique (Holm *et al.*, 1993).

II.2.2.7. Composés volatils

Les arômes du cacao dépendent essentiellement des traitements post-récolte et cet aspect sera traité dans la section II.4.3. Aromes du cacao.

II.3. Production mondiale du cacao

La production mondiale du cacao a été d'environ 4,1 millions de tonnes en 2013. Le cacao est devenu un produit d'exportation vital pour de nombreux pays, principalement l'Afrique qui produit environ 72% du cacao mondial. Le cacao constitue également une source de devises pour certains pays d'Amérique latine (16%) ainsi que d'Asie et l'Océanie (12%) (Figure 10). Cette production mondiale est répartie comme suit : Côte d'Ivoire (37%), Ghana (21%), Indonésie (10%), Nigéria (5%), Brésil (4%), Cameroun (5%) et Équateur 4% (ICCO, 2014) (Figure 10). Plus de 80 % du cacao mondial est produit par les petits planteurs, il fournit de l'emploi à de nombreuses communautés rurales. Environ 3,5 millions de personnes produisent actuellement 3,5 millions de tonnes en moyenne par an.

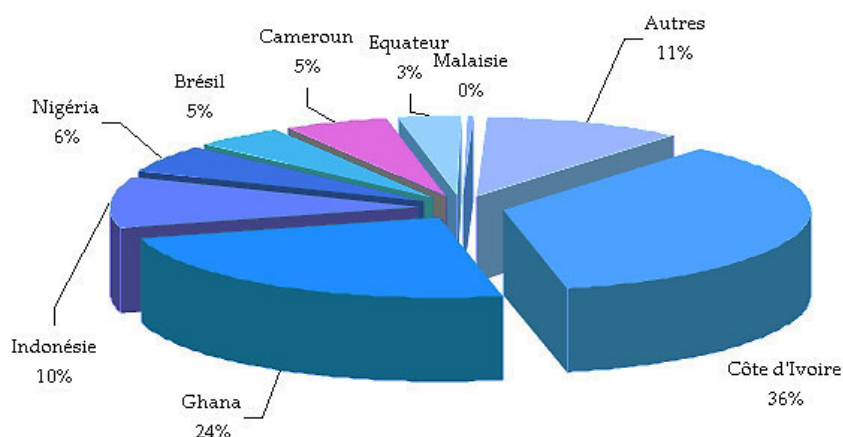


Figure 10 : Principaux pays producteurs de cacao

(Conférences des Nations Unies sur le Commerce et le Développement, CNUCED)

II.4. Récolte et traitement post-récolte du cacao

II.4.1. Récolte des cabosses

Les cabosses de cacao mûrissent généralement tout au long de l'année, le ramassage se pratique presque sur toute l'année, mais en réalité la grande récolte s'effectue d'octobre à décembre, principalement en Afrique de l'Ouest. La récolte des cabosses est essentiellement pratiquée par les hommes, car détacher le fruit de l'arbre est un travail laborieux et délicat qui nécessite de l'habileté et de la force (Bouet *et al.*, 1977). Les cabosses qui se trouvent autour des troncs sont coupées à la main ou à l'aide d'une machette, et celles qui entourent les branches supérieures nécessitent l'utilisation d'une petite faucille double tranchante au bout d'une perche (Beckett, 2009).

La cueillette doit de faire toutes les 2-4 semaines, car la récolte fréquente réduit les pertes dues aux rats, écureuils, singes, papillons foreurs et les diverses maladies de pourriture des cabosses (Bouet *et al.*, 1977). Les cabosses doivent idéalement être récoltées à maturité car si elles sont immatures, la biosynthèse de la matière grasse n'est pas achevée et celle de la pulpe n'est pas complète. Si les cabosses sont trop mûres, elles commencent à sécher et cela conduit à une mauvaise fermentation de la pulpe (Barel, 2013).

II.4.2. Traitement post-récolte du cacao

Le traitement post-récolte du cacao représente l'ensemble des opérations technologiques permettant d'obtenir le cacao marchand à partir des fèves de cabosses récoltées.

II.4.1.1. Écabossage

Une fois la récolte terminée, les cabosses sont immédiatement écabossées ou bien stockées pour quelques jours chez certains producteurs dans le but de permettre aux cabosses immatures d'achever leur maturation (Barel, 2013). Le temps écoulé entre la récolte et l'écabossage est appelé le « délai de stockage ». L'écabossage est l'opération qui consiste à ouvrir les cabosses pour libérer les graines soit en coupant avec une machette soit en frappant la cabosse contre le sol ou à l'aide d'un gourdin en bois qui provoque l'éclatement de la cabosse (Figure 11). L'utilisation de la machette risque d'endommager les graines, créant des blessures favorisant la pénétration des micro-organismes. Pour cette raison, il est recommandé de frapper la cabosse à l'aide d'un gourdin en bois (Barel, 2013).



Figure 11 : Écabossage du cacao

(<http://www.tentation-chocolat.eu/2012/12/que-fait-on-des-cabosses-apres-la-recolte/>)

II.4.1.2. Fermentation

La fermentation est une étape primordiale du traitement post-récolte. Elle dure de 2 à 8 jours et cette durée dépend de la variété du cacao et des pratiques agricoles (De Vuyst *et al.*, 2010). Elle induit un ensemble de réactions biochimiques qui ont lieu dans la pulpe et au centre des cotylédons sous l'action des micro-organismes contaminant la pulpe et les fèves de cacao lors de l'ouverture soit par simple contact des mains des agriculteurs ou par le matériel utilisé. L'opération de fermentation a trois buts principaux ; éliminer le mucilage par l'action microbienne, provoquer la mort de l'embryon pour empêcher la germination et enfin déclencher les réactions biochimiques dans les cotylédons pour former les précurseurs d'arômes (Schwan and Wheals, 2004).

Le processus de fermentation peut être décrit par deux phases principales, faisant intervenir des flores microbiennes, des températures et des degrés d'oxydation différents. La première transformation qui a lieu dans la pulpe est celle des sucres en alcool (sous l'action des levures ou fermentation alcoolique). Pendant la seconde phase, l'éthanol est oxydé en acide acétique (fermentation acétique réalisée par les bactéries du même nom), qui en diffusant dans les fèves provoque la mort du germe et l'activation d'enzymes endogènes importantes pour la production des précurseurs d'arômes. La fermentation est donc l'œuvre de plusieurs microorganismes.

a- Les communautés microbiennes associées à la fermentation

Divers travaux ont décrit la succession des groupes microbiens pendant les différentes étapes de la fermentation des fèves de cacao. Ils ont observé que les levures sont les premiers types de microorganismes à se développer (J1 à J2) suivies par les bactéries lactiques (LAB), auxquelles succèdent les bactéries acétiques (AAB) qui sont remplacées par des bacilles sporulés aérobies en fin de fermentation. La succession des micro-organismes durant la fermentation est le reflet de l'évolution de la nature du milieu de fermentation, de la composition chimique du cacao (pulpe et fèves). En effet, les relais de flores microbiennes précédemment décrits n'ont lieu que si l'aération du milieu est suffisante, conduisant à un profil de température et de pH (4.5) adéquat au développement des différentes familles de microbes (Biehl *et al.*, 1989).

➤ *Les levures*

La fermentation alcoolique se déroule au cours des deux premiers jours de fermentation : les levures sont les micro-organismes dominants. Elles transforment les sucres (saccharose, glucose et/ou fructose) en alcool éthylique avec un dégagement de gaz carbonique. Cette réaction a lieu dans des conditions d'anaérobiose (due à la densité de la pulpe qui empêche l'air de s'infiltrer entre les fèves) et acide (pH = 3,5 du à la présence d'acide citrique dans la pulpe). Certaines levures possèdent une bonne activité pectinolytique qui hydrolyse le mucilage des fèves entraînant la liquéfaction de la pulpe (Schwan *et al.*, 1997 ; Crafacck *et al.*, 2013). Pendant cette phase la charge maximale de levures varie de 6 à 8 logs UFC/g de cacao (Nielsen *et al.*, 2007 ; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007).

Cette fermentation alcoolique est moyennement exothermique (93,3 kJ avec une élévation de la température jusqu'à 35-40°C après 48h) et s'accompagne d'une légère augmentation du pH qui peut être due à la consommation de l'acide citrique par les levures. Des études menées sur des fèves fermentées ont montré que les levures du genre *Hanseniaspora* sont les plus fréquemment isolées durant la phase initiale de la fermentation (Ardhana and Fleet, 2003; Nielsen *et al.*, 2005 ; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007, 2008 ; de Melo Pereira *et al.*, 2013). Dans ce genre *Hanseniaspora guilliermondii* est l'espèce la plus fréquemment isolée du cacao fermenté du Ghana (Nielsen *et al.*, 2005, 2007 et 2008). *Hanseniaspora opuntiae* a été également isolée (Papalexandratou *et al.*, 2013). *Saccharomyces cerevisiae* est aussi impliquée dans la fermentation du cacao provenant de différentes régions : Indonésie (Ardhana and Fleet 2003), Brésil (de Melo Pereira *et al.*, 2013), République Dominicaine (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007). D'autres espèces sont également détectées dans le cacao fermenté comme *Kloeckera apis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida zemplinina*,

Candida diversa, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranifaciens* qui jouent un rôle dans la fermentation alcoolique (Ardhana and Fleet, 2003; Nielsen *et al.*, 2005; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007, 2008 ; de Melo Pereira *et al.*, 2013).

➤ *Les bactéries lactiques (LAB)*

Les conditions micro-aérophiles, le milieu acide (pH = 4) et la disponibilité des substrats favorisent en premier lieu le développement des bactéries lactiques qui atteignent une croissance qui varie de 7 à 7,8 log UFC/g de fèves de cacao (Nielsen *et al.*, 2007 ; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007). Les études montrent que les bactéries lactiques les plus fréquemment retrouvées dans le matériel végétal sont *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* suivies de *Leuconostoc pseudomesenteroides* (Camu *et al.*, 2007 ; Lefeber *et al.*, 2011 ; Papalexandratou *et al.*, 2011a, 2011b et 2013). D'autres espèces de LAB du genre *Fructobacillus*, *Enterococcus* et *Weissella* (Camu *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2011b) ont aussi été détectées dans le cacao fermenté.

Les LAB convertissent l'acide citrique et les sucres de la pulpe en acide lactique parfois en acide acétique et en éthanol dans le cas d'une fermentation hétérolactique. L'acide lactique synthétisé, pénètre à l'intérieur des fèves pour y rester définitivement du fait de sa très faible volatilité. L'acidité des cotylédons augmente donc, générant des arômes désagréables et des fèves finales de moindre qualité (Passos *et al.*, 1984). Ce type de fermentation est donc indésirable.

L'assimilation de l'acide citrique par les LAB génère une légère élévation du pH et de la température de la pulpe (Camu *et al.*, 2007), ceci, associé au taux d'éthanol et d'oxygène qui ne cesse d'augmenter, permet de démarrer la seconde phase de la fermentation des fèves, dirigée par les bactéries acétiques.

➤ *Les bactéries acétiques (AAB)*

Ces micro-organismes transforment par oxydation l'éthanol en acide acétique. Cette réaction très exothermique (496 kJ par molécule d'éthanol transformée) s'accompagne d'une forte élévation de la température (jusqu'à 50°C). La charge microbienne maximale des AAB sur les fèves de cacao varie de 7,8 à 8 logs UFC/g (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007). L'acide acétique produit dans ces conditions aérobies est un métabolite clé pour le processus de fermentation des fèves de cacao. Cet acide pénètre dans les fèves et provoque, avec la haute température générée par l'oxydation de l'alcool, la mort de l'embryon et la destruction des cellules internes. Ceci marque la fin de la fermentation et initie les changements biochimiques

dans les fèves, menant à la formation de molécules, précurseurs des arômes caractéristiques du cacao (Nielsen *et al.*, 2005 ; Camu *et al.*, 2007 ; Thompson *et al.*, 2007). Ces propriétés sont ensuite développées durant le séchage et la torréfaction. Des brassages réguliers de toute la masse des fèves sont nécessaires pour favoriser l'aération et obtenir une fermentation homogène. Le rythme le plus généralement adopté est d'un brassage après 24 heures de fermentation puis toutes les 48 heures.

Le plus souvent les bactéries acétiques trouvées dans les fèves fermentées appartiennent au genre *Acetobacter* dont *A. pasteurianus* est l'espèce la plus dominante. D'autres espèces d'*Acetobacter* (*A. syzygii*, *A. ghanensis*, *A. senegalensis*, *A. tropicalis*) constituent les communautés de AAB généralement identifiées à partir du cacao (Camu *et al.*, 2007; Papalexandratou *et al.*, 2011a, 2011b, 2013). Lefeber *et al.* (2011) ont montré que les AAB sont présentes seulement à la fin de la fermentation alors que Papalexandratou *et al.* (2011b) remarquent que *A. senegalensis* est présente au début de fermentation. *A. syzygii*, *A. pasteurianus* et *A. tropicalis* sont prédominantes durant toute la fermentation (Nielsen *et al.*, 2007).

➤ *Autres bactéries*

Lorsque la fermentation se prolonge, les conditions du milieu fermentaire évoluent vers un épuisement des substrats microbiens et l'aération reste importante. De nouvelles populations de bactéries peuvent alors se développer, en particulier les bactéries sporulées, qui produisent un certain nombre de molécules influençant l'arôme final.

C'est le cas par exemple des espèces du genre *Bacillus*. Ces bactéries thermophiles n'ont pas la possibilité de se multiplier en début de fermentation ; par contre après les premières étapes (montée du pH et de la température, modification de la teneur en sucres et disponibilité en oxygène), elles peuvent devenir prédominantes dans la flore des fèves en fin de fermentation. Parmi les espèces observées dans le cacao fermenté on note *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus coagulans*. Cependant, leur rôle dans le processus de fermentation n'est pas connu (Ardhana and Fleet, 2003). *Bacillus licheniformis* est détecté dans la dernière phase de fermentation de cacao du Ghana (Nielsen *et al.*, 2007).

Des bactéries non sporulées sont également détectées dans les fermentations du cacao, comme la famille des *Enterobacteriaceae* : *Tatumella*, *Erwinia* et *Pantoea sp* (Papalexandratou *et al.*, 2011a ; Lefeber *et al.*, 2011).

b- Essais de maîtrise de la fermentation du cacao

La fermentation du cacao est une opération entièrement naturelle et spontanée. Par conséquent l'action des micro-organismes est aléatoire et pas forcément toujours maîtrisée.

Au niveau des micro-organismes à potentialité de starters, quelques informations tirées de travaux antérieurs sont disponibles. Des essais d'inoculation avec des souches de levures sélectionnées ont été réalisés. Ceux-ci démontrent que l'utilisation de certaines souches peut conduire à une modification de la qualité du cacao. Par exemple, Schwan *et al.* (1997) ont montré qu'en utilisant des souches de levures à forte capacité pectinolytique, la dégradation de la pulpe, l'aération de la masse fermentaire et la dégradation protéique des fèves ont été accélérées, générant ainsi des fèves finalement moins acides et donc de meilleure qualité. Concernant la flore bactérienne, peu d'informations existent. Les causes d'une déviation de la fermentation vers une fermentation lactique ne sont pas identifiées jusqu'à présent. Ce manque de connaissances scientifiques sur ce point se révèle être un véritable problème, tant technique qu'économique, pour les producteurs de cacao.

Des essais d'inoculation avec des mélanges microbiens (starters contenant des levures et/ou des bactéries) ont également été effectués (Lefebvre *et al.*, 2010, 2012; Craack *et al.*, 2013; Kresnowati *et al.*, 2013). Les souches utilisées ne semblent pas toujours présenter des capacités supérieures à celles des souches indigènes, sans doute mieux adaptées aux conditions particulières que constituent les fèves de cacao et leur environnement. L'amélioration de ces starters reste un champ de recherche à explorer pour maîtriser les différentes phases de la fermentation des fèves de cacao et pour la recherche d'une homogénéisation et du raccourcissement du temps de fermentation.

c- Techniques de fermentation

Les fermentations les plus couramment utilisées sont réalisées en tas, en caisses ou en paniers (Guehi *et al.*, 2010 ; Papalexandratou *et al.*, 2011a ; Bankoff *et al.*, 2014).

 Fermentation en tas

Au cours de cette fermentation, les fèves de cacao sont placées sur des feuilles de bananiers et recouvertes par celles-ci (Figure 12). Cette pratique concerne environ 60% du cacao produit. L'avantage de cette technique est de diminuer le nombre de brassage, car elle assure de bons échanges gazeux entre les fèves et le milieu extérieur, par contre elle ne protège pas les fèves contre les variations de température (Barel, 2013).



Figure 12 : Fermentation en tas du cacao (<http://www.confectionerynews.com/Commodities/Improved-chocolate-quality-with-controlled-cocoa-fermentation-says-Barry-Callebaut>)

Fermentation en caisses

Elle se fait dans des caisses en bois (Figure 13) ou des caisses en plastique (Guehi *et al.*, 2010). La fermentation dans ces dernières n'est pas très fréquente, car elle produit un nombre élevé de fèves mal fermentées par rapport aux deux autres méthodes (en tas et caisses en bois). Le cacao fermenté dans des caisses en bois perforées est généralement de bonne qualité car les caisses présentent une bonne isolation thermique, indispensable au bon déroulement de la fermentation (Barel, 2013).



Figure 13 : Fermentation en caisse du cacao (<http://tejaschocolate.com/howcraftchocolateismade/>)

Fermentation en panier

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

Fermentation en plate-forme

Le procédé de la plate-forme est considéré comme une méthode obsolète (Doyle *et al.*, 2001) mais en raison de ses faibles coûts, il est encore largement utilisé, par exemple en Afrique de l'Ouest (Lainé, 2001). Cette technique produit un taux de fermentation faible, probablement pour cette raison, il a été historiquement appliqué sur les fèves Criollo, qui nécessitent une courte fermentation (environ 2 ou 3 jours), mais il est considéré comme inapproprié pour la variété Forastero, car elle nécessite une durée de fermentation plus longue (de 5 à 8 jours). La fermentation en plate-forme favorise la croissance des moisissures indésirables et le développement consécutif de saveurs non souhaitées. (Doyle *et al.*, 2001).

II.4.1.3. Le brassage

Le brassage constitue le système d'aération des fèves de cacao en fermentation (Figure 14), et représente un facteur important pour le bon déroulement de celle-ci.

Le brassage permet une augmentation rapide de la température, entraînant une amélioration très nette de la qualité marchande du cacao. L'aération est aussi indispensable à la multiplication des microorganismes qui jouent un rôle important dans la fermentation.



Figure 14 : Techniques de brassage au cours de la fermentation du cacao

(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/cacao.htm>)

La durée de la fermentation est très variable. Elle dépend du type du cacaoyer, des conditions climatiques, de l'importance de la masse de cacao en fermentation, de la méthode utilisée. On apprécie le moment opportun pour arrêter la fermentation d'après des critères subjectifs : gonflements des fèves, odeur de la masse, couleur des cotylédons, chute de la température. Tout cela demande expérience et pratique. Il faut compter 5 à 7 jours en moyenne.

II.4.1.4. Séchage

a) Définition

Après l'étape de fermentation, les fèves de cacao sont mises à sécher. Le séchage est la deuxième opération cruciale dans le traitement post-récolte du cacao (Barel, 2013). Le but du séchage est de diminuer la teneur en eau dans les fèves fermentées d'environ 50-60% à 8% (Djedjro *et al.*, 2008), ce qui va bloquer les réactions enzymatiques et éviter le développement de moisissures. Cette étape va ainsi permettre la bonne conservation du cacao marchand ainsi obtenu. La température de séchage doit être inférieure à 60°C. Deux méthodes de séchage sont observées dans le monde du cacao : le séchage solaire ou naturel et le séchage artificiel.

b) Modes de séchage

➤ Séchage naturel

En général, le séchage solaire est le procédé le plus utilisé par les producteurs qui fournissent la presque totalité de la production mondiale (Djedjro *et al.*, 2008). La durée moyenne de séchage est de 8 à 15 jours. Ce procédé s'effectue sur différents dispositifs (claie, tôle, bâche, aire cimentée, bitume). L'utilisation de la claie comme aire de séchage contribue à obtenir un cacao plus propre (Kouakou *et al.*, 2013). Le séchage naturel présente l'avantage de s'effectuer sans dépense d'énergie et de favoriser l'évaporation de l'acide acétique produit au cours de la fermentation (Barel, 1998). Il est admis que les réactions biochimiques se poursuivent pendant les premiers jours de l'opération. Le séchage solaire présente cependant l'inconvénient de nécessiter d'importantes surfaces pour l'étalage des fèves et la main d'œuvre pour les brassages réguliers de la masse. De plus, il est très dépendant des variations climatiques du moment. Quand les précautions ne sont pas prises, des reprises d'humidité ont lieu et les fèves moisissent.

➤ Séchage artificiel

Ce séchage est réalisé en utilisant un four avec ventilation d'air chaud (Hii *et al.*, 2009). Il ne concerne que 10% du cacao produit (Barel, 2013). Il est utilisé lorsque les conditions climatiques sont défavorables (région humide ou zones moins ensoleillées) ou pour les grandes quantités de fèves. Cette méthode est surtout exploitée par les coopératives. L'inconvénient majeur est la rétention des acides volatils et une consommation élevée d'énergie. Les différences de tension de vapeur et de diffusion entre l'eau et l'acide acétique observées aux températures du séchage artificiel (à partir de 45°C) font que l'eau s'évapore de la fève en premier lieu, déposant des substances dissoutes en périphérie en créant ainsi une barrière qui

s'oppose au départ de l'acide acétique (Jacquet *et al.*, 1980). Ce type de séchage est le principal responsable de la forte acidité volatile des cacaos.

Notons que les séchoirs artificiels sont souvent mal utilisés. En effet, il est indispensable de laisser le temps aux fèves de sécher. Un séchage trop rapide ne permet pas une bonne élimination de l'acide acétique, l'eau étant extraite trop rapidement. De nombreuses études qui comparent les méthodes de séchage naturel et artificiel concluent que le séchage au soleil naturel donne le meilleur résultat (Bonaparte *et al.*, 1998 ; Zahouli *et al.*, 2010).

II.4.1.5. Stockage

Le stockage des fèves en zone de production est une opération très délicate, car la moindre contamination par des moisissures affecte la qualité finale du produit. Les fèves doivent être stockées dans des bonnes conditions en évitant la chaleur et l'humidité de l'air qui favorisent le développement des moisissures et des insectes (Barel, 2013).

Pour certains producteurs, le stockage des fèves de cacao séchées se fait généralement dans des sacs de jute de 60 à 65 kg. Ceux-ci sont solides, mais permettent une reprise de l'humidité. Ils peuvent être empilés les uns sur les autres et ils sont également biodégradables. Pour un stockage adéquat, la teneur en humidité de fèves ne devrait pas dépasser 6 ou 7%, au-delà de 8% le risque du développement des moisissures existe. Au-dessous de 5%, les fèves sont très cassantes. La durée de stockage est indéterminée et variable selon les producteurs.

A l'expédition, Les sacs sont transportés dans les cales des navires avec une bonne ventilation pour évacuer l'air humide (Cook, 1982 ; Beckett, 2009).

II.5. Généralités sur les arômes des aliments/Saveurs

L'arôme joue un rôle important dans la consommation et l'acceptation d'un aliment : c'est un facteur déterminant de la qualité marchande. L'arôme des aliments peut être perçu par le nez, soit directement à travers la cavité nasale ou rétronasale. L'interaction entre le goût, l'odeur et la texture d'un aliment est appelé «flaveur». La flaveur englobe donc le goût et l'arôme (Belitz *et al.*, 2009).

L'arôme est composé d'un ensemble de substances qui existent dans la nature sous forme de mélanges complexes de composés volatils. Ces composés sont issus de différents groupes qui peuvent avoir des structures simples comme dans le cas des alcools ou complexes comme certains composés organiques hétérocycliques (Figure 15). Les principaux groupes de composés aromatiques ont été identifiés comme étant des acides, des alcools, des aldéhydes, des esters, des furanes, des cétones, des terpènes, des pyrazines, des pyrroles, des pyranes, des

pyridines et des composés de soufre (Paul and Jeanne, 1981 ; Belitz *et al.*, 2009). La plupart des groupes constituant les composés aromatiques confèrent les caractéristiques particulières de la flaveur. La plupart des esters confèrent une saveur fruitée ou fleurie aux aliments. Les pyrazines donnent habituellement une saveur de rôti et pomme de terre aux aliments. D'autres composés volatils présents à des concentrations inférieures à leurs seuils d'odeur dans les aliments peuvent contribuer à la formation d'arôme, en raison d'interactions avec d'autres composés aromatiques (Belitz *et al.*, 2009).

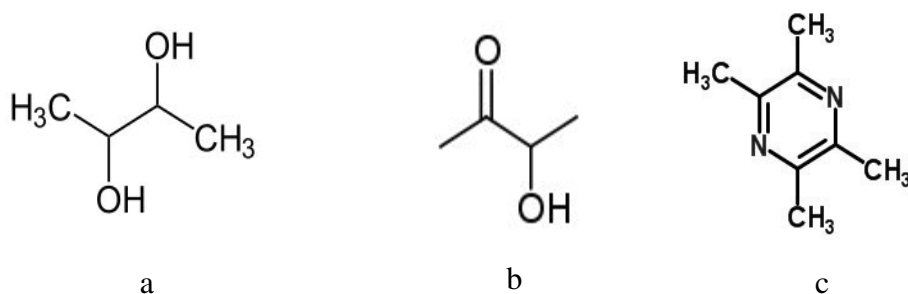


Figure 15 : Structure chimique de quelques composés d'arôme du cacao.

(a) : 2,3 butanediol, (b) : acétoïne (3-hydroxybutanone), (c) : tétraméthylpyrazine

Un total de 7100 composés ont été identifiés dans la fraction volatile de 450 aliments (Nijssen, 1996 ; Belitz *et al.*, 2009). Malgré ce grand nombre de matières volatiles identifiées, seul un nombre limité contribue aux caractéristiques sensorielles de chaque aliment. Ces composés qui décrivent uniquement la qualité aromatique d'un aliment sont appelés « les composés volatils d'impact » ou « odorants clés » (Chang, 1989). Après l'identification des premiers composés d'arôme d'impact : benzaldéhyde (amande, cerise), vanilline (vanille) et l'aldéhyde cinnamique (cannelle) (Pickenhagen, 1999), de nombreux autres composés ont également été identifiés. Des exemples de ces composés sont énumérés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Quelques exemples de composés volatils clés du cacao

(Afoakwa *et al.*, 2009; Belitz *et al.*, 2009)

Composés	Arômes
(R)-Limonène	Agrumes
Trans-5-Méthyle-2-heptan-4-one	Noix
2-Furfurylthiol	Café, torréfié
Geosmine	Terreux, betteraves
2-Ethanol de phényle	Caramel, miel
2-méthylbutanal	Chocolat
2-Butenal-2-phényle	Cacao, torréfié

II.5.1. Impact des composés volatils sur l'arôme

L'arôme est fourni par un mélange de composés dont une grande partie ne possède pas le caractère de saveur de l'aliment. L'arôme de cacao et de ses produits dérivés comme le chocolat par exemple est fourni par un mélange de composés issus de différents groupes (Paul and Jeanne, 1981 ; Nijssen, 1996 ; Schnermann and Schieberle, 1997 ; Owusu *et al.*, 2012).

Il est également connu que la grande majorité des composés volatils qui ont été isolés à partir d'extraits aromatiques naturels ne possèdent pas eux-mêmes les qualités rappelant la saveur de l'aliment, comme le n-hexanal, un composé volatil connu du jus de pomme naturel. Lorsqu'il est extrait du jus et senti, il donne une saveur d'huile verte et rance. Mahattanatawee *et al.* (2005) ont également observé que les arômes de carambole, de goyave et de mangue mûre ne sont pas produits uniquement par un composé volatil mais par une combinaison d'esters, d'aldéhydes, d'alcools et des cétones qui donnent l'arôme du fruit. De même, la flaveur de cacao et de chocolat se compose d'un certain nombre de différents composés volatils et non pas d'un seul composé qui peut définir l'arôme vrai du cacao ou du chocolat. Des mélanges de plusieurs molécules aromatiques ont été étudiés dans le but de produire un arôme semblable à celui du chocolat. Van Praag *et al.* (1968) ainsi que Lopez and Quesnel (1974) ont montré que le mélange du 3-méthylbutanal avec le triméthyl et le disulfure donne une odeur semblable à celle du cacao, Van Elzakker et Van Zutphen, (1961) ont observé qu'aucune des 12 substances odorantes isolées après distillation sous vide du beurre de cacao a une odeur analogue au cacao. L'interaction entre les composés aromatiques a été signalée et peut avoir un rôle important dans la contribution de l'arôme d'un aliment en particulier. L'expression de certains composés aromatiques est connue pour être favorisée par rapport à d'autres composés.

Le concept d'«impact des composés volatils» est bien applicable dans quelques cas exceptionnels, mais dans la plupart des aliments, l'odeur est assurée par l'effet de dépendance ou de l'association d'un certain nombre de composés.

II.5.2. Sources des composés aromatiques

L'origine des composés aromatiques dans les aliments est très diverse. Elle peut provenir des matières végétales ou animales brutes, ou résultent des réactions microbiennes et /ou des processus technologiques qui font partie de la production alimentaire. Ainsi, la nature des composés aromatiques de tout produit alimentaire est susceptible de changer au cours des traitements.

a) Composés aromatiques formés par voies de biosynthèse des plantes

Peu de composés aromatiques naturels des plantes sont connus, mais la plupart se forme suite à des réactions de dégradation. L'arôme typique de fruits n'est pas présent initialement au cours du développement du fruit, mais se développe au cours de la courte période de maturation, phase à laquelle les enzymes attaquent divers substrats conduisant à la formation d'un certain nombre de composés aromatiques, dont beaucoup ont des propriétés sensorielles importantes (Reineccius, 2006). L'arôme fruité-fleuri retrouvé dans les fruits mûrs provient généralement d'esters mais aussi dans certains cas d'aldéhydes, d'alcools, de cétones ou d'autres groupes de composés aromatiques (Reineccius, 2006 ; Belitz *et al.*, 2009).

b) Composés aromatiques formé lors de la fermentation

La fermentation est l'un des procédés par lesquels les composés volatils d'arôme sont produits dans les aliments comme les saucisses, yaourts, fromages, bières, pains, vins et la sauce de soja. L'arôme peut être développé à partir du métabolisme primaire des micro-organismes telle que la fermentation du cacao (Rodriguez-Campos *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012). En utilisant des substrats spécifiques, les micro-organismes peuvent effectuer de nombreuses réactions telles que les oxydations, les réductions, les réactions d'hydrolyse, la formation de nouvelles liaisons carbone-carbone et leur dégradation pour produire l'Arôme. Cependant, de nombreux travaux ont démontré la production de certains composés aromatiques par les micro-organismes. Les bactéries et les levures sont les plus impliquées dans l'élaboration des précurseurs d'arôme au cours de la fermentation des aliments (cacao, café, vins, fromages, etc.). Les levures produisent des alcools et également des esters en particulier les acétates d'esters par l'action des alcools acétyltransférases. Plata *et al.* (2003) et Löser *et al.*, (2013) ont montré la forte production d'acétate d'esters et d'acétate d'isoamyle dans le vin par *Kloeckera apiculata*, *Hansenula subpelliculosa*, et *Kluyveromyces marxianus*. Les bactéries produisent essentiellement des acides volatils comme l'acide acétique par les AAB dans la fermentation du cacao (Camu *et al.*, 2007; Sengun and Karabiyikli, 2011; Matsutani *et al.*, 2013; Moens *et al.*, 2014). D'autres bactéries comme *Clostridium butyricum* produit l'acide butyrique au cours de la fermentation des sucres. Des études ont montré que les LAB produisent des aldéhydes à partir des acides aminés au cours des fermentations lactiques plus particulièrement sur les fromages (Bonnarme *et al.*, 2004 ; Smit *et al.*, 2005). Groot and de Bont. (1998,1999) ont montré la production du benzaldéhyde à partir de la phénylalanine par les LAB.

Les pyrazines sont des composés aromatiques typiques des aliments chauffés, auxquels elles donnent une saveur de noisette, par exemple dans les noix rôties, le café, le cacao, les viandes.

Normalement, ces composés sont formés par la réaction de Maillard mais quelques-uns sont produits par voie microbienne comme la 2,5-diméthylpyrazine et la tétraméthylpyrazine qui sont produites par *Bacillus* (Kosuge *et al.*, 1971; Larroche *et al.*, 1999). D'autres composés comme les terpènes qui sont des composés caractéristiques des huiles essentielles, sont élaborés par des champignons appartenant aux ascomycètes et aux basidiomycètes, par exemple le genre *Cerutrcystis* (Janssens *et al.*, 1992).

c) Composés aromatiques formés lors des réactions de Maillard

Une source précieuse de composés aromatiques des aliments est générée par chauffage lors des réactions de Maillard. Ce sont des réactions non-enzymatiques impliquant des sucres réducteurs et des acides aminés ou des peptides. Après le chauffage de l'aliment, divers composés aromatiques sont formés dont les pyrazines, les pyrroles, les furannes et les thiazoles. Les réactions conduisent également à la formation des pigments bruns qui sont souhaitables en particulier dans les aliments qui sont cuits au four, le rôti par exemple (Krysiak, 2006 ; Belitz *et al.*, 2009). Des facteurs tels que le pH, la température et l'activité de l'eau peuvent affecter la réaction et le développement d'arôme (Wolfrom *et al.*, 1974 ; Van Boekel, 2006 ; Belitz *et al.*, 2009).

II.5.3 Aromes du cacao

II.5.3.1. Généralités

Les composés volatils qui donnent l'arôme si particulier du chocolat ne sont pas tous présents au départ dans le fruit du cacaoyer. C'est au cours des différentes étapes de transformation de la fève de cacao que les arômes se développent. Certaines familles de molécules apparaissent au début du processus, d'autres sont synthétisées dans les fèves. L'arôme du cacao est largement dépendant de la variété, de la récolte, de la fermentation, du séchage et de la torréfaction. Les fèves fraîches de cacao contiennent initialement quelques composés d'arôme qui varient en fonction de leur variété et de leur zone de production. Les familles chimiques les plus importantes tant qualitativement que quantitativement dans les fèves fraîches sont les esters, les alcools et les acides. Ces composés sont souvent caractérisés par des odeurs florales, douces et vertes. La composition de cette fraction varie cependant en fonction de la variété de cacao étudiée et en fonction des paramètres de la récolte comme la maturité ou le temps de stockage des cabosses.

Ho *et al.* (2014) ont montré que les composés alcooliques sont peu détectables dans les fèves fraîches par rapport aux aldéhydes et cétones, alors que les esters ne sont pas détectables.

Afoakwa *et al.* (2009) ont identifié certains composés volatils issus de fèves fraîches de cacao et qui font partie des groupes des aldéhydes et des cétones comme, le 2 méthyl-1 propanal, pentanal, phénethyl acétaldéhyde, 2- pentanone, phényl méthyl cétone. Un alcool (2-pentanol) et un acide (acide dodecanoïque) ont été également identifiés. L'acétophénone a été décrite comme un composé déjà présent dans les fèves fraîches et elle ne serait pas affectée par la fermentation (Rodriguez-Campos *et al.* 2012). Des composés volatils avec leurs caractéristiques odorantes trouvés dans le cacao et produits dérivés sont répertoriés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Composés volatils avec leurs caractéristiques odorantes trouvés dans le cacao fermenté, torréfié et le chocolat.

Famille	Composés	Perception d'odeur	Références
Aldéhydes et Cétones	1-Propanol-2- méthyle	Malté, chocolat	(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011)
	Pentanal	Amandes	
	2-pentanone	Piquant	
	Phénylacétaldéhyde	Fruit	
	Cétone Phenylméthyl	Miel, fleuri, doux	
	2-Nonanone		(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012 ; Ho <i>et al.</i> , 2014)
	Benzothiazole		(Ho <i>et al.</i> , 2014)
	2,3-Butanédione	Beurre	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ;
	Acétoïne	Beurre, crème	Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011, 2012)
	Acétophénone	Mout, fleuri, amandes, doux	(Serra-Bonvehí, 2005 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011, 2012 ; Ho <i>et al.</i> , 2014)
	2-méthylbutanal	Malté, chocolat	(Serra-Bonvehí, 2005 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	3-méthylbutanal	Malté, chocolat	
	2-Heptanone	Fruité, fleuri	

	2-Buténal-2-phényle	Doux, torréfié	
	2-Buténal-2-méthyle		(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009)
	3-(Méthylthio) propionaldéhyde (methional)	Pommes de terre	
	Heptanal		
	Isobutanal		
	2-Hexenal-2-phényle-5- méthyle		
	Cyclohexanone-4- méthyle	Chocolat	
	2-Cyclopenten-1-one- 3,4,4-triméthyle	Torréfié	
	Benzaldéhyde	Noisette	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ; Ho <i>et al.</i> , 2014)
	Phénylacétaldéhyde	Fleuri, doux, miel	
	Nonanal		
Alcools	1-Pentanol		(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	2-Heptanol	Doux, agrumes	
	Alcool de benzyle	Doux, fleur	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011, 2012)
	1-Propanol	Piquant, bonbon	(Serra-Bonvehí, 2005;Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011, 2012)
	1-Propanol-2-méthyle	Sucré	
	2-Butanol-3-méthyle	Vin	
	2,3-Butanédiol	Malté, amer	
	1,3-Butanédiol		
	2-Phényléthanol	Miel, épicé, rose, lilas	(Ducki <i>et al.</i> , 2008;

			Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011 ; Rodriguez- Campos <i>et al.</i> , 2012; Ho <i>et al.</i> , 2014)
	1-Butanol-3-méthyle	Malté, amer, Chocolat	(Frauendorfer and Schieberle, 2006 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011)
	2-Pentanol	Vert, vert doux	
	Ethanol-1-phényle	Miel, floral	(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	Ethanol-2-phényle	Miel, fleuri	
	1-Butanol		
	3-Butanol-3-méthyle		
	Alcool d'isoamyle		(Ho <i>et al.</i> , 2014)
	2,4-Hexadien-1-ol		(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009)
	Pentanol-3-méthyle		
	3,7-Diméthyl-1,6-octadien-3-ol (linalol)	Fleuri, floral	
Esters	Acétate de phényle		(Ho <i>et al.</i> , 2014)
	Acétate d'isoamyle		
	Acétate-2-méthyle-butyle		
	Acétate-3-méthyle-2-butanol		(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011)
	Acétate-2-phényle		
	Laurate d'éthyle	Feuille, fruité, floral	(Serra-Bonvehí 2005 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011)
	Butanoate d'éthyle-2-méthyle	Fruité	(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	Butanoate d'éthyle-3-méthyle	Fruité	
	Acétate-2-pentyl	Fruité	
	Formate de méthyle		

	Formate d'éthyle		
	Hexanoate d'éthyle		
	Lactate de méthyle	Fruité	
	Décanoate d'éthyle		
	Acétate de benzyle	Floral, jasmin	
	Benzoate d'isoamyle	Baumier, doux	
	Acétate de méthyle	Ananas	(Ducki <i>et al.</i> , 2008 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011, 2012)
	Acétate d'éthyle	Fruit, pomme, banane	
	Acétate d'isobutyle		
	Acétate-3-méthyl-1-butanol		
	Acétate d'éthylphényle	Fruit, doux, miel	(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011, 2012)
	Palmitate d'éthyle	Cireux, vert léger	
	Acétate 2-phenyléthyle	Rose, miel, tabac, fleuri	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011, 2012)
	Octanoate d'éthyle	Fruité, fleuri	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012 ; Ho <i>et al.</i> , 2014)
	Cinnamate d'éthyle	Doux, cannelle	
	Formate d'éthylbenzoyl		(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009)
	Benzoate d'éthyle		
	Acétate	Astringente, vinaigre	
Acides	Acide butanoïque	Rance, fromage, sueur	(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> ,
	Acide heptanoïque	Rance, aigre	(Frauendorfer and Schieberle 2006 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	Acide undecanoïque	Rance, gras	(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	Acide dodecanoïque	Métal	
	Acide Acétique	Aigre, vinaigre	(Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	Acide propanoïque	Piquant, rance	(Frauendorfer and Schieberle, 2006 ;
	Acide isobutyrique	Rance, beurre	
	Acide nonanoïque	Vert, gras	

			Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011)
	Acide isovalérique	Sueur, rance	(Serra-Bonvehí, 2005 ;
	Acide hexanoïque	Sueur, piquant	Rodriguez-Campos <i>et al.</i> ,
	Acide octanoïque	Sueur, gras	2011, 2012)
Pyrazine	2, 3,5-Triméthylpyrazine	Cacao, torréfié	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2011)
	2, 3, 5,6-Tétraméthylpyrazine	Torréfié, chocolat	
	Tétraméthylpyrazine	Café au lait, torréfié, chocolat	
	2,3-Diméthylpyrazine	Caramel, cacao	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ;
	2, 3,5-Triméthyl-6-éthylpyrazine	Bonbon, doux	Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	Méthylpyrazine	Noisette, vert	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009)
	2,5-Diméthylpyrazine	Torréfié, cuit	
	2,6-Diméthylpyrazine	Torréfié, cuit	
	Ethylpyrazine	Noisette, torréfié	
	2-Ethyl-5(or 6)-méthylpyrazine	Cacao, torréfié, vert	
	2-Ethyl-3-méthylpyrazine	Noisette, rôti	
	2-Ethenyl-6-méthylpyrazine	Torréfié, fumé	
	3(or 2) ,5-Diméthyl-2(or 3)-éthylpyrazine	Cacao, chocolat	
	2,3-Diméthyl-5-éthylpyrazine	Cacao, praliné	
	3,5(or 6)-Diméthyl-2-éthylpyrazine		
Phénols	Phénol-4-méthyl		(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009 ; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
	Phénol 2-méthoxy		
	2-Acétyl-1H-pyrrole		

	Phénol		(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009; Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2012)
Pyridine	Pyridine-2-méthyle	Caramel, doux	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009)
	2-Pyridinamine		
	1-(2-Pyridinyl)-1-propanone		
Pyrroles	2,3-Diméthyle-1H-	Cacao, praline, chocolat	(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009)
	2-Carboxaldéhyde-1H-pyrrole	Miel, bonbon (faible)	
	3-Ethyl-2,5-diméthyl-1H-pyrrole	Cacao, café	
	1-(2-Furanylméthyl)-1H-pyrrole (furfurypyrrole)	Cacao, torréfié (faible)	
	1H-Indole		
		Chocolat, vert (faible)	
Pyrones	3-Hydroxy-2-méthyl-4-pyrone		(Afoakwa <i>et al.</i> , 2009)

II.5.3.2. Effet de l'origine, la variété et la culture sur les arômes

Le génotype des plantes influence la qualité de la saveur du chocolat. Des travaux ont déterminé les quantités de précurseurs présents dans les fèves de cacao et l'activité des enzymes qui contribuent à la formation des arômes (Luna *et al.*, 2002 ; Counet *et al.*, 2004 ; Taylor and Linforth, 2009). Reineccius (2006) a conclu que les différences variétales sont principalement liées à la quantité des précurseurs d'arôme dans les fèves fraîches comme les polyphénols, les sucres et les polysaccharides. Cependant, les traitements post-récolte (fermentation et séchage) et la torréfaction ont un grand impact sur les saveurs finales (Clapperton, 1994 ; Kattenberg and Kemmink, 1993 ; Luna *et al.*, 2002 ; Counet and Collin, 2003). Des études ont montré de larges variations dans la saveur finale du chocolat provenant de trois variétés différentes : Forastero, Criollo et l'hybride Trinitario (Beckett, 2000; Awua, 2002; Amoye, 2006). Ces différences de goût peuvent être attribuées à la variation de la composition des fèves, l'emplacement et les conditions de la culture ainsi que la conduite de la fermentation et du séchage.

Chaque variété de cacao a un caractère de saveur unique mais les conditions de croissance telles que le climat, la pluviométrie, l'ensoleillement, les conditions pédologiques, la maturation, la saison de la récolte et la durée entre la récolte et la fermentation de fèves, sont autant de facteurs qui contribuent à la présence de certaines variations dans le processus de formation de l'arôme final (Clapperton, 1994). Cambrai *et al.* (2010) ont ainsi relié l'origine géographique à l'arôme final du chocolat provenant des Caraïbes, Madagascar, Afrique et Amérique du Sud par analyse sensorielle.

II.5.3.3. Développement des arômes durant les traitements post récolte du cacao

a) Procédé de fermentation

Le procédé de fermentation détermine la qualité finale du produit, en particulier sa saveur. Des études sur les traitements post-récolte des fèves ont montré que le stockage des cabosses avant fermentation a un effet sur l'amélioration de la saveur du chocolat par réduction de l'amertume et de l'astringence (Meyer *et al.*, 1989 ; Biehl *et al.*, 1990). Pendant la fermentation, la vitesse et le temps de diffusion des acides organiques dans les cotylédons, sont des paramètres cruciaux qui déterminent le pH final. L'optimisation de ces paramètres est proportionnelle à la formation de l'arôme (Biehl and Voigt, 1996). Les fèves qui ont un pH élevé (5.5 à 5.8) sont considérées comme non fermentées, ou ayant subi une courte fermentation, et celles qui ont un pH inférieur (4,75 à 5,19) sont considérées comme des fèves fermentées (Lopez, 1979 ; Holm *et al.*, 1993 ; Beckett, 2009). La quantité des précurseurs d'arômes dans les fèves dépend essentiellement des mécanismes enzymatiques. Des effets similaires ont été observés par l'amélioration de la fermentation par stockage des fruits (Said *et al.*, 1990). Cependant les variations dans la durée de stockage des cabosses affectent l'acidité du milieu et la température générée lors de la fermentation en influençant les activités enzymatiques et le développement de la saveur (Biehl *et al.*, 1990).

Les sucres et les protéines sont partiellement hydrolysés. Les composés phénoliques sont oxydés. Le glucose est converti en éthanol qui est oxydés en acide acétique au cours de la fermentation.

De nombreux travaux ont été réalisés afin d'étudier le rôle des micro-organismes dans la production des arômes du vin tels la production d'acétate d'esters par les levures (Plata *et al.*, 1998 ; Lambrechts and Pretorius, 2000 ; Rojas *et al.*, 2003 ; Molina *et al.*, 2007 ; Swiegers *et al.*, 2009 ; Viana *et al.*, 2009 ; Saez *et al.*, 2011). Cependant, peu de travaux ont été menés pour comprendre le rôle des micro-organismes dans la formation des arômes au cours des étapes de traitements post-récolte du cacao, principalement la fermentation.

Des composés volatils issus de différents groupes ont été identifiés lors de la fermentation du cacao, essentiellement des alcools et des esters qui sont des composés désirables dans la fermentation (Schwan and Wheals, 2004). Ces groupes sont principalement produits par les levures dans les aliments fermentés (Holloway and Subden, 1991 ; Lee *et al.*, 1995). Ho *et al.*, (2014) ont comparé deux fermentations de fèves inoculées par des bactéries et des levures, dont une a été traitée par un antifongique, et ils ont constaté une forte augmentation d'alcools et d'esters au cours de la fermentation non traitée, et le cas contraire a été observé dans la fermentation traitée. Ceci montre que les levures, sensibles aux antifongiques, jouent un grand rôle dans la production d'alcools et esters lors de la fermentation du cacao.

➤ Alcools et esters

Les principaux composés alcooliques présents lors de la fermentation du cacao sont : 3-méthyl-1-butanol, 3-méthyl-2-butanol, méthyl-1-propanol, 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, 2-phényléthanol, alcool d'isoamyle, et 3-méthyl-1-butyl acétate (Rodriguez-Campos *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012). Ho *et al.* (2014) ont montré que le 3-méthyl-1-butanol, 2,3-butanediol et 2-phényléthanol sont produits par les levures *Kloeckera apiculata*, *S. cerevisiae* var. *chevalieri*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* (anciennement *Issatchenkia orientalis*), *Kluyveromyces marxianus*. Ces composés sont très désirés dans le cacao.

Les principaux composés appartenant aux groupes d'esters qui sont détectés au cours de la fermentation sont les acétates comme l'acétate de phényléthyle, l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle (Rodriguez-Campos *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012 ; Ho *et al.*, 2014). Les acétates sont produits par l'action des alcools acétyl transférases produites par les levures (Calderbank and Hammond, 1994; Rojas *et al.*, 2002).

➤ Aldéhydes et cétones

Des composés appartenant à la famille des aldéhydes et cétones sont également détectés dans le cacao fermenté et ils ne semblent pas être affectés par l'action des levures (Ho *et al.*, 2014). Les principaux aldéhydes retrouvés sont : le 2-méthylbutanal, le 3-méthylbutanal et le benzaldéhyde qui pourraient être formés à partir de précurseurs tels que la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine par des bactéries lactiques lors de la fermentation (Jinap *et al.*, 1994 ; Groot and de Bont, 1998, 1999). En outre, des composés tels que le 1-butanol-3-méthyle et le phénylacétaldéhyde ont été rapportés comme des dérivés du catabolisme des acides aminés réalisé pendant la fermentation (Afoakwa *et al.*, 2008). Il a été constaté que l'acétoïne était le

composé cétonique ayant la teneur la plus élevée suivi par d'autres composés 2,3-butanedione, l'acétophénone et le phénylacétaldéhyde. L'acétoïne pourrait être produite par fermentation alcoolique à partir du pyruvate et de butanédiol (Pretorius, 2000).

➤ Acides

Il a été noté que l'acide acétique et l'acide isovalérique sont dominants dans le cacao fermenté non torréfié (Frauendorfer and Schieberle, 2008). Au cours de la fermentation, d'autres acides sont également détectés : acide propionique, acide hexanoïque, acide octanoïque, acide nonanoïque, et acide butyrique qui ont un effet sur la qualité aromatique du cacao (Serra-Bonvehí, 2005). L'augmentation de la concentration des acides organiques au cours de la fermentation résulte du métabolisme des sucres présents dans la pulpe (Thompson *et al.*, 2001 ; Serra-Bonvehí, 2005). Ces acides diffusent dans les cotylédons en diminuant le pH interne des fèves (Thompson *et al.*, 2001).

➤ Pyrazines

Dans certains travaux, les composés de la famille des pyrazines n'ont pas été détectés durant la fermentation (Ho *et al.*, 2014 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012), alors que Jinap *et al.* (1994) et Schwan and Wheals, (2004) ont observé que quelques pyrazines comme la tétraméthylpyrazine et la triméthylpyrazine sont produites en fin de fermentation par *Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium* (Jinap *et al.*, 1994 ; Schwan and Wheals, 2004). Ceci montre que la durée de fermentation et notamment la sur-fermentation peuvent influencer la qualité aromatique par le développement de molécules désirées.

b) Procédé de séchage

Le développement des arômes du cacao se poursuit pendant le séchage, avec l'apparition d'une couleur brune caractéristique due à l'oxydation des polyphénols sous l'action de la polyphénol oxydase, en donnant naissance à de nouveaux composés volatils. De plus, la membrane de la fève perd son intégrité ce qui conduit également à la formation de la couleur brune (Jinap *et al.*, 2003 ; Afoakwa *et al.*, 2008).

Un séchage incomplet peut entraîner un abaissement insuffisant de l'activité de l'eau, qui favorise la multiplication de certains contaminants (moisissures), responsables de la production de fortes concentrations de carbonyles fortement aromatisés. Ces dernières conduisent à des altérations du goût du cacao (Dimick and Hoskin, 1999).

Rodriguez-Campos *et al.* (2012) ont remarqué que la quantité de certains alcools diminue au cours du séchage comme le 2-phényléthanol et augmente pour d'autres tels que le 2.3-butanediol et 1.3-butanediol qui peuvent être également produits à partir d'autres précurseurs. Ces précurseurs peuvent être des aldéhydes ou cétones, comme l'exemple du 2.3-butanediol qui est formé à partir du 2.3-butanedione. En outre, la tétraméthylpyrazine augmente significativement au cours du séchage. Ce composé est noté comme désirable dans le cacao, sa qualité de saveur est caractéristique du cacao et café torréfié (Afoakwa *et al.*, 2008 ; Serra-Bonvehí, 2005). Le séchage réduit la teneur en acides et polyphénols et converti les précurseurs d'arômes en deux classes principales, pyrazines et aldéhydes. Le développement aromatique se poursuit par l'élimination des acides volatils et la réduction de la teneur en eau (Ramli *et al.*, 2006 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2011). Rodriguez-Campos *et al.* (2012) ont constaté que l'étape de fermentation a plus d'impact sur la production des composés aromatiques du cacao que l'étape de séchage en étudiant l'évolution des composés volatils au cours des deux étapes du procédé post-récolte.

c) Développement des arômes durant le procédé de fabrication du chocolat (torréfaction)

La torréfaction du cacao est une étape essentielle pour le développement de l'arôme du chocolat à partir des précurseurs formés pendant la fermentation et le séchage. La torréfaction des grains entiers desserre la coque qui est ensuite facilement éliminée. Avant la torréfaction, les fèves de cacao ont des saveurs amères, acides et astringentes. Ce processus permet de diminuer l'acidité par l'évaporation des acides volatils comme l'acide acétique (Beckett, 2000 ; Granvogl *et al.*, 2006 ; Ramli *et al.*, 2006), et non pas les acides non volatils tels que l'acide oxalique, citrique, tartrique, succinique et lactique (Jinap *et al.*, 1998 ; Awua, 2002).

Les réactions de Maillard sont au cœur du développement de la saveur du cacao. Au cours de la torréfaction, les acides aminés libres, les peptides, et les sucres réducteurs participent tous à ces réactions. Voigt *et al.*, (1994) ont analysé les acides aminés hydrophobes : leucine, alanine, phénylalanine et tyrosine libérés par les activités des protéases des micro-organismes en fermentation. Les acides aminés sont des contributeurs importants de la productions des précurseurs d'arômes (Mohr, 1958 ; Voigt *et al.*, 1994), comme les sucres réducteurs : fructose et glucose produits par l'hydrolyse du saccharose (Lopez, 1979). Les réactions de Maillard conduisent à la formation des arômes hétérocycliques volatils tels que les pyrazines. Parmi ces composés, la 2-méthylpyrazine et la 2, 3, 5, 6 tétraméthylpyrazine sont les principaux composés volatils dans le cacao car ils sont tous les deux responsables de l'arôme de cacao doux et fort

respectivement (Lefeber *et al.*, 2012). La concentration totale des pyrazines dans les grains torréfiés varie selon l'origine : le cacao du Ghana contient 698 µg pour 100 g de pyrazines alors que le cacao du Mexique présente une quantité inférieure à 142 µg (Reineccius, 2006). En général, la teneur en composés azotés est une source de différenciation de saveur, dans ce cas le cacao de Ghana présente un arôme meilleur.

Frauendorfer et Schieberle (2008) ont étudié l'impact de la torréfaction sur le développement aromatique du cacao. Des aldéhydes et des cétones tels le 3-méthylbutanal et le phénylacétaldéhyde ainsi que la 4 hydroxy-2,5-diméthyl-3 (2H) - furannone augmentent significativement au cours de la torréfaction alors que le 3-méthylbutanoïque, 2- méthylbutanoate d'éthyle, et le 2-phényléthanol restent stables.

La température et la durée de torréfaction affectent l'arôme du cacao en accélérant la réaction de Maillard ainsi que la formation de composés volatils. L'augmentation de la température favorise la dégradation de Strecker et entraîne une augmentation de la réactivité entre les sucres et les acides aminés. La torréfaction à des températures différentes produit des cacao aux arômes différents (Davies et Labuza, 1997).

III. Traçabilité

III.1. Généralités

Ces dernières années, l'industrie alimentaire a été sous pression en ce qui concerne l'amélioration de la sûreté alimentaire à cause de certains événements, comme la crise de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (*ESB*), le récent évènement dû à *Escherichia coli* en Allemagne, et des problèmes posés par les aliments génétiquement modifiés (OGM). Ces évènements ont fortement attiré l'attention sur le thème de la traçabilité dans l'industrie alimentaire (Hobbs, 1996 ; Palmer, 1996 ; Paarlberg, 2002). La Commission du *Codex Alimentarius* (1999) définit la traçabilité comme l'aptitude à retrouver l'historique d'un produit alimentaire ou la localisation d'une entité d'identifications enregistrées sur le produit. La traçabilité est étroitement liée à l'identité du produit, mais elle peut également être liée à l'origine, l'historique de la transformation des produits, et la distribution ainsi qu'à l'emplacement du produit après la livraison.

Depuis le règlement européen 178/2002 sur la législation alimentaire générale qui est entré en vigueur le 1^{er} janvier 2005, la traçabilité est devenue essentielle pour l'industrie alimentaire qui fournit constamment des produits de qualité et assure la sécurité sanitaire des consommateurs. Un système de traçabilité intégrée peut améliorer le contrôle des processus et permettre de détecter la cause et l'effet quand un produit n'est pas conforme aux normes. Cependant, les

efforts sur le renforcement des systèmes de traçabilité ont souvent été séparés des stratégies de gestion de la chaîne d'approvisionnement rentable. Cela non seulement empêche l'enthousiasme de l'investissement sur les systèmes de traçabilité efficaces, mais aussi le potentiel pour améliorer l'efficacité de la chaîne d'approvisionnement grâce à l'intégration de la traçabilité avec des fonctions de gestion des opérations (Regattieri *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2009).

Les producteurs ont élaboré et adopté des systèmes de traçabilité de production afin d'améliorer la sécurité sanitaire des aliments, car la traçabilité peut être considérée comme un sous-système dont la présence est essentielle à la gestion de la qualité des aliments (Peri, 2002 ; Bertolini *et al.*, 2006). Le système de traçabilité implique l'application d'une méthodologie de suivi efficace du produit alimentaire "de la graine à la table", qui comprendra les modèles de traçabilité pour assurer la conformité des produits aux exigences établies. Il consiste à collecter toutes les données pertinentes relatives à l'histoire d'un produit et le développement d'un système d'information facilement accessible qui couvre toutes les étapes de la culture, la transformation et la distribution des produits frais et transformés végétaux et animaux. Ainsi, c'est un enjeu majeur de la gestion des connaissances par collecte des informations. La collecte de toutes les données implique une capacité de mesure de tous les facteurs pertinents qui ont trait aux questions de sécurité. La traçabilité implique l'utilisation d'instruments et de capteurs appropriés, capable d'enregistrer et de surveiller un grand nombre de procédés physiques, chimiques et microbiologiques. Mais aussi les informations de manipulation durant toutes les phases de fonctionnement (Sarig, 2003).

A ce jour le système de traçabilité repose exclusivement sur des méthodes de gestion administratives. Il n'existe pas de méthodes analytiques de la traçabilité telle qu'elle est demandée par le règlement UE 178/2002. Les industries agro-alimentaires ont toujours exigé une technique de traçabilité facilement applicable et à faible coût. Les progrès les plus récents ont offert une efficacité à travers les dernières technologies telles que l'identification radiofréquence (RFID) (Hong *et al.*, 2011, Feng *et al.*, 2013). L'analyse des isotopes (Perini *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2014), la chimiométrie et la spectroscopie proche infrarouge (NIRS) (Bevilacqua *et al.*, 2012 ; Cozzolino, 2014), et le code-barres biologique (El Sheikha *et al.*, 2010 ; Bigot *et al.*, 2015).

III.2. Méthodes d'analyse des communautés microbiennes

Les micro-organismes forment des communautés ou mélange de populations microbiennes différentes. L'évolution de ces micro-organismes se fait par interactions entre eux et avec des organismes supérieurs. Les microorganismes contribuent au fonctionnement des écosystèmes,

et de leurs environnements physiques, et sont naturellement présents dans les aliments. Les aliments d'origine végétale ou animale sont associés à des flores microbiennes qui étaient initialement présentes respectivement sur les plantes et les animaux. La flore naturelle est constituée principalement de micro-organismes commensaux, saprophytes qui peuvent avoir un effet bénéfique sur la santé comme les probiotiques (Mantere-Alhonen 1995) et également sur la qualité aromatique des aliments...etc. Cependant, d'autres germes pathogènes causant des maladies sont également détectés dans les aliments de restauration comme *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* ou *Staphylococcus aureus* (Soriano *et al.* 2001 ; Queyrel 2005). Les aliments sont confrontés à différentes sources de contaminations microbiennes provenant de l'environnement (l'air, le sol, l'eau), du matériel ou des manipulateurs.

III.2.1. Méthodes traditionnelles d'analyse des micro-organismes dépendantes de la culture

En microbiologie classique, l'identification des micro-organismes est basée sur la culture, l'isolement, l'étude des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques. Trois grands groupes de méthodes en microbiologie ont permis de différencier de nombreux micro-organismes. Les méthodes les plus directes impliquent la microscopie qui permet d'observer les cellules microbiennes de façon précise suivant la technique utilisée. Les méthodes de culture sont semi-directes car elles permettent de voir seulement les colonies formées par les micro-organismes viables et cultivables. Ces colonies sont appelées des UFC (unités formant des colonies) qui proviennent de la multiplication d'une cellule initiale qui devient au cours du temps un amas de plusieurs millions de cellules microbiennes. Enfin, des méthodes indirectes qui détectent l'activité microbienne (techniques immunologiques, techniques biochimiques, biologie moléculaire) (Branger *et al.*, 2007).

Les méthodes dépendantes de la culture ont certaines limites. Elles sont dues à plusieurs facteurs : le comptage des colonies sur boîte est fréquemment utilisé pour la quantification des cellules vivantes dans l'environnement des échantillons. Cependant, puisque cette méthode est sélective pour les micro-organismes viables et cultivables en conditions de laboratoire, elle reste donc insuffisante et incomplète pour une étude exhaustive de la flore microbienne alimentaire. Il a été rapporté que le nombre de cellules comptées sous microscopie dépassent le nombre de cellules cultivables de plusieurs ordres de grandeur dans des habitats aquatiques mesotrophiques. Le même cas est observé pour les sédiments et les sols (Amann *et al.*, 1995). Un autre problème évoqué est que la majorité des cellules dénombrées au microscope sont viables, mais ne forment pas de colonies visibles sur plaques (pour avis, voir les références

(Staley and Konopka, 1985 ; Roszak and Colwell, 1987). Il existe des espèces connues pour lesquelles les conditions de culture appliquées ne sont tout simplement pas adaptées par exemple dans le cas de cellules entrées dans un état non cultivable et des espèces inconnues qui n'ont jamais été cultivées avant par manque de procédés appropriés (Roszak *et al.*, 1984 ; Colwell *et al.*, 1985).

Les méthodes traditionnelles d'identification bactérienne par la détermination de quelques caractéristiques phénotypiques et l'appréciation de quelques propriétés physiologiques ont montré les limites en termes de taux de récupération et de reproductibilité. L'ensemble des isolats ne reflète pas toujours la composition microbienne du produit (Ampe *et al.*, 1999; Ercolini *et al.*, 2001). Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de s'affranchir des inconvénients des méthodes dépendant des cultures et des méthodes phénotypiques en basant l'identification des espèces microbiennes sur des similitudes, ou des dissimilitudes, de séquences spécifiques d'ADN. Ce sont des paramètres intrinsèques et caractéristiques d'une l'espèce. Ils sont indépendants de l'état physiologique des populations et ne permettent donc pas de différencier les cellules vivantes, viables, ou métaboliquement actives.

III.2.2. Méthodes indépendantes de la culture pour l'analyse de l'écologie microbienne des aliments et métagénomique

L'approche qui consiste à analyser la composition de la communauté microbienne a évolué considérablement durant la dernière décennie. Les cellules microbiennes stockent l'essentiel de leur information génétique grâce à l'ADN bicaténaire. L'identification microbienne peut être obtenue par analyse de la composition en nucléotides, le plus souvent sous forme de rapport AT/GC. Ces techniques sont surtout utilisées pour caractériser une espèce ou des parentés entre les espèces. L'analyse est basée sur des méthodes chimiques ou enzymatiques. Après la lyse des cellules, l'ADN est extrait et purifié, puis les bases sont dosées après hydrolyse de l'ADN. L'écologie microbienne s'intéresse à la connaissance des espèces présentes dans un écosystème, et à comprendre leur capacités fonctionnelles dans cet écosystème. L'approche qui répond à ces deux intérêts est la métagénomique. L'approche métagénomique a été historiquement décrite comme l'isolement et le clonage direct des gènes 5S et 16S des ARN ribosomiaux (ARNr) microbiens à partir des échantillons prélevés dans l'environnement dans des vecteurs spécifiques et des hôtes domestiques afin de créer des banques de clones (Healy *et al.*, 1995 ; Stein *et al.*, 1996 ; Handelsman, 2004). Toutefois, grâce à l'évolution récente et rapide des technologies de séquençage à haut débit (Edwards *et al.*, 2006), de nombreuses études

s'appuient sur le séquençage de l'ADN de l'échantillon (aliment) extrait pour étudier les gènes microbiens et la diversité taxonomique.

La métagénomique telle que définie par Handelsman (2004) correspond à l'analyse génomique fonctionnelle et l'assemblage microbien collectif trouvé dans des échantillons environnementaux. Généralement l'approche métagénomique vise différents objectifs tels que l'identification des gènes, l'estimation de la diversité microbienne, l'étude de la dynamique des populations ou l'assemblage du génome d'organismes non cultivés (Rajendhran and Gunasekaran, 2008). En fonction de ces différents objectifs, la stratégie métagénomique doit être ajustée de manière adéquate.

La diversité bactérienne peut être évaluée par séquençage de l'ADNr 16S, par quantification par des approches de PCR quantitative (Fierer *et al.*, 2005). Le clonage et séquençage d'amplicons spécifiques restent une première approche fiable pour définir approximativement la diversité microbienne d'un échantillon. Cependant, le séquençage à haut débit devient la technologie la plus répandue (Edwards *et al.*, 2006).

L'ADN peut être manipulé par diverses stratégies incluant les approches d'empreintes génétiques. Plusieurs techniques d'analyse des fragments d'ADN basées sur l'amplification par PCR à partir de l'ADN de l'écosystème sont utilisées. Les méthodes moléculaires se caractérisent par leur fiabilité et leur rapidité. Ces techniques peuvent fournir un profil représentant la diversité génétique d'une communauté microbienne d'un environnement spécifique. Le mélange de produits de PCR est ensuite analysé par diverses techniques d'électrophorèse soit par les méthodes basées sur l'analyse de la taille des fragments (RAPD, ARDRA, RFLP, TRFLP), soit par des méthodes basées sur la séquence des fragments (SSCP, TGGE/DGGE). La détection de séquences d'ADNr 16S est une empreinte de la présence des bactéries mais elle ne renseigne pas sur la viabilité des cellules ni sur leur activité métabolique. Les identifications bactérienne et fongique basées sur le séquençage des gènes codant respectivement pour l'ARN 16S (bactéries), 26S (levures) et 28S (moisissures) des ribosomes sont devenues respectivement des outils très performants pour étudier ces communautés dans les échantillons environnementaux (Muyzer *et al.*, 1993 ; Head *et al.*, 1998 ; Cocolin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008) et les aliments fermentés (Cocolin and Ercolini, 2008).

III.1.2.1. Le choix de l'ARN ribosomal (ARNr)

La composition complexe des communautés microbiennes est le plus souvent analysée par les séquences d'acide nucléique ciblé. Chez les procaryotes, le gène codant pour l'ARN ribosomal 16 S s'est imposé et est devenu un marqueur de la diversité bactérienne (Amann *et al.*, 1995). Les ARNr s'associent à des protéines ribosomales constituant les deux sous-unités 30S et 50S du ribosome : la petite sous-unité contient l'ARNr 16S et la grande sous-unité 50S contient l'ARNr 5S et de l'ARNr 23S (Moore, 1998). Ces ARNr sont universels et présents en plusieurs copies chez tous les procaryotes. L'ARNr 16S comprend des zones conservées qui permettent de déterminer les relations entre différents groupes bactériens alors que les régions hypervariables permettent d'obtenir des informations au niveau du genre ou de l'espèce bactérienne (Case *et al.*, 2007).

Chez les eucaryotes, les ribosomes sont formés de deux sous-unités : la sous-unité 40S qui contient l'ARNr 17/18S et la sous-unité 60S qui contient l'ARNr 5S, 5.8S et l'ARNr 26/28S (Musters *et al.*, 1990). L'ARN 26S pour les levures ou 28S pour les moisissures possède deux sous-régions variables appelées D1 et D2. Ces ARNr sont devenus classiques pour l'identification des espèces eucaryotes (White *et al.*, 1990). Plusieurs raisons expliquent le choix de la grande sous-unité ARNr pour l'analyse fongique : elle est présente chez tous les organismes et possède une structure bien conservée. Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient, permettant de comparer des espèces très proches de levures ou de moisissures sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés. Enfin sa séquence est facilement obtenue par des méthodes standards d'extraction d'ADN, d'amplification et de séquençage (Kurtzman and Robnett, 1998 ; Khot *et al.*, 2009).

III.1.2.2. Principe de la PCR-DGGE

La PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a été introduite en écologie microbienne pour le typage des communautés complexes par Muyzer *et al.* (1993). L'échantillon à analyser subit une extraction d'ADN sachant que l'ADN obtenu est un mélange d'ADN de différentes espèces microbiennes présentes dans l'échantillon. On y trouve également l'ADN du produit duquel ont été extraits les micro-organismes. Ensuite le mélange d'ADN sert de matrice aux amplifications par PCR des régions variables particulières, afin d'obtenir un mélange d'amplicons des différentes espèces présentes dans l'échantillon initial. La région d'ARNr ciblée est telle que tous les amplicons ont la même taille mais des séquences différentes et peuvent être séparés par DGGE. Le résultat final est une empreinte qui

est spécifique à l'échantillon analysé qui contient une série de bandes qui correspondent aux espèces microbiennes présentes dans l'échantillon. L'identification des espèces est réalisée par purification et séquençage de bandes directement à partir des profils DGGE (Ercolini, 2004) (Figure 16).

Le principe de la PCR-DGGE est la dénaturation partielle de l'ADN double brin qui permet de séparer les fragments ADN de taille identique mais de séquence nucléotidique différente. Les séquences variables sont encadrées par de courtes séquences consensus qui servent d'amorces pour l'amplification par PCR. La DGGE est effectuée à une température constante d'environ 60°C qui participe à la dénaturation. Lors de la migration électrophorétique, les doubles brins d'ADN partiellement dénaturés sont progressivement freinés par les conditions dénaturantes engendrées par le gradient urée-formamide présent dans le gel d'acrylamide. La dénaturation des doubles brins d'ADN lors de la migration dans le gel d'acrylamide se fait par fusion successive de petites régions, appelées domaines de fusion. Les régions les moins stables se dénaturent plus rapidement. Elles ouvrent localement le double brin d'ADN ce qui fragilise les régions environnantes et modifie la conformation de la molécule. La migration en gradient dénaturant ne prend pas en compte la taille mais la composition en bases. Les séquences riches en AT (Adénine-Thymine) qui sont reliées par deux doubles liaisons hydrogène, et qui se dénaturent les premiers, et de domaines plus stables qui ont une composition en bases riche en GC (Guanine-Cytosine) qui sont liées par trois doubles liaisons hydrogène, et qui se dénaturent plus tardivement (Lerman *et al.*, 1984).

L'ajout d'une répétition de bases guanine et cytosine (*GC clamp*) sur l'extrémité 5' de l'une des amorces dans l'étape d'amplification permet d'éviter la dénaturation totale des produits PCR et donc leur élution du gel (Myers *et al.*, 1985). La mise au point de la technique dépend essentiellement du choix des amorces d'ADN. Les amorces utilisées pour l'amplification déterminent la finesse et la spécificité de la méthode. La cible la plus souvent utilisée pour l'amplification PCR est une région très conservée du génome qui inclut également des régions hypervariables des gènes ribosomiques (cf plus haut) (Seifert, 2009). Les amorces permettent d'amplifier 100 à 500 pb dans une zone à faible point de fusion (Ercolini, 2004).

III.1.2.3. Application de la PCR-DGGE dans le domaine agro-alimentaire

La PCR-DGGE a été appliquée la première fois par Muyzer *et al.* en 1993 afin d'étudier les communautés microbiennes complexes. Elle a été utilisée dans différents domaines. Dans le

domaine clinique, cette méthode a permis l'identification de plus de 65 espèces de *Mycoplasma* d'origine humaine et animale en moins de 24h (McAuliffe *et al.*, 2005). Li *et al.* (2012) ont caractérisé à l'aide de cette empreinte moléculaire les communautés bactériennes de l'épithélium bovin du rumen. D'autres part, la PCR-DGGE a été appliquée dans le domaine de l'environnement et a ainsi permis d'étudier la diversité microbienne dans les eaux (Muyzer *et al.*, 1995 ; Sekiguchi *et al.*, 2002 ; Hesham *et al.*, 2006), dans les sols (Smalla *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008) et dans les aérosols (Nieguitsila *et al.*, 2007).

La technique d'empreinte génétique PCR-DGGE a été classée comme une nouvelle stratégie dans la détection des communautés microbiennes dans les aliments (Ercolini, 2004). Les études les plus récentes ont été réalisées sur la discrimination des fruits selon leurs origines géographiques (El Sheikha *et al.*, 2011) et en fonction de leurs traitements pré-récoltes (agriculture biologique et conventionnelle) (Bigot *et al.*, 2015). Cette technique a été très souvent appliquée sur les aliments fermentés tels que les fromages (Arcuri *et al.*, 2013), les olives fermentées (Lucena-Padrós *et al.*, 2014), le kéfir (Leite *et al.*, 2012) et les saucisses traditionnelles (Silvestri *et al.*, 2007).

De nombreux auteurs ont appliqué la PCR-DGGE sur le cacao dans le but d'identifier les flores microbiennes associées aux fermentations de fèves de cacao réalisées dans différents pays : Ghana (Camu *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007 ; Daniel *et al.*, 2009), la côte d'Ivoire et le Brésil (Papalexandratou *et al.*, 2011a ; Papalexandratou *et al.*, 2011b) et la Malaisie (Papalexandratou *et al.*, 2013). L'intérêt de notre travail est d'évaluer l'impact des différents procédés appliqués sur le cacao et ne pas seulement l'étape de fermentation. Hamdouche *et al.* (2015) ont étudié l'écologie microbienne lors du séchage des fèves de cacao en Côte d'Ivoire. D'autres études ont évalué les communautés fongiques au cours du traitement post récolte du café, notamment les flores ochratoxinogènes (Durand, 2012 ; Nganou *et al.*, 2012). Vilela *et al.*, (2010) ont utilisé la même approche pour caractériser le microbiote associé au café (*Coffea arabica*)

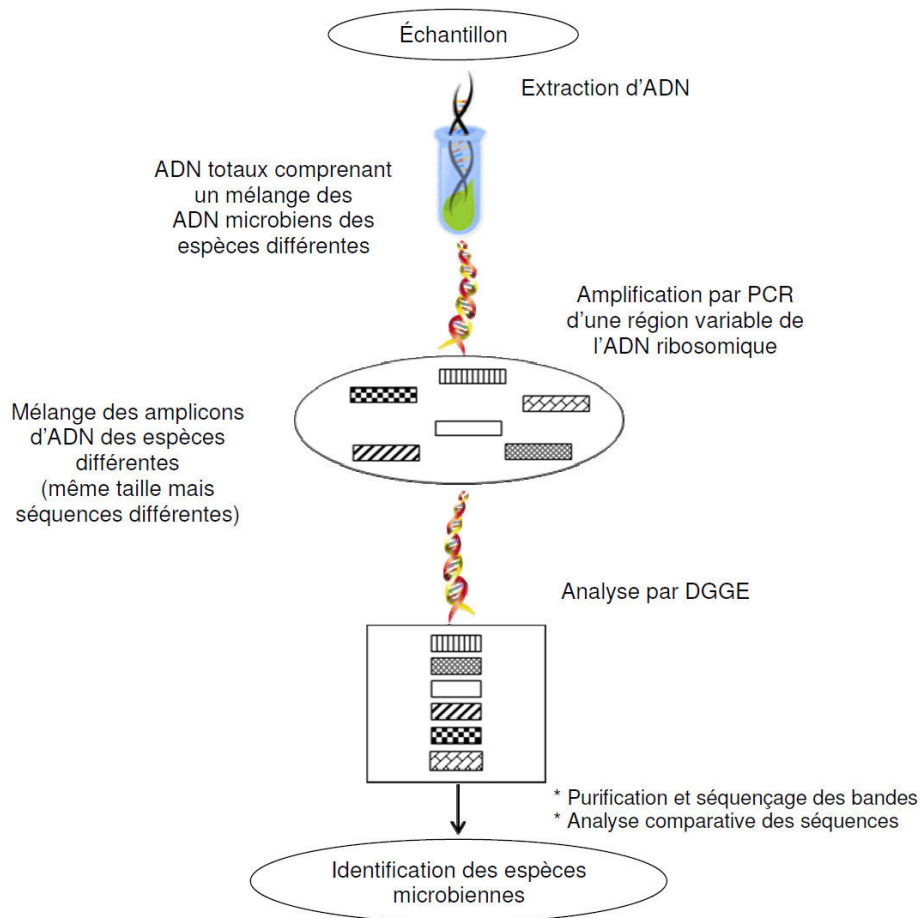


Figure 16 : Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse des échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires (Ercolini, 2004).

III.1.2.4. Limites de la PCR-DGGE

La PCR-DGGE reste une méthode moléculaire de choix pour l'estimation la plus exhaustive possible de la diversité microbienne, mais elle peut présenter quelques limites :

- Sur le gel, il est courant d'observer des doubles bandes qui sont deux bandes à forte et à faible intensité se situant à proximité immédiate. Elles proviendraient de la position de bases dégénérées et du *GC-clamp* au sein des amorces qui engendrent des combinaisons particulières entre la séquence ciblée et les amorces. Le problème de formation des doubles bandes n'est pas résolu et il peut aussi conduire à une surestimation de la diversité microbienne. Toutefois, d'après Janse *et al.* (2004) il est possible de réduire leur formation en augmentant le temps d'élongation finale à 72°C lors de l'amplification par PCR.

- La présence de nombreuses copies de gènes d'ADN ribosomique (dont l'ADNr 16S chez les bactéries par exemple) avec des séquences micro hétérogènes d'une même souche. En effet, le profil de la DGGE est caractérisé par plusieurs bandes qui surestiment la révélation de diversité microbienne par DGGE (Michon *et al.*, 2012).
- La longueur des fragments révélés par DGGE ne doit pas dépasser 500 pbs, ce qui représente un facteur limitant pour l'analyse des séquences et l'identification fiable des espèces microbiennes (Ercolini, 2004).
- La co-migration des fragments d'ADN cause un problème pour la récupération des séquences propres des bandes individuelles. En fait, malgré le fait que les séquences soient différentes, parfois les propriétés de fusion des brins d'ADN peuvent être identiques.
- La sensibilité de la méthode est limitée. On la situe à environ 10^3 - 10^4 bactéries par gramme d'échantillons et à 10^4 pour les moisissures (Durand *et al.*, 2012), ce qui ne permet pas d'avoir une évaluation des communautés totales mais seulement des microorganismes majoritaires (qui répondent le mieux à l'analyse moléculaire).
- Ne permet pas de savoir si les micro-organismes sont vivants ou morts dans l'échantillon analysé.

DEUXIÈME PARTIE :
MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé lors de cette étude est constitué d'échantillons de fèves de cacao provenant de la Côte d'Ivoire, et d'échantillons de café originaire du Cameroun et d'Indonésie.

I.1. Échantillonnage de café

I.1.1. Café du Cameroun

L'échantillonnage du café a été réalisé dans quatre régions au cours de deux récoltes (2013 et 2014). Les régions ont été sélectionnées par rapport au taux de production : elles seules produisent environ la moitié du café camerounais et aussi parce qu'elles sont suffisamment éloignées l'une de l'autre (elles sont situées dans les régions de l'Ouest (Bafoussam, Dschang) du centre (Bafia) et de l'Est (Batouri) (Figure 17). Bafoussam et Dschang sont assez proches mais ce sont les sites qui produisent 75% du café arabica. Les données géographiques et environnementales ont été relevées (Tableau 5).

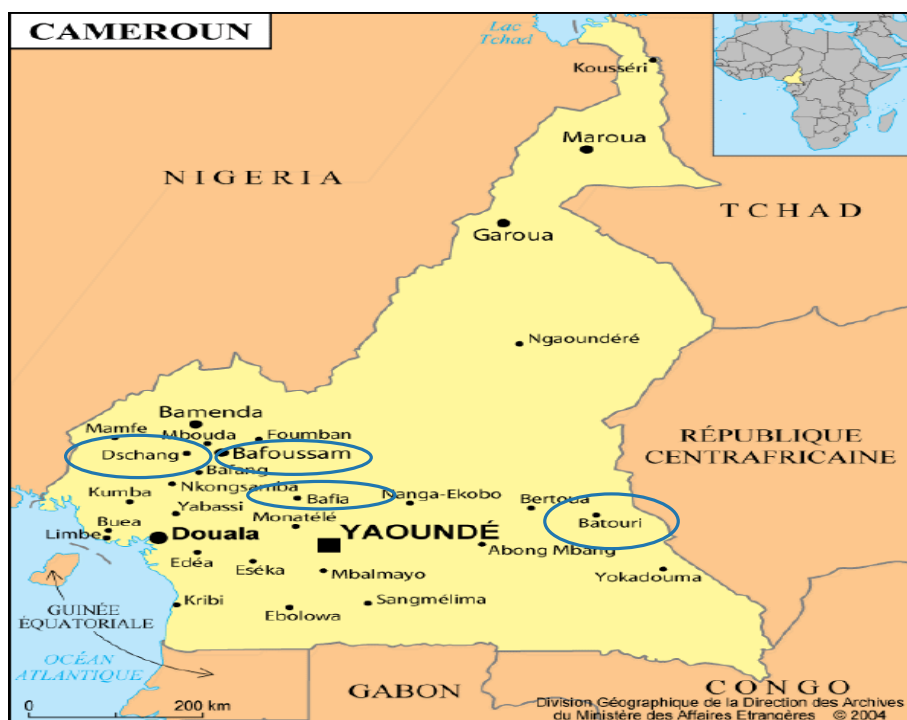


Figure 17 : Carte du Cameroun indiquant les régions de prélèvement

(http://www.tv5monde.com/TV5Site/info/zoom_carte.php?id_pays=41)

Tableau 5 : Données géographiques et environnementales des zones d'échantillonnage du café au Cameroun (données du mois de mai correspondant au mois de la récolte)

Année de récolte	Région	Pluviométrie (mm)	Température (°C)	Humidité spécifique (Kg/Kg)	Altitude (m)	Coordonnées GPS
mai-13	Bafoussam	357.321	20.8611	0.016154	1425	5°28'0,72"N – 10°25'0,48"E
	Dschang	431.502	20.7286	0.0160689	1370	5°27"N – 10°04'00"E
	Bafia	182.724	23.5657	0.0180937	497	4°45'00"N – 11°13'00"E
	Batouri	193.025	24.3847	0.0184536	627	4°26'00"N – 14°22'00"E
mai-14	Bafoussam	141.5	22.6	0.0166635	1425	5°28'0,72"N – 10°25'0,48"E
	Dschang	141.5	22.6	0.0162748	1370	5°27"N – 10°04'00"E
	Bafia	163.9	26.2	0.0189288	497	4°45'00"N – 11°13'00"E
	Batouri	164.9	25.5	0.0192836	627	4°26'00"N – 14°22'00"E

En mai 2013, le prélèvement des échantillons s'est fait auprès d'un seul producteur (site n°1) pour chaque région, par contre en mai 2014 le prélèvement a été effectué auprès de trois producteurs (sites n°1, 2 et 3) pour chaque région. Les distances séparant les sites sont respectivement:

Bafoussam : entre le site B1 et le B2 : 12 km ; entre les sites B2 et B3 : 10 km

Dschang : entre D1 et D2 : 7 km; entre D2 et D3 : 5 km

Bafia : entre F1 et F2 : 5 km; entre F2 et F3 : 7 km

Batouri: entre T1 et T2 : 4 km ; entre T2 et T3 : 5 km

Les prélèvements ont été réalisés à différentes étapes de la transformation (Figure 18). Il s'agit du café en parche, des cerises séchées et des grains de café vert. Deux types de traitements post-récolte sont appliqués sur le café : le traitement par voie humide pour le café arabica (cerises bien mûres) et le traitement par voie sèche pour le café robusta et arabica (cerises immatures ou abimées). Cinq cents grammes de café sont prélevés dans des sacs de 50 kg (100 g à 5 endroits différents du sac de café). Ces derniers ont ensuite été introduits dans des sacs plastiques stériles et conservés à température ambiante pendant deux semaines avant l'analyse. Deux répétitions techniques ont été réalisées, 10 g de café sont prélevés pour chaque répétition.

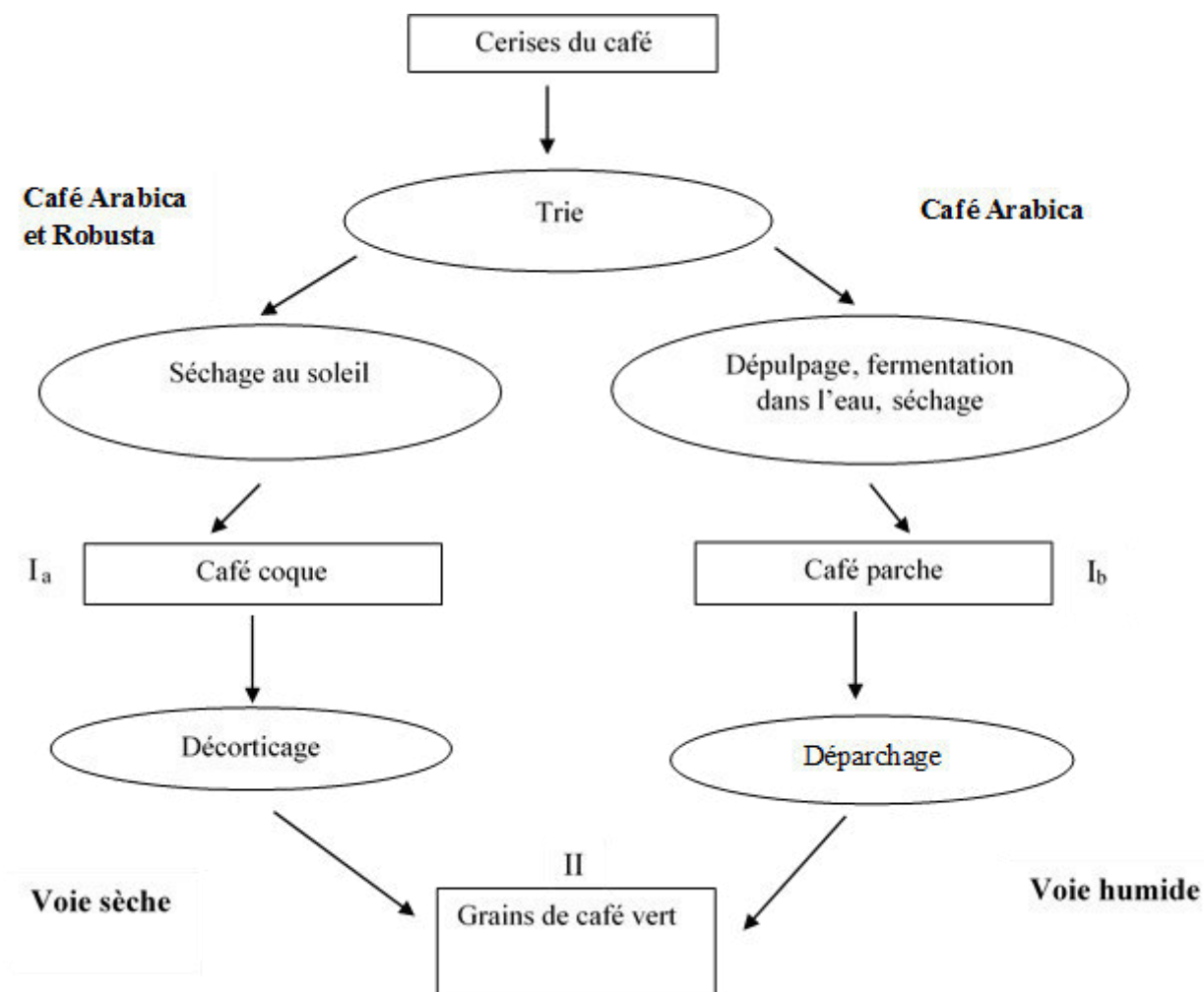


Figure 18 : Étapes de traitement des cerises fraîches aux grains de café au Cameroun.

I_a, I_b et II: étapes d'échantillonnage.

1.1.1.2. Café d'Indonésie

L'échantillonnage du café a été effectué en janvier 2014 dans la région Sunda située à l'ouest de Java en Indonésie (Cordonnées : 7°04 S- 107°25 E). Deux types de café ont été échantillonnés, le café Bunisora et le café Luwak. Bunisora est obtenu par voie humide et semi-humide dans le village de Rawabogo qui se situe à 1300 m d'altitude, alors que le Luwak est obtenu par voie naturelle à l'aide de la civette qui vit dans les forêts de pins (Figure 19). Ce café est prélevé dans trois villages (Rancasalak, Rawabogo et Gamblok) qui ont une altitude moyenne de 1400 m. Cependant le café vert obtenu par cette voie représente le mix des cafés provenant des trois villages. Cinq cents grammes d'échantillons du café vert obtenu par les trois voies ont été prélevés dans des sacs de 50 kg (100 g à 5 endroits différents du sac de café). Ces

derniers ont été mis dans des sacs stériles et stockés à température ambiante pendant deux semaines. Quatre répétitions techniques ont été effectuées.

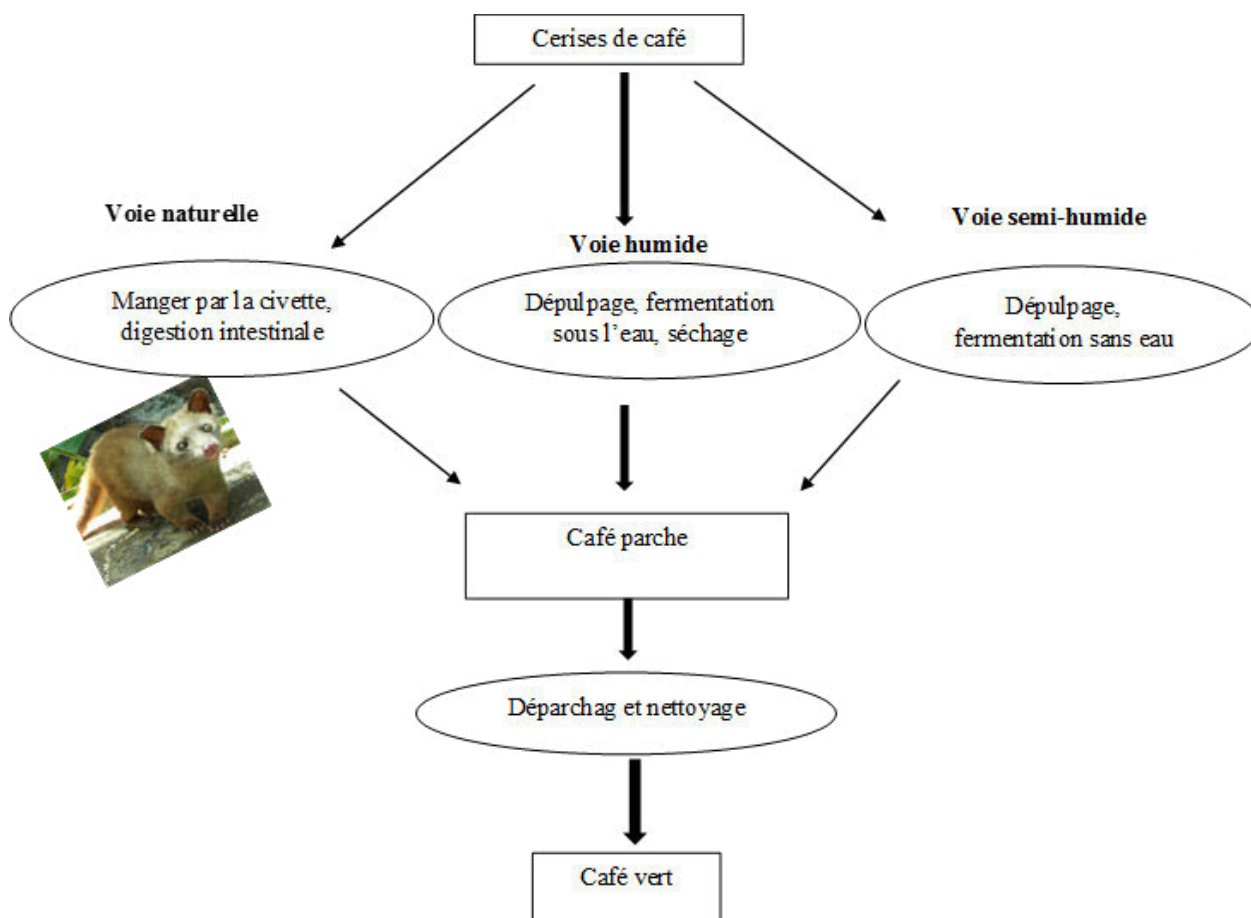


Figure 19 : Représentation des trois voies de traitement de café en Indonésie.

1.2. Échantillonnage du cacao

L'échantillonnage du cacao a été effectué au cours de deux récoltes (mars 2013 et novembre 2014) dans une plantation paysanne de la région Fresco située au sud de la Côte d'Ivoire à environ 240-250 Km d'Abidjan.

En mars 2013, les cabosses récoltées ont été immédiatement écabossées puis les fèves récupérées ont été fermentées dans des caisses en bois, des caisses en plastique et en tas dans des feuilles de bananiers (Figure 20). Pour chaque méthode de micro-fermentation, 200 cabosses de cacao ont été utilisées. Au cours de chaque type de fermentation conduites, 2 brassages (48 et 96h) ont été effectués après ports de gants latex. Des échantillons d'environ 1 Kg sont prélevés (2, 4, 6 jours de fermentation) à partir des différents tas de fèves en fermentation, dont 200g sont stockées à 4 °C pour l'analyse, puis 800 g sont mis à sécher au soleil (Figure 20). Le séchage des fèves a duré 4 jours et débute chaque jour à 9h 00 pour

s'achever à 18h 00. Les fèves sont brassées 3 fois au cours du séchage après port de gants. A la fin de chaque jour de séchage, les fèves de chaque échantillon sont emballées séparément dans des sachets d'emballage en polyéthylène. Au cours du séchage des prélèvements de 200g de fèves sont effectués à partir de chaque tas de fèves issues de la fermentation à 2, 3 et au dernier jour du séchage.

Les fermentations ont été effectuées sur le site de plantation avec une température variant entre 28 et 31°C.

En novembre 2014, les cabosses récoltées ont été stockées à différents délais (2, 4 et 8 jours) ; ce délai correspond au délai de stockage avant écabossage et sera abrégé en « Délai d'écabossage » (Figure 20). Après ouverture des cabosses, les fèves récupérées ont été mises à fermenter uniquement dans des caisses en bois pendant 7 jours. Sur ces fèves, deux procédés de fermentation ont été appliqués : fermentation avec et sans brassage. Le brassage a été effectué à 48 h et 96 h de fermentation sauf pour les fèves issues du délai de 4 jours qui ont été seulement fermentées par le procédé sans brassage.

Le prélèvement s'est déroulé dans des conditions stériles avec l'utilisation de sacs en plastique stérile.

N.B : pour chaque lot d'échantillon, 2 répétitions sont réalisées.

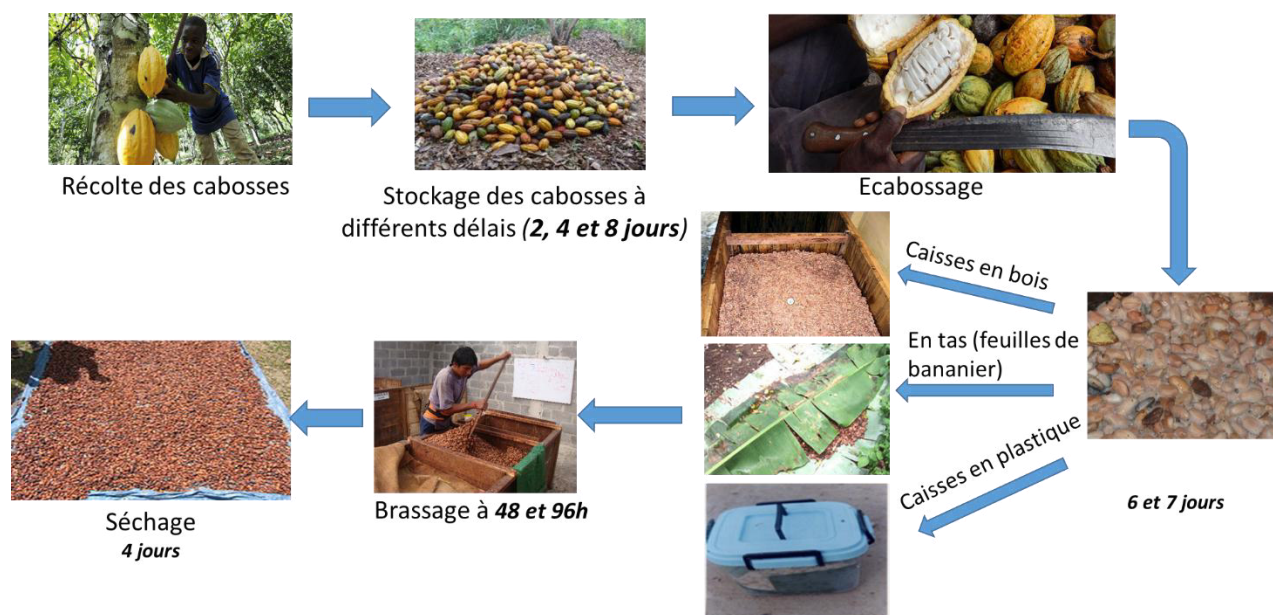


Figure 20 : Échantillonnage au cours du procédé post-récolte du cacao.

II. Méthodes

II.1. Analyse des communautés microbiennes par des techniques de biologie moléculaire

II.1.1. Protocole d'extraction de l'ADN bactérien et fongique

II.1.1.1. Extraction des ADN totaux des souches de bactéries et levures en culture pure par choc thermique

Quelques colonies de souches pures isolées des fèves de cacao fermentées sont cultivées sur boîtes de pétri puis prélevées et mises en suspension dans un tube Eppendorf contenant 50 μ L d'eau moléculaire stérile. Les tubes sont vortexés 2 min puis déposés dans l'eau bouillante pendant 10 min, ensuite les tubes retirés de l'eau sont immédiatement mis à -20°C afin de créer le choc thermique (Teyssier *et al.*, 2003).

II.1.1.2. Extraction des ADN totaux à partir des fèves de cacao et des grains de café

Avant de procéder à l'extraction d'ADN, il est nécessaire de récupérer les micro-organismes présents sur la surface des échantillons de café et de cacao. Dix grammes d'échantillons sont ajoutés à 10 mL d'eau peptonée (2 répétitions en été réalisées) ; l'ensemble est agité à l'aide d'un agitateur rotatif (ORBIT, Selecta, Espagne) pendant 1 heure.

L'extraction de l'ADN des bactéries, des levures et des moisissures est basée sur les méthodes de Masoud *et al.* (2004), Ros-Chumillas *et al.* (2007), et Karakousis *et al.* (2006) et qui ont été modifiées par (El Sheikha *et al.*, 2009; El Sheikha, 2010).

Deux millilitres de la solution de lavage des grains de café et de cacao sont prélevés et déposés dans 1 tube de 2 mL. Des billes de verre (0,3 g) de diamètre de 425 - 600 μ m (Sigma, France) lavées à l'acide sont ajoutées à la suspension obtenue. Le mélange est agité vigoureusement pendant 30 min dans un agitateur Vortex (Genie 2 SI-A256, USA) puis centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 min et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est suspendu à nouveau dans 300 μ L de tampon d'hydrolyse [2% Triton X-100 (Prolabo, France) ; 1% de SDS, 100 mM NaCl (Sigma, France), 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France)] et 100 μ L de TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 (Promega, France)]. Cent μ L de solution de lysozyme (25 mg.mL⁻¹, Eurobio, France) sont ajoutés puis incubés à température ambiante, puis 100 μ L de solution de protéinase K (20 mg. mL⁻¹, Eurobio, France) sont ajoutés et le mélange est agité manuellement puis est incubé à 42°C pendant 30 min. 50 μ L de SDS 20% sont ensuite ajoutés à chaque tube et incubés à 42°C pendant 10 min après homogénéisation manuelle du mélange. Quatre cents microlitres de MATAB (Sigma, France) sont alors versés dans les tubes

puis incubés à 65°C pendant 10 min. Sept cents µL d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v Carlo Erba, France) est ajouté et les tubes sont agités manuellement puis centrifugés à 12 000 rpm pendant 15 min. La phase aqueuse est transférée dans un flacon Eppendorf. Cette étape de lavage avec le mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique est répétée une fois de plus. Le phénol résiduel est éliminé par extraction avec 600 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, Carlo Erba, France) et centrifugé pendant 15 min à 12 000 rpm. La phase aqueuse est recueillie et l'ADN est précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5), suivi de l'ajout d'un volume d'isopropanol glacé. L'ADN dans l'isopropanol est incubé à - 20°C pendant 12 h. Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 min, le surnageant est éliminé, les culots d'ADN sont lavés avec 500 µL d'éthanol à 70% et les tubes sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 15 min. L'éthanol est ensuite éliminé et les culots sont séchés à l'air à température ambiante pendant 2 à 4h. L'ADN est remis en suspension dans 100 µL d'eau ultra pure et conservé à 4°C jusqu'à l'analyse.

II.1.2. Vérification de l'extraction d'ADN

La quantité et la pureté des ADN extraits sont vérifiées par migration sur gel d'agarose et mesure sur le spectrophotomètre UV-Visible.

a) Sur gel d'agarose

La quantité des ADN extraits est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose (Promega, France) à 0,8% (p/v) dans un tampon TAE 1X (Eppendorf, Allemagne). Cinq microlitres de la solution d'ADN extrait auxquels sont ajoutés 2 µL de colorant bleu/orange (Promega, France) et qui sont déposés dans chaque puits du gel. Un marqueur de taille moléculaire de 1 kb (Invitrogen, USA) est également déposé afin de comparer la taille des ADN extraits des échantillons. La migration dure de 30 à 45 min sous une tension de 100 V.

Le gel d'agarose est ensuite immergé dans une solution de gel red (Biotium) à 0,1 µg/mL pendant 20 min, puis le gel est observé sur un trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale pilotée par le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

b) Avec un spectrophotomètre UV-Visible

La quantification et la pureté des ADN extraits sont estimées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible du type Biospec Nano (Shimadzu, Japon). Cet appareil mesure l'absorbance de l'échantillon dans une gamme de longueurs d'onde allant de l'UV au visible. La concentration en ADN est mesurée à 260 nm, tandis que les ratios des mesures effectuées à 260/280 et 260/230 permettent d'estimer le niveau de pureté de l'ADN. Ainsi le ratio 260/280 rend compte de la teneur en acides nucléiques / protéines. Le meilleur ratio est compris entre 1,8 et 2 ; s'il est supérieur à 2 cela signifie que nous avons une contamination par de l'ARN et s'il est inférieur à 1,8 cela signifie qu'il y a une teneur en protéines élevée. Le ratio 260/230 correspond aux ratios acides nucléiques/inhibiteurs PCR et doit être compris entre 1,6 et 1,8.

II.1.3. Amplification du gène de l'ARNr par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

II.1.3.1. Amplification du gène de l'ARNr 16S des bactéries

a) A partir des ADN totaux extraits à partir du café et du cacao

L'amplification du gène de l'ARNr 16S bactérien extrait est basée sur la méthode de Ampe *et al.*, (1999) et modifiée par (Le Nguyen *et al.*, 2008). L'amplification de la région V3 de l'ADNr 16S est réalisée en utilisant un couple d'amorces décrit dans la littérature (Muyzer *et al.*, 1993): 338f et 518r (Tableau 6). Un GC clamp de 40 nucléotides est ajouté à l'amorce 338f à l'extrémité 5'. Ils donnent un fragment de 160 pb.

b) A partir des ADN extraits des souches pures

L'amplification du gène de l'ARNr 16S des bactéries en culture pure, isolées du cacao est réalisée en utilisant les amorces 27f et 1492r pour amplifier quasiment en totalité le gène de l'ARNr 16S (DeLong, 1992). Ils donnent un amplicon de 1465 pb.

Tableau 6 : Séquence des amorces universelles utilisées pour les bactéries.

ADN bactérien	Utilisation	Amorce	Cible	Position	Séquence
ADN totaux extraits du café et cacao	En PCR-DGGE	GC-338f (Sigma, France)	Région V3 du gène de l'ARNr 16S	338-357	5`- <u>CGC CCG CCG</u> <u>CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG GCA</u> CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3`
		518r (Sigma, France)	Région V3 du gène de l'ARNr 16S	518-534	5`- ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3`
ADN des souches pures isolées	Pour l'identification	27f (Sigma, France)	Gène ARNr 16S		5`-GTG CTG CAG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG– 3`
		1492r (Sigma, France)	Gène ARNr 16S		5`-CAC GGA TCC TAC GGGTAC CTT GTT ACG ACT T– 3`

II.1.3.2. Amplification du gène l'ARNr 26S des levures

a- A partir des ADN totaux extraits du café et du cacao

La région D1/D2 de l'ADNr 26S est amplifiée en utilisant deux couples d'amorces GC NL1f et LS2r (Tableau 7). Ce couple d'amorce couvre la région polymorphe D1/D2 allant des positions 27 à 50 pour NL1f et 266 à 285 pour LS2 du gène de l'ARN 26S de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils donnent un amplicon de 258 pb (Cocolin *et al.*, 2000; El Sheikha *et al.*, 2009). Un GC-clamp de 30 nucléotides est ajouté à l'amorce NL1f à l'extrémité 5' afin de s'assurer que le fragment d'ADN demeurera partiellement bicaténaire pour la méthode DGGE (Sheffield *et al.*, 1989).

b- A partir des ADN extraits des souches pures

L'ITS ou l'espace interne transcrit est considéré comme conservé au niveau du genre et variable entre espèces. L'ITS d'environ 500 pb est amplifié par le couple d'amorces ITS1/ITS4 chez les levures (White *et al.*, 1990) (Figure 21).

Tableau 7 : Séquence des amorces universelles utilisées pour les levures.

ADN de levures	Utilisation	Amorce	Cible	Position	Séquence
ADN totaux extraits du café et cacao	En PCR-DGGE	GC NL1f (Sigma, France)	région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S	27 - 50	5`- <u>CGC CCG CCG</u> <u>CGC GCG GCG</u> <u>GGC GGG GCG</u> <u>GGG</u> GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G – 3`
		LS2 r (Sigma, France)	région D1/D2 du gène de l'ARNr 26S	266 – 285	5`- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC – 3`
ADN des souches pures isolées	Pour l'identification	ITS1	18S partiellement		5`-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3`
		ITS4	28S partiellement		5`-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3`

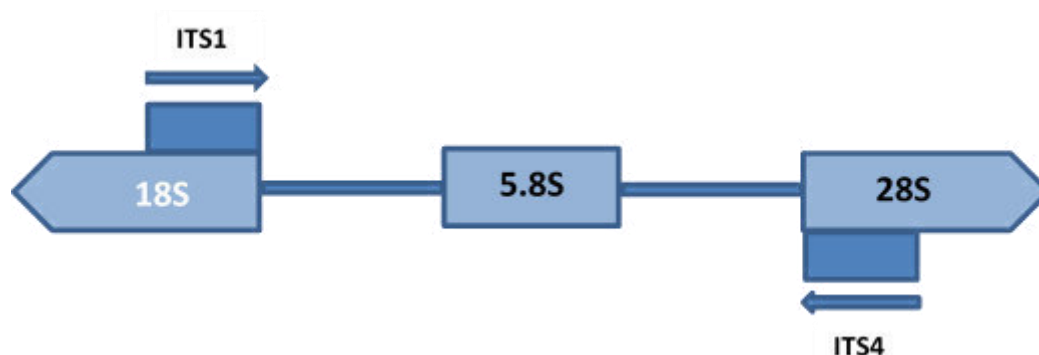


Figure 21 : Représentation schématique de l'ITS (ITS1 et ITS4) de l'unité répétée de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes. Les flèches représentent les sites de fixation des amorces.

II.1.3.3. Amplification du gène de l'ARNr 28S des moisissures

Un seul couple d'amorce a été utilisé lors de cette étude pour l'amplification de l'ADN des moisissures extraits du café et cacao : le GC-U1f et U2r (Tableau 8). Le Primer U1 correspond aux coordonnées de 403 à 422, et l'amorce U2 correspond aux coordonnées de 645 à 662 du gène de l'ARNr 28 S de *S. cerevisiae* (J01355 numéro d'accèsion GenBank). Ils donnent un amplicon de 260 pb.

Tableau 8 : Séquence des amorces universelles utilisées pour les moisissures.

Amorce	Cible	Position	Séquences
GCU1f (Sigma, France)	ARNr 28S	403 – 422	5` - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GTG AAA TTG TTG AAA GGG AA – 3`
U2r (Sigma, France)	ARNr 28S	645 – 662	5` - GAC TCC TTG GTC CGT GTT – 3`

II.1.4. Mélanges réactionnels et conditions de PCR

Toutes les réactions d'amplification par PCR sont réalisées dans des plaques de 96 puits SorensonTM (BioScience, USA) ou des tubes de 8 puits (Thermo Scientific, UK). Chaque mélange contient un volume final de 50 µL. Il contient environ 100 ng de l'ADN matrice, des amorces à une concentration de 0,2 µM, desoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) à 200 µM, 1,5 mM de MgCl₂, 5µL de tampon Taq à 10x et 1,25 U de l'a-Taq polymérase (Promega).

- Conditions de la PCR

Les réactions de PCR s'effectuent dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA).

Pour les ADN bactériens : l'amplification par PCR (Tableau 9) est réalisée selon la méthode de Le Nguyen *et al.* (2008). Une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, puis 10 cycles de « Touch down » avec une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 65°C (cette température est abaissée de 1°C par cycle jusqu'à 55°C) pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 2 min. Ensuite 20 cycles sont réalisés incluant une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 55°C pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 3 min. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 10 min.

Tableau 9 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN bactériens avant DGGE.

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (min)
1	94	5
10	94	1
	65	1
	72	3
20	94	1
	55	1
	72	3
1	72	10

Pour les ADN levuriens : l'amplification par PCR est réalisée selon les méthodes de (Hesham *et al.*, 2006) améliorée par (El Sheikha *et al.*, 2009 ; El Sheikha, 2010) (Tableau 10). Une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, puis 30 cycles incluant une dénaturation à 95°C pendant 1 min, suivi d'une hybridation à 52°C pendant 2 min, et enfin une élongation à 72°C pendant 2 min. Une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 min.

Tableau 10 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN levuriens avant DGGE.

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (min)
1	95	5
30	95	1
	52	2
	72	2
1	72	7

Pour les ADN de moisissures : l'amplification par PCR est réalisée selon les méthodes de (El Sheikha and Montet, 2011) (Tableau 11). Une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, puis une série d'opérations répétées 30 fois incluant une dénaturation à 94°C pendant 45 sec, une hybridation à 50°C pendant 50 sec, et une élongation à 72°C pendant 90 sec. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 min.

Tableau 11 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN de moisissures avant DGGE.

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
1	94	3 min
30	94	45 sec
	50	50 sec
	72	90 sec
1	72	7 min

II.1.5. Vérification de l'amplification

Les produits PCR sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (Promega, France) à 2% (p/v) pour les amplicons qui ont une taille qui varie de 200 à 300pb, et 1,5% pour les amplicons de grande de taille (de 500 à 1000 pb). La migration est réalisée dans un tampon TAE 1X (Tris-acétate, EDTA pH 8,3).

Cinq microlitres d'amplicons auxquels sont ajoutés 2 µL de colorant bleu/orange (Promega, France) sont déposés dans chaque puits du gel. Le marqueur de taille moléculaire est un marqueur d'échelle de 100 pb (Invitrogen, USA). La migration dure de 30 à 45 min sous une tension de 100 V. Le gel est traité comme précédemment.

II.1.6. Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)

II.1.6.1. Composition et préparation du gel de DGGE

Les fragments d'ADNr amplifiés par PCR sont séparés par DGGE dans un gel à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5/1, v/v, Promega, France) contenant un gradient d'agents dénaturants qui s'étend de 30% à 60% pour les ADN bactériens et levuriens (Le Nguyen *et al.*, 2008) de 40% à 70% pour les ADN de moisissures (El Sheikha and Montet, 2011). Ce gradient est constitué d'urée (Promega, France) et de formamide (Promega, France) (Tableau 11) sachant que 100% correspondent à 7M d'urée et 40%(v/v) de formamide. L'appareillage DGGE utilisé est le modèle Biorad Dcode (Biorad, USA). Pour la préparation du gel, deux tubes de 50 mL d'un préparateur de gradient (Bio- rad Model 485, USA) sont mélangés respectivement à 16 mL de chacune des solutions froides (stockées à 4 °C) de 30 et 60% (ADN des bactéries et levures) ou 40% et 70% (ADN des moisissures) (Tableau 12). A ce mélange de solution on ajoute 40 mg de persulfate d'ammonium (APS) (Promega, France) et 40 µL de Tétraméthylènediamine (TEMED) (Promega, France). Le gel est coulé dans un moule de

0,75 mm d'épaisseur entre deux plaques de verre de 200 mm de côté. Une pompe Percom-I, Watson-Marlon (USA) réglée à 20 tours/min permet de transférer le gel du préparateur de gradient jusqu'au moule. La durée de polymérisation du gel est au minimum d'une heure.

Tableau 12 : Composition des solutions de préparation des gels de DGGE.

Constituants	30% de dénaturant	60% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	20 mL	20 mL
Formamide	12 mL	24 mL
Urée	12,6 g	25,2 g
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	100 mL
Constituants	40% de dénaturant	70% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	20 g	20 g
Formamide	16 mL	28 mL
Urée	16,8 mL	29,4 mL
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	100

II.1.6.2. Conditions de migration électrophorétiques de la DGGE

La cuve d'électrophorèse (Bio-Rad Dcode System, USA) est remplie de tampon TAE 1X, et préchauffée à la température de migration de 60°C. Le gel DGGE est placé dans la cuve préchauffée à 60°C. Dix microlitres de colorant bleu/orange (Promega, France) et 30 µL des produits issus de la PCR sont déposés dans chaque puit. L'électrophorèse est exécutée en deux périodes successives, à 20 V pendant 10 min puis à 80 V pendant 12h pour les ADN bactériens (Le Nguyen *et al.*, 2008) et levuriens (El Sheikha *et al.*, 2009) et 16h pour les ADN de moisissures (El Sheikha and Montet 2011). Après la migration, le gel est retiré délicatement des plaques de verre et immergé dans une solution de gel red (Promega, France) à 0,1 µg/mL pendant 40 min. Le gel est ensuite observé sur le trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale et pilotée par le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

II.1.6.3. Traitement d'image et traitement statistique des profils DGGE

L'image capturée par la caméra est enregistrée sous format TIFF (8-bits, niveaux de gris) en négatif (bandes d'ADN noires sur fond clair).

Les images sont ensuite traitées par le logiciel ImageQuantTL® version 2003 (Amersham Biosciences, USA). Afin d'étalonner les gels, nous avons utilisé des produits d'amplification d'ADNr provenant de souches pures de bactéries (*E. coli* et *Lactobacillus plantarum*) de levures (*Candida apicola* et *Lodderomyces elongisporus*) et de moisissures (*Aspergillus niger* et *altenaria alternata*). Ces ADN témoins permettent de vérifier le bon déroulement de la migration DGGE, et leur position précise sur le gel après migration constitue la référence pour l'analyse des différentes bandes de nos échantillons. Ces ADN de référence permettent la comparaison des profils d'ADN bactériens, levuriens et fongiques d'un gel à l'autre.

La distance qui sépare les bandes représentatives des deux ADN témoins (*E. coli* et *L. plantarum* ou *C.apicola* et *L. elongisporus* et ou *A. niger* et *A. alternata*) est mesurée et appelée « Dte ». La position de chaque bande X est ensuite mesurée par rapport à la bande de référence de *L. elongisporus* pour les ADN levuriens, *E. coli* pour les ADN bactériens et celle d'*A. niger* pour les ADN de moisissures. Cette distance est appelée d. Chaque bande d'ADN est caractérisée par sa position relative (PR) et est calculée selon la formule (Figure 22).

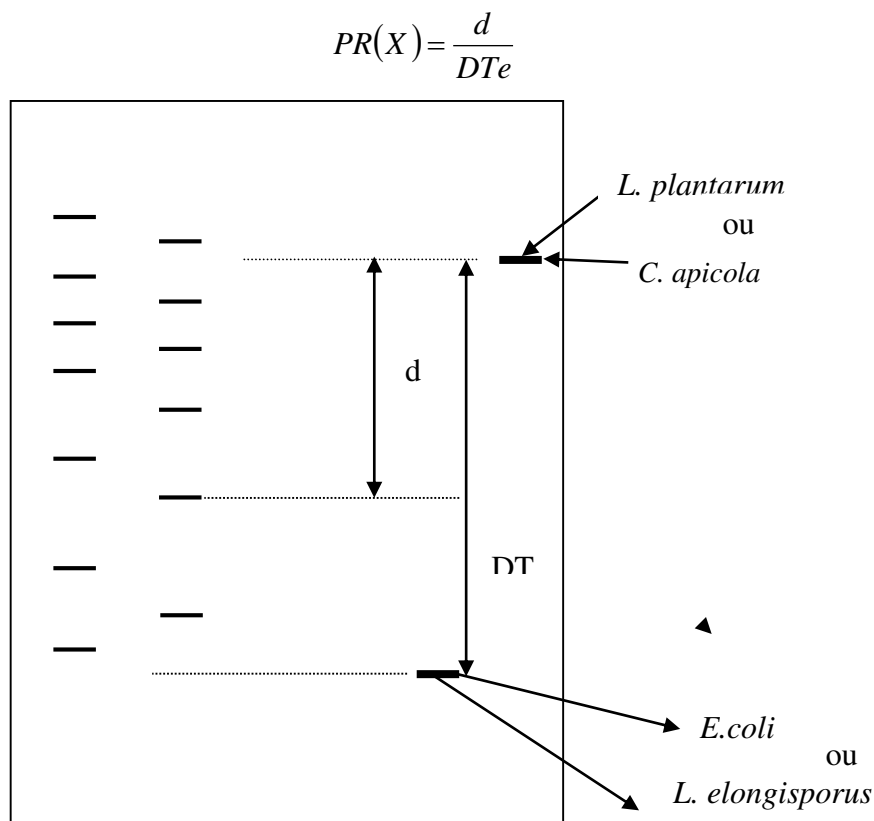


Figure 22: Calcul de la position relative (PR) de chaque bande par exploitation d'un gel DGGE.

Les profils DGGE diffèrent par le nombre, la position ou l'intensité des bandes qui les composent pour chaque piste (colonne) correspondant aux dépôts de produits de PCR obtenus à partir d'un extrait d'ADN. Il est possible pour chaque piste de coder la présence ou l'absence

d'une bande à une position particulière par 1 (présence) ou 0 (absence). Ceci permet de calculer le nombre de bandes en commun entre chaque échantillon. La position et l'intensité des bandes présentes sur les gels DGGE sont déterminées par le logiciel ImagQuant. Une fois la matrice des distances calculée, une classification numérique des échantillons est effectuée en utilisant le coefficient de similarité de Dice (Kowalchuk *et al.*, 1997 ; Lebaron *et al.*, 1999 ; Gelsomino *et al.*, 1999 ; Ibekwe *et al.*, 2001).

Le coefficient de similarité de Dice est utilisé (Heyndrickx *et al.*, 1996) selon la formule :

$$S_{\text{Dice}} = 100 * 2 * N_{AB} / (N_A + N_B)$$

Où :

N_{AB} représente le nombre de bandes communes aux échantillons (profils),

N_A et N_B : représentent le nombre de bandes, respectivement dans les échantillons A et B.

Les données générées par le calcul des coefficients de similarité sont exploitées par l'Analyse en Composantes Principales (ACP) par le logiciel XLStat ou Statistica, par l'Analyse des Correspondances Canoniques (ACC) par XLStat et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) par XLStat. L'ensemble de ces analyses a été réalisé en utilisant le logiciel Statistica (version 7.1) ou le logiciel XLStat (Version 2014).

- **Analyse en Composantes Principales (ACP)**

L'ACP est une méthode d'analyse de données qui cherche à synthétiser l'information entre les individus (échantillons) et les variables (par exemple traitements appliqués, origine géographique, années de récoltes...etc.). L'ACP permet d'établir une similarité entre les individus et chercher des groupes d'individus homogènes.

- **Analyse des Correspondances Canoniques (ACC)**

L'ACC est connue pour ses qualités théoriques, puisqu'elle englobe de nombreuses autres méthodes statistiques (par exemple, l'analyse factorielle des correspondances et l'analyse en composantes principales...etc.). Elle été développée dans le but de permettre aux écologues de relier les abondances d'espèces à des variables environnementales (Ter Braak, 1986). Dans notre cas les abondances des espèces ont été exprimés par le volume des bandes détectées par PCR-DGGE. Cependant nous avons envisagé d'utiliser cet outil statistique qui permet de décrire les relations linéaires qui existent entre deux ensembles de variables mesurées sur les mêmes individus. Le premier ensemble représente les variables à expliquer (par exemple le traitement appliqué, les étapes du procédé, l'origine géographique...etc.) et le deuxième

ensemble regroupe les variables explicatives et qui sont dans cette étude les bandes d'ADN identifiées par PCR-DGGE. Le nombre de variables explicatives détermine le nombre des axes canoniques produits par l'ACC. Ces derniers sont des axes d'ordination contraints à être exprimés par une combinaison linéaire des variables explicatives.

- Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

La CAH permet de classer des individus en groupes (échantillons) ayant un comportement similaire sur un ensemble de variables (par exemple traitement, étapes du procédé, origine géographique). Elle commence par agréger les 2 individus (échantillons) les plus proches. Puis elle continue en agrégeant les éléments (un café ou groupes de cafés) les plus semblables.

II.1.6.4. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE

Les bandes visibles sont découpées sur le gel avec un scalpel stérile. L'ADN de chaque bande est ensuite élué dans 100 µL du tampon TE à 4°C pendant 12 h. Un échantillon de 100µL de l'ADN élué à partir de chaque bande est purifié en ajoutant 1/10 volume de l'acétate de sodium (3M, pH5), 5,5 µL de glycogène pour biologie moléculaire (Roche), et 1 volume d'Isopropanol, puis incubé à -20°C pendant 30 min. Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 min, le surnageant est éliminé, les culots d'ADN sont lavés avec 500 µL d'éthanol à 70% et les tubes sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 15 min. L'éthanol est ensuite éliminé et les culots sont séchés à l'air à température ambiante pendant 2 à 3h. L'ADN est remis en suspension dans 50 µL d'eau ultra pure stérile et conservé à 4°C jusqu'à l'analyse.

Les ADN purifiés sont ré-amplifiés par PCR dans les mêmes conditions décrites précédemment mais en utilisant dans ce cas des amorces sens sans GC-clamp. L'efficacité de cette procédure est vérifiée par l'électrophorèse des amplicons obtenus à partir des ADN découpés sur gel DGGE. Les amplicons sont ensuite envoyés pour séquençage chez GATC Biotech (Allemagne). Pour les bandes ayant la même position sur le gel DGGE et pour des pistes différentes, une seule bande représentative est purifiée puis réamplifiée avec l'amorce sans GC clamp. Cependant, quelques bandes de même position ont été séquencées afin de vérifier qu'elles correspondent bien à une seule et même séquence. Les séquences des ADNr 16S, 26S et 28S obtenues sont comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches. Les séquences présentant un pourcentage d'identité de 97% ou plus, sont considérées comme appartenant à la même espèce (Stackebrandt and Goebel, 1994 ; Palys *et al.*, 1997).

II.2. Techniques de microbiologie conventionnelles

II.2.1. Microorganismes étudiés

Quatre souches sont utilisées pour cette étude : une LAB *Lactobacillus fermentum*, une AAB *Acetobacter pasteurianus* et deux levures *Pichia kudriavzevii* (anciennement *Issatchenkia orientalis* et *Pichia manshurica*. Celles-ci ont été isolées à partir de fèves fermentées pendant 7 jours dans la région d'Akoupé en Côte d'Ivoire (Récolte de novembre 2014).

II.2.2. Milieux de culture utilisés

a- Milieux solides gélosés

- Milieu Acétobacter

Ce milieu est utilisé pour l'isolement et le dénombrement des bactéries acétiques. Pour 1L, il est composé de : glucose (20g) ; extrait de levure (8g) ; peptone (5g) ; agar (12g) ; carbonate de calcium (7g) et d'éthanol (5mL) qui est ajouté après stérilisation (Alauzet *et al.*, 2010).

La dégradation du carbonate de calcium et l'apparition d'un halo autour de la colonie traduit la production d'acide acétique.

- Milieu MRS

Ce milieu est utilisé pour l'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques. C'est un milieu déshydraté (Biokar Diagnostics) 70,3 g, eau distillée (qsp 1L).

Dans le cas d'inhibition de la flore fongique pour le dénombrement des bactéries, 3,5 mL de la solution de Cycloheximide (Fluka (Sigma), zwitterland) ont été rajoutés à 500 mL du milieu.

- Milieu Sabouraud au Chloromphénicol

Ce milieu a été utilisé pour l'isolement et le dénombrement des levures. C'est un milieu déshydraté (Biokar Diagnostics) 45,5 g, eau distillée (qsp 1L).

Ces milieux sont autoclavés pendant 20 min à 120°C.

b- Milieux liquides

Deux milieux de cultures synthétiques sont utilisés : le PSM-LAB et le PSM-AAB.

Le PSM-LAB est un milieu simulant la composition de la pulpe de cacao non fermentée et il est utilisé pour la culture des LAB et levures, alors que le PSM-AAB mime la composition de

la pulpe après deux jours de fermentation et il est utilisé pour la culture des AAB (Tableau 13) (Lefeber *et al.*, 2010).

**Tableau 13 : Composition des milieux simulant la pulpe de cacao
PSM-LAB et PSM-AAB (Lefeber *et al.*, 2010).**

Composés	PSM-LAB (g/L)	PSM-AAB (g/L)
Fructose (Fluka)	25	0
Glucose (Sigma)	25	0
Calcium lactate-pentahydrate (Fluka)	0	10
Ethanol (Sigma)	0	10
Acide citrique (Merck)	10 (52 mM)	0
Extrait de levure (Difco BD)	5	10
Peptone de soja (Conda)	5	5
Magnésium sulfate-heptahydrate (Sigma)	0,5	0
Manganèse sulfate-monohydrate (Fluk)	0,2	0
Tween 80 (ICI)	1	1

N.B. : Le pH a été ajusté à 5,5 pour la culture des LAB, à 3,5 pour les levures et à 4,5 pour les AAB

II.2.3. Protocole d'isolement

a- Isolement

Dix grammes de fèves de cacao fermentées pendant 7 jours et séchées ont été mélangés avec 10 mL d'eau physiologique stérile (0.8%) dans un tube Falcon. Ces derniers sont vortexés puis 100 µL de la suspension sont ensemencés sur milieu gélosé. Les milieux ensemencés sont incubés à 30°C pendant 24h pour les LAB, 48h pour les levures et 36h pour les AAB. Les colonies suspectes sont repiquées 2 à 3 fois.

b- Caractérisation microscopique

Des examens microscopiques (état frais et coloration de Gram) sont effectués pour déterminer la morphologie des cellules bactériennes et les regroupements cellulaires éventuels. La technique est la suivante : un frottis est fixé à la flamme, puis coloré par le violet de gentiane

(1 min), lugol (30 sec). Une décoloration à l'alcool/acétone, un rinçage à l'eau distillée, une contre-coloration à la fuchsine (1 min), et un rinçage à l'eau distillée, ont été réalisés. Les frottis sont observés au microscope optique, avec l'objectif 100, après ajout d'une goutte d'huile à immersion.

c- Conservation des souches

Les colonies d'une culture fraîche de chaque isolat ont été ensemencées aseptiquement dans des tubes de CRYOBANK contenant 1 mL de solution cryoconservatrice hypertonique recouvrant environ 25 billes de verre à la surface desquelles les microorganismes adhèrent. Après homogénéisation, tout le liquide cryo conservateur est retiré des tubes. Ces derniers sont conservés à -80°C.

II.2.4. Protocole de culture

a- Pré-culture

A partir des cryotubes, cinq billes de LAB et de levures sont prélevés et servent à ensemencer respectivement 100 mL de PSM-LAB (pH=5,5) et PSM-LAB (pH=3,5) dans des erlens de 500 mL. Ces derniers sont incubés dans un bain marie réglé à 30°C avec agitation à 100 rpm pendant 24h. Pour les AAB la même procédure est appliquée mais dans un erlen d'1L contenant 100 mL de PSM-AAB (pH = 4,5) incubé pendant 48h.

b- Culture en milieu liquide

- Préparation de l'inoculum

Pour la préparation de l'inoculum, la Densité Optique (DO) de chaque culture est mesurée à 600 nm puis convertie en UFC / mL ou levure / mL en utilisant l'équation de la courbe de calibration déjà obtenue. Les cultures microbiennes fraîches sont diluées dans les mêmes milieux de pré-culture stériles cités précédemment afin d'obtenir une concentration entre 10^5 et 10^6 UFC/mL pour les bactéries et entre 10^5 et 10^6 levures /mL.

- Répartition de l'inoculum

Pour chaque souche, deux séries de 12 tubes de 10 mL (RIC, France) stériles sont préparés sur un portoir. Cinq millilitres d'inoculum homogénéisé sont transférés dans chacun des tubes, qui sont ensuite hermétiquement fermés par une capsule magnétique à sertir (RIC, France), puis

incubés à 30°C. Durant 24h, régulièrement (toutes les 130 min), deux tubes sont récupérés pour la mesure de DO et l'extraction des composés volatils (Figure 23).

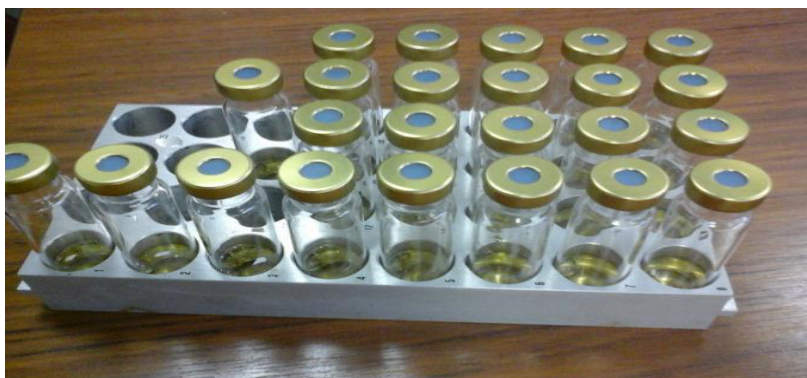


Figure 23 : Photo des tubes contenant le milieu liquideensemencé.

c- Culture en milieu solide

Des cabosses de cacao sont nettoyées à l'eau de javel et ouvertes dans des conditions stériles, les fèves sont ensuite récupérées, puisensemencées par spot avec une culture fraîche de bactéries ou levures, de concentration variant entre 10^4 à 10^6 UFC/mL pour les bactéries et entre 10^5 et 10^6 de levures/mL. Deux fèves ont été introduites par tube de 40 mL (Thermo Electron SAS, France) qui sont incubés dans une étuve à 30°C pendant 7 jours. À Chaque jour de fermentation, 3 tubes sont récupérés pour le dénombrement et l'extraction des composés volatils (Figure 24).



Figure 24 : Photos des tubes contenant des fèvesensemencées.

d- Dénombrements

Le principe est un ensemencement en surface dans le milieu de culture à différentes dilutions (2 boîtes par dilution) de la suspension mère, suivi d'une incubation à 30°C pendant 24h pour *P. kudriavezevii* et *L. fermentum* et 48h pour *P. manshurica* et *A. pasteurianus*. Les dilutions

décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile (solution de NaCl à 8%). 100 µL des dilutions appropriées sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant 20 mL du milieu de culture Sabouraud pour les levures, MRS gélosé pour les LAB et *Acetobacter* pour les AAB. Les colonies sont comptées après 24 à 48h d'incubation.

Pour cette méthode de numération sur milieu solide les limites de confiance à 95 % sont :

$$IC_{95\%} = \left[\frac{1,96\sqrt{C}}{n_1 + 0,1n_2} \right]$$

Le résultat est exprimé de la manière suivante :

$$\text{Nombre de colonies} = \left[\frac{C}{(n_1 + 0,1n_2)} \pm \frac{1,96\sqrt{C}}{(n_1 + 0,1n_2)} \right] * \frac{1}{d_1} * \frac{1}{V}$$

Avec :

C : la somme totale des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives contenant au moins 15 colonies.

V : le volume d'inoculumensemencé dans chaque boîte en mL.

n1 : le nombre de boîtes retenues à la première dilution.

n2 : le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution.

d1 : la première dilution retenue.

Pour les levures, les cellules sont dénombrées en plaçant une lamelle de verre sur la cellule de Malassez sur laquelle on dépose entre 10 et 15 µl de cellules en suspension. Après avoir attendu quelques minutes pour que les cellules sédimentent, on peut compter le nombre de cellules dans 10 rectangles (quadrillés). Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01 µl, en comptant 10 rectangles, il suffit alors de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre de cellules par ml. Par exemple, si 30 cellules sont observables sur 10 rectangles, on obtient un total de 300 000 cellules par mL.

e- Calibrations

Afin de maîtriser nos inoculations et de suivre la population microbienne en continu dans le milieu liquide, nous avons réalisé, pour chaque souche étudiée une courbe de calibration en reliant la population microbienne (en UFC/ mL) pour les bactéries et (en levures/mL) à la DO de la suspension mesurée à 600 nm. Cela permet d'estimer la charge de pré-culture et d'inoculer toujours de manière égale.

A partir des cultures liquides de 24h pour LAB et levures et 48h d'AAB, des séries de dilution ont été réalisées. Pour chaque dilution, un dénombrement et une mesure de DO ont été effectués. Une courbe de calibration est tracée à partir des valeurs relevées $\text{UFC/mL} = f(\text{DO})$ ou $\text{Levures/mL} = f(\text{DO})$ (Annexe 1).

II.3. Analyse biochimique des échantillons

II.3.1. Analyses des composés d'arôme par micro-extraction en phase solide SPME

Le principe d'extraction de la SPME consiste en trois étapes (Figure 25) :

- (1) équilibre** : établissement de l'équilibre entre la quantité de composés volatilisés et la quantité de composés présents dans l'échantillon.
- (2) extraction ou adsorption** : mise en équilibre entre la fibre, sur laquelle les composés volatils s'adsorbent, et une phase liquide (immersion) ou gazeuse (espace de tête). Cette phase dépend du type de composé à extraire, du temps de contact avec la fibre, de la température, de la fibre.
- (3) désorption thermique des solutés adsorbés** : la fibre est introduite dans un injecteur de Chromatographie en phase gazeuse (CPG) chauffé, où les solutés sont instantanément résorbés et transférés à l'intérieur de la colonne chromatographique.

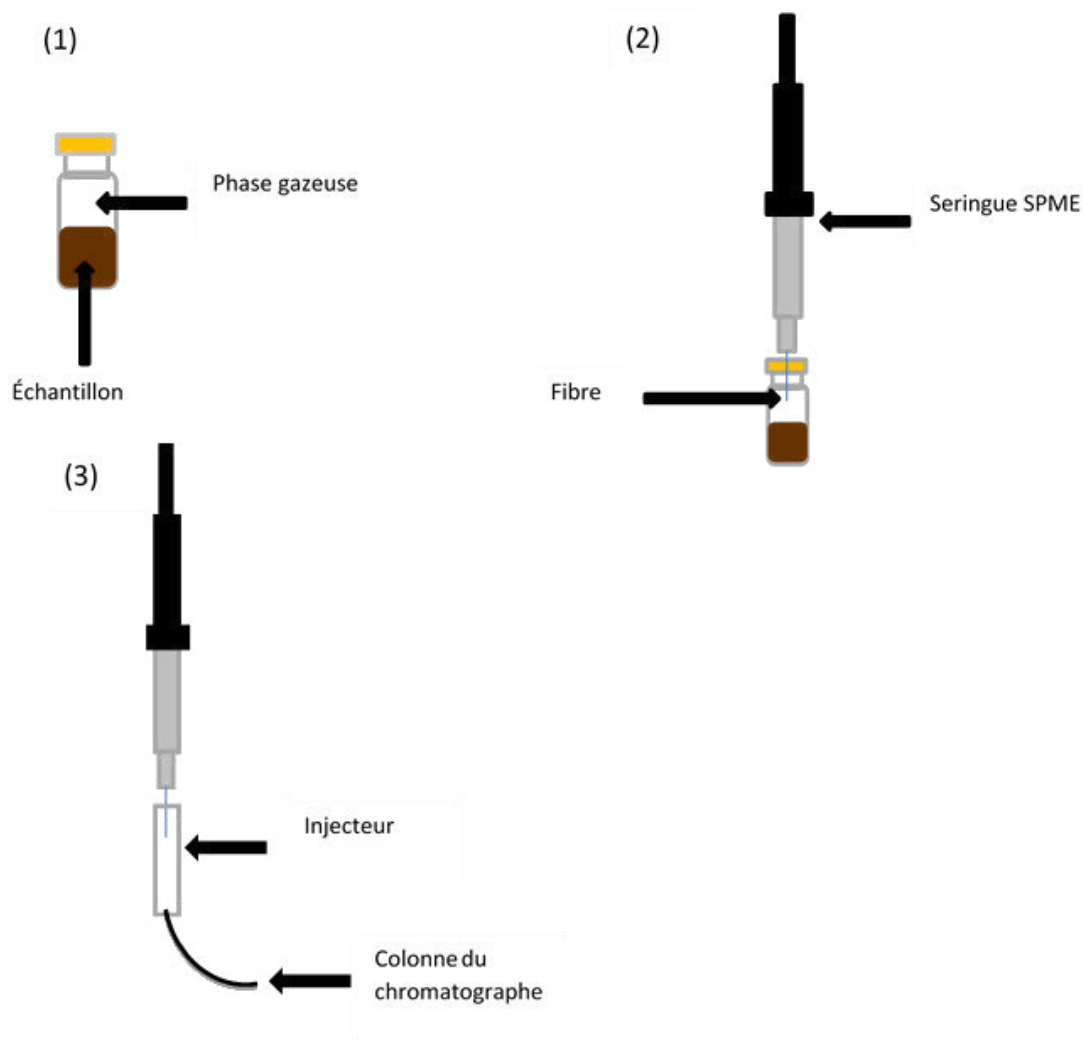


Figure 25 : Les différentes étapes d'extraction des composés volatils par SPME.

II.3.1.1. Préparation des échantillons et extraction

Lors de cette étude, l'extraction a été réalisée sur trois types d'échantillons/ milieu de culture liquide, fèves de cacaoensemencées et poudre de cacao.

Afin de comparer les échantillons entre eux et de corriger l'évolution de la fibre SPME, un étalon interne a été introduit dans chaque échantillon. Il s'agit de 30µL d'une solution de butanol (Sigma) à 250 µg/L. La fibre SPME utilisée est de marque SUPELCO, elle est composée de 2 phases polydiméthylsiloxane/Carboxen.

a- Milieu liquide

Le même protocole comme précédemment décrit (II. 2. 4. b) Culture en milieu liquide) est utilisé : des tubes contenant 5 mL d'inoculum sont incubés pendant 24h sur le plateau. L'extraction est réalisée automatiquement avec un intervalle de 130 min entre les extractions. La technique d'extraction s'est déroulée comme suit : la fibre a été piégée dans la phase gazeuse

pendant 30 min à 30°C. Une fois l'extraction terminée, les composés sont désorbés de la fibre dans un injecteur chauffé à haute température et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Avant chaque extraction, la fibre est désorbée durant 10 min dans l'injecteur d'un CPG à 250°C afin d'éliminer toute trace d'impureté adsorbée par la fibre.

b- Fèves de cacao

Comme détaillé au-dessus (II. 2. 4. c) Culture en milieu solide), les tubes (40 mL) contenant deux fèves de cacao fermentés (le poids varie entre 4.5 à 5.5g) ont été stockés à -80°C après chaque prélèvement jusqu'à l'analyse. L'extraction a été réalisée manuellement car la taille des tubes n'est pas adaptée au plateau utilisé. Avant la première utilisation, la fibre est pré-conditionnée à la température de 250°C pendant 30 min afin d'éliminer les éventuelles impuretés qui auraient pu s'y adsorber. L'extraction s'est déroulée dans les mêmes conditions que l'extraction du milieu liquide.

c- Poudre de cacao

Les échantillons de fèves de cacao fermentées et séchées en Côte d'Ivoire sont broyées avec de l'azote liquide au moyen d'un moulin à hélice, puis les échantillons sont conservés à - 80°C. Trois grammes de poudre de cacao sont introduits dans des tubes de 10 mL fermés par un bouchon septum.

Lors de l'extraction, certaines conditions initiales ont été choisies suite à l'étude de Maraval (2005) faite sur l'influence de la durée de mise à l'équilibre et du temps d'adsorption sur l'extraction des arômes du cacao. Après un temps d'équilibre de 15 min entre la phase gazeuse et l'échantillon, la fibre est exposée au niveau de la phase gazeuse pendant 45 min à 40°C.

II.3.1.2. Analyse GC-MS

L'analyse des composés d'arômes contenus dans tous les échantillons est réalisée à l'aide d'un chromatographe de type Agilent 6890N en mode injection automatique sur une colonne polaire capillaire DBWAX J&W 122-7032 de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne et de 0,25 µm d'épaisseur de film (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium à un débit de 1 mL min⁻¹. La température de l'injecteur est de 250°C et l'injection d'échantillon est faite avec la programmation suivante : une augmentation de la température de 3°C min⁻¹ de 40 à 170 °C suivi d'une autre de 10°C min⁻¹ de 170 à 240 °C. Le chromatographe est couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973 Network fonctionnant en mode impact

électronique avec source d'ionisation interne de 70 eV. L'analyseur est de type quadripôle ($T = 150^{\circ}\text{C}$), et la température de la source est de 230°C . L'analyse des fragments est réalisée en mode scan de 40 à 400 daltons uma à raison de $4,58 \text{ daltons umas}^{-1}$.

II.3.1.3. Identification des composés volatils

Les composés sont identifiés par comparaison avec les bases de données des spectres de composés connus Wiley275 ou NIST (version 2002). De plus, l'identité des composés est confirmée par le calcul des indices de rétention linéaire ou indices de Kovats (IK) et comparée avec celles trouvées dans la littérature. Ces indices de rétention linéaire sont calculés après analyse, dans les mêmes conditions de chromatographie, à l'aide d'une série des n-alcane C8-C20 (Supelco, Bellefonte, USA).

$$\text{IK} = (100n) + 100 * [(T_{ri} - T_{rn}) / (T_{rn-1} - T_{rn})]$$

Avec T_{ri} , temps de rétention du composé d'arôme i , T_{rn} temps de rétention de l'alcane à n carbones, et T_{rn-1} , temps de rétention de l'alcane suivant.

II.3.1.4. Analyses statistiques

Les surfaces des pics ont été calculées par le logiciel (Instrument Data Analysis) puis exportées sur Excel. La comparaison des moyennes des surfaces de pics des composés volatils est faite par l'analyse de variance (ANOVA) et l'analyse en composantes principales (ACP) à l'aide de logiciel XLStat version 2010.

II.3.2. Dosage des acides organiques

II.3.2.1. Extraction des acides organiques

L'extraction a été réalisée selon le protocole de Holm *et al.* (1993). Cinq grammes de poudre de cacao sont mélangés avec 50 mL d'eau distillée chaude (75°C) dans une fiole jaugée de 100 mL. La suspension résultante est bien mélangée puis refroidie à température ambiante. Le volume est complété par de l'eau distillée jusqu'à 100 mL, ensuite filtré à travers un papier filtre plissé (Whatman) et un filtre de $0,45 \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich), puis transféré dans un tube à HPLC (Thomson).

II.3.2.2. Dosage des acides organiques

Les acides organiques sont dosés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Pour pouvoir les quantifier dans les échantillons à analyser, il est nécessaire de faire

au préalable des courbes d'étalonnage des acides organiques standards. Pour préparer la gamme d'étalonnage la plus adaptée, nous devons d'abord avoir une idée des concentrations en acides attendues dans les différents échantillons (Annexe 2). Les paramètres caractéristiques de l'HPLC utilisée sont détaillés ci-dessous :

- Matériels : Chromatographie ionique, Dionex
- Conditions chromatographique :

Colonne : AS11-HC

Éluants : A : Eau

B : NaOH 0,1 N

C : NaOH 0,002 N

Détection : conductivité

Débit : 0,6 mL/min

Volume injecté : 0,02 mL

Pilotage et traitement des données : Logiciel ClarityChrom

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et Discussion

Chapitre I. Discrimination des procédés post-récolte du café par analyse de la structure des communautés microbiennes

La qualité du café dépend de plusieurs paramètres comme l'espèce et la variété de la plante, les conditions de culture, la saison de récolte, l'origine géographique, le terroir et le savoir-faire humain. La qualité du café peut être accrue ou au contraire, dégradée au cours des traitements post-récolte (Saltini *et al.*, 2013). Nous nous sommes intéressés dans cette partie principalement à l'effet du type de traitement et aux étapes du traitement du café sur la structure des communautés microbiennes associées au produit marchand (café parche/café coque et café vert). L'impact de l'origine géographique et de l'espèce de *Coffea arabica* et *Coffea robusta* a été également abordé. La structure des communautés microbiennes a été analysée par PCR-DGGE.

Les cafés étudiés proviennent de deux pays à savoir le Cameroun et l'Indonésie. En ce qui concerne le café camerounais, une étude préliminaire a été réalisée sur un nombre réduit d'échantillons (récolte mai 2013). Une analyse plus approfondie a été effectuée l'année suivante sur un plus grand nombre d'échantillons représentatifs (récolte mai 2014). Le schéma ci-dessous représente les différentes questions de recherches posées lors de cette étude et la description des échantillons utilisés pour répondre à ces questions (Figure 26).

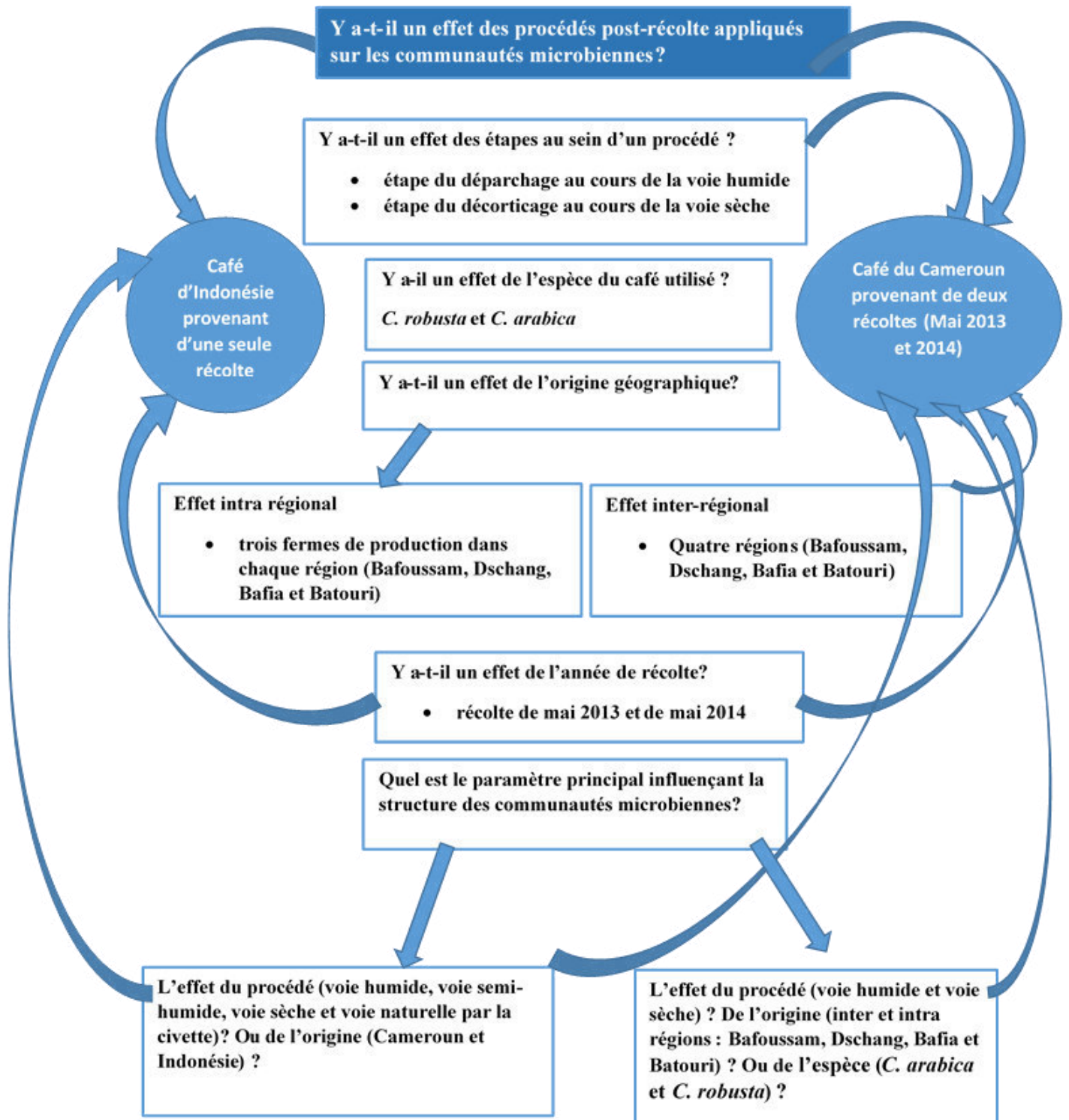


Figure 26 : Schéma représentant les différentes questions de recherche avec les différents échantillons de café utilisés pour répondre à ces questions.

I.1. Étude de la structure des communautés microbiennes associées au café camerounais

L'échantillonnage a été effectué en mai 2014 dans 4 régions du Cameroun (Bafoussam, Dschang, Bafia et Batouri) auprès de trois producteurs (fermes) pour chacune des régions. Les cafés appartiennent à deux espèces *C. arabica* et *C. robusta*. Des cerises de café Arabica traitées par les deux voies de traitement (voie humide et voie sèche) ont été prélevées dans les deux régions situées à l'ouest du Cameroun (Dschang et Bafoussam) tandis que des cerises de café Robusta traitées uniquement par voie sèche ont été collectées à Bafoussam, Dschang, Bafia et Batouri (Figure 27).

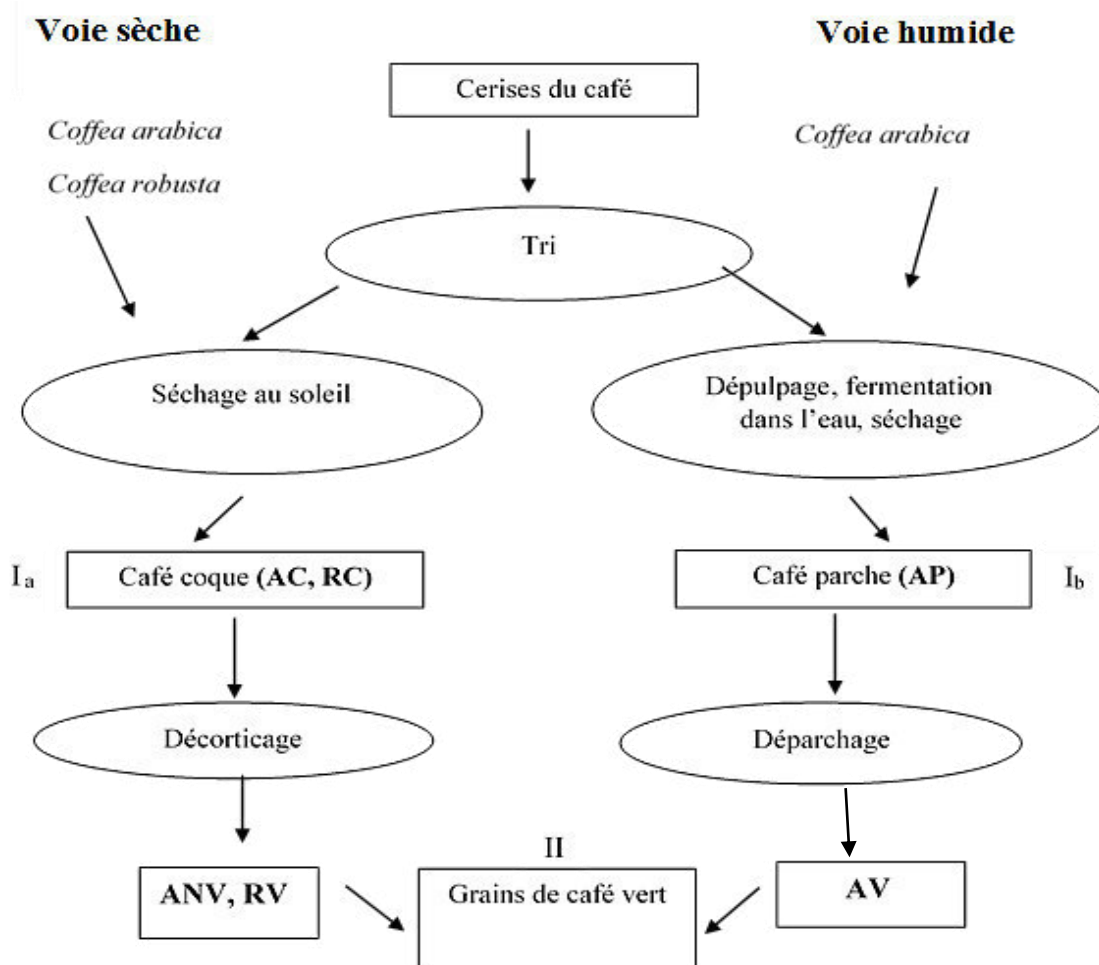


Figure 27 : Étapes des procédés de traitement de café, de la cerise fraîche au grain de café vert au Cameroun, Ia, Ib, II : étapes d'échantillonnage. AC : café coque Arabica, RC : café coque Robusta, AP : café parche Arabica, AV : café vert Arabica (obtenu par voie humide), ANV : café vert Arabica (obtenu par voie sèche) et RV : café vert Robusta.

I.1.1. Variation de la structure des communautés microbiennes en fonction du traitement appliqué

Dans cette partie, nous avons étudié la structure des communautés microbiennes traitées par les deux voies de traitement à savoir la voie humide et la voie sèche.

a) Variations de la structure des communautés bactériennes

Les profils DGGE des cafés obtenus par voie humide et sèche ont été comparés. Au cours de la voie humide, 7 principales bandes d'ADN bactérien sont détectées (*A, B, D, E, T, F, U*) correspondant principalement à des bactéries lactiques (Figure 28.a, Tableau 14). Au cours des deux étapes du procédé, quelques variations sont notées avant (**AP**) et après déparchage (**AV**). Sur tous les sites de Bafoussam, 4 bandes (*A*), (*B*), (*F*) et (*T*) correspondant à *Weissella* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus fermentum* apparaissent sur le café déparché (vert) (**AV**).

Sur les profils du café obtenu par voie sèche (**ANV**), des gammaproteobactéries semblent spécifiques à cette voie comme des souches appartenant à l'espèce *Pseudomonas* sp. (*bande V*), d'entérobactéries (*bande N*) en particulier de *Pantoea* sp. (*bande L*) (Figure 28.b).

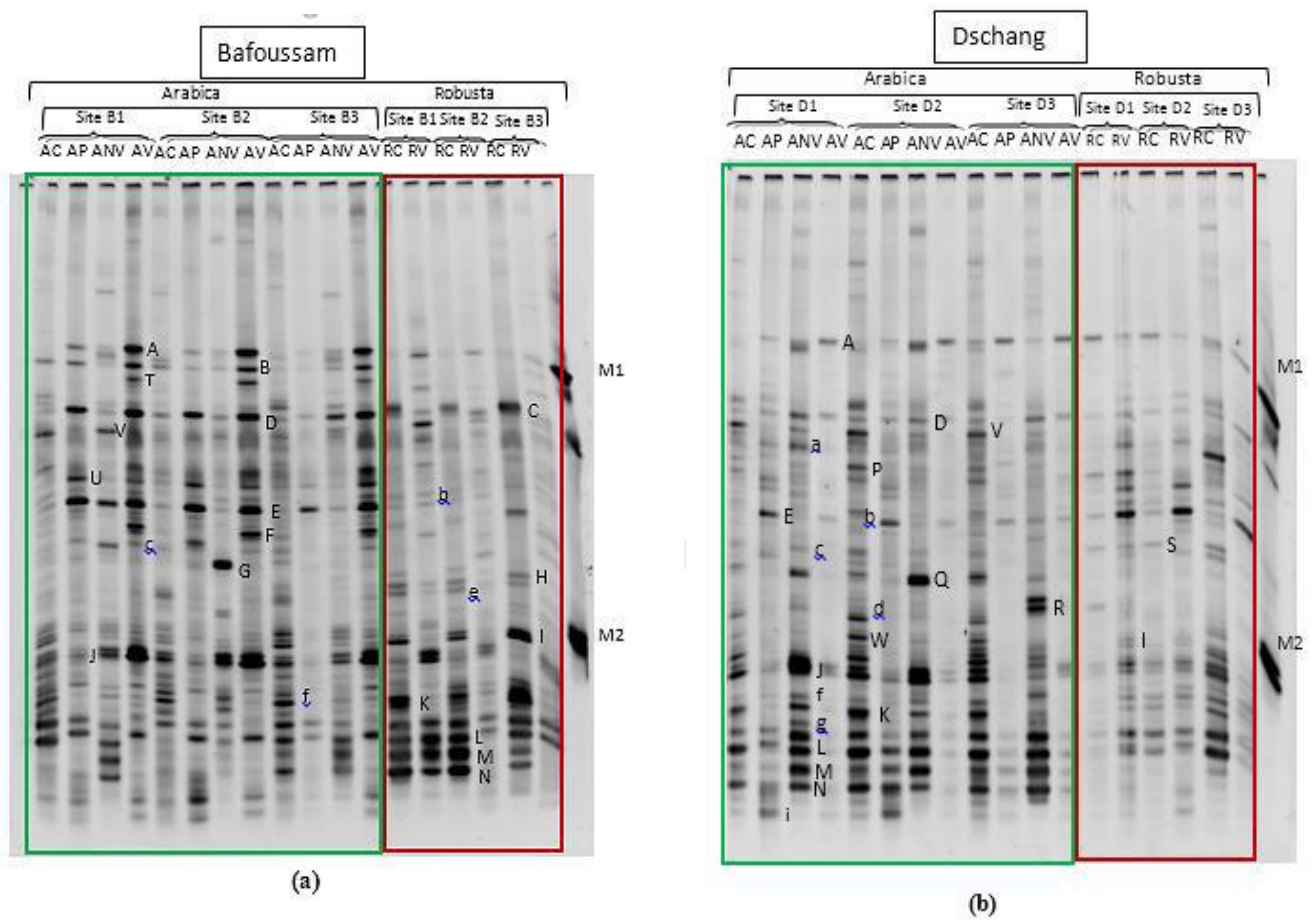


Figure 28 : Profils DGGE des ADN bactériens obtenus à partir des échantillons de cafés lors des deux voies de traitement (voie sèche et voie humide) dans deux régions au Cameroun, Bafoussam (a) et Dschang (b). Sites B1, B2 and B3 correspondent à Bafoussam; Sites D1, D2 and D3 correspondent à Dschang. M1 : ADN *L. plantarum* M2 : ADN *E.coli*.

Identification des bandes Tableau 14.

**Tableau 14 : Identification des bandes d'ADN bactériens issus des profils
DGGE par séquençage de l'ADNr 16S**

Bande	Famille/ Genre/ Espèce	% d'identité	% Query cover	E-value	N° d'accès
A	<i>Weissella sp</i>	96%	100%	5e-52	*
B	<i>Lactobacillus sp</i>	100%	100%	2e-97	*
b	<i>Pseudomonas sp</i>	96%	97%	1e-82	*
c	<i>Pseudomonas sp</i>	99%	100%	1e-95	*
D	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%	100%	1e-50	JQ446513
E	<i>Ralstonia sp</i> <i>Acidovorax sp</i>	99%	100%	2e-60	KP115661 KM056759
F	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	94%	100%	1e-47	DQ171716
I	<i>Microbacterium sp</i>	88%	99%	3e-34	AM779886
J	<i>DNA Chloroplast</i>	100%	100%	1e-51	*
K	<i>Enterobacter sp</i>	99%	100%	1e-95	*
L	<i>Pantoea ananatis or Pantoea sp</i>	100%	100%	2e-97	KM091726 KF358297
M	<i>Enterobacteriaceae</i>	100%	100%	6e-98	LC007911
N	<i>Enterobacteriaceae</i>	100%	100%	2e-97	LC007911
P	<i>Pseudomonas sp</i>	100%	100%	2e-84	*
R	<i>Enterobacteriaceae</i>	100%	100%	6e-98	KM672520
T	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99%	100%	4e-66	HE858545
V	<i>Pseudomonas sp</i>	95%	100%	2e-49	*
W	<i>Citrobacter sp</i>	95%	100%	7e-82	*
S, U, C, P, Q, G, H, a, d, e, f, g, i	NI				

NI : Non identifiée, * : plusieurs n° d'accès sont proposés.

Les profils DGGE obtenus ont été exploités par deux analyses statistiques : Analyse en Composantes principales (ACP) et Analyse Canonique des Correspondances (ACC).

Nous avons appliqué l'ACP dans cette étude pour estimer les variations de la structure des communautés microbiennes entre les échantillons de café. L'ACP réalisée sur les profils bactériens montre deux groupes d'échantillons séparés par l'axe F1 (38.20%), correspondant aux cafés obtenus par voie sèche et par voie humide, respectivement (Figure 29). Les résultats montrent donc que les variations observées sont imputables principalement au type de traitement utilisé.

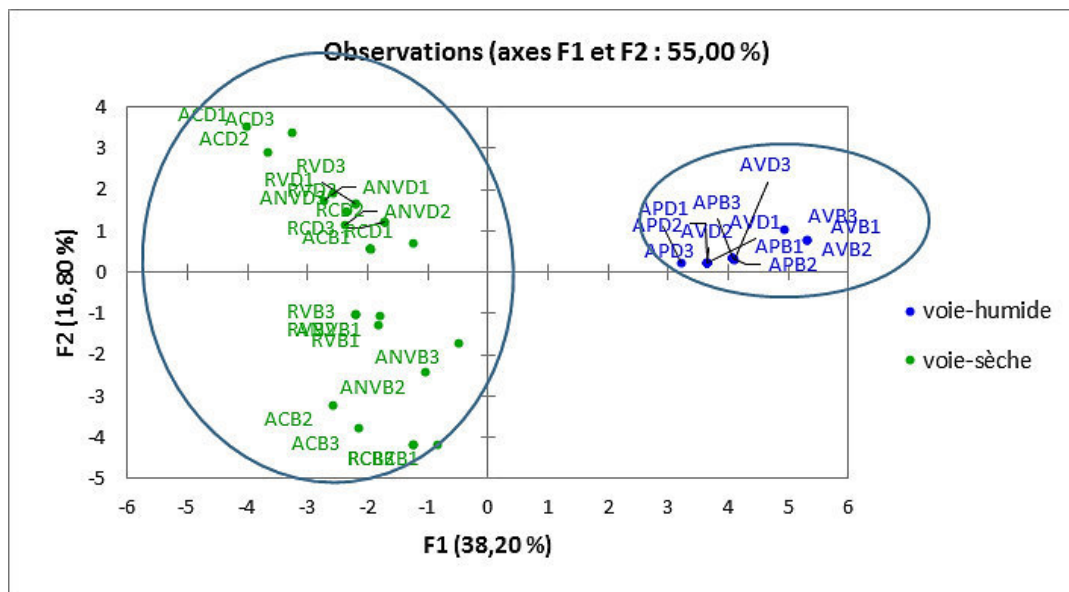


Figure 29 : Analyses en Composantes principales réalisées sur les profils d'ADNr 16S obtenus pour les cafés du Cameroun traités par deux voies de traitements (AP : café parche, AV : café vert) obtenus par voie humide (AC : café coque, ANV : café vert) et voie sèche et du café Robusta (RC : café coque, ANV : café vert) obtenus uniquement par voie sèche, dans 3 fermes (B1, B2 et B3) à Bafoussam et 3 fermes (D1, D2 et D3) à Dschang.

L'analyse ACC a ensuite été appliquée dans le but d'expliquer les variations dans la structure des communautés bactériennes associées au café en reliant les communautés aux différents paramètres comme la voie de traitement et les étapes au sein du traitement (Figure 30). L'ACC réalisée sur les profils DGGE des bactéries permet de discriminer 4 groupes d'échantillons, le premier axe explique 76,07 % de variations des communautés bactériennes entre les cafés obtenus par voie humide et ceux traités par voie sèche (Figure 30). L'ACC a montré une relation forte entre les cafés traités par voie sèche et les genres *Pseudomonas* sp (bandes P, V, c, b), *Microbacterium* sp (I), *Enterobacter* sp (K) et d'autres espèces non identifiées par séquençage (f, G, H) (Figure 30). Nous supposons que les genres *Pseudomonas* et *Microbacterium* sont probablement des communautés spécifiques au café traité par voie sèche étant donné que ces souches ont déjà été détectées au cours de cette voie de traitement dans l'étude préliminaire sur les échantillons récoltés en 2013 et ont déjà été isolées sur les cerises fraîches des cafés (Vega *et al.*, 2005) ce qui explique leur présence sur la coque qui correspond à la cerise séchée. La communauté des *Pseudomonas* est très impliquée dans la dégradation de la caféine des déchets (coque et mucilage) produits lors du traitement du café qui sont utilisés pour l'alimentation des animaux (Mazzafera, 2002). Silva *et al.* (2000) ont déjà isolé des bactéries appartenant à ce

genre au cours de la voie sèche. Par conséquent, il semble que les bactéries du genre *Pseudomonas* puissent être utilisées comme un marqueur du traitement du café par voie sèche. L'ACC a relié les bactéries lactiques (LAB) *Weissella sp* et *Leuconostoc mesenteroides* aux cafés traités par voie humide, ce résultat est répétable sur les deux années de récoltes. D'autres espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (*R*, *N*, *L*) sont également reliées à la voie humide du café. Ces résultats permettent de supposer que les LAB sont de bons marqueurs microbiens de la voie humide, étant donné qu'au cours de cette voie le café est fermenté dans l'eau où les LAB interviennent dans la fermentation lactique (Sven & Walter, 1990). Les LAB ont déjà été retrouvées au cours de la fermentation du café (Avallone *et al.*, 2001 ; Vilela *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'axe secondaire F2 présentait 14,23% de variations dans les communautés bactériennes entre l'étape de séchage (cafés coques **AC** et **RC**) et l'étape après décortilage (café vert **ANV** et **RV**) au cours de la voie sèche. Les échantillons du café obtenus par voie humide (café parche **AP** et café vert **AV**) sont regroupés ensemble ce qui montre l'absence de l'effet du déparchage au cours de la voie humide (Figure 30). Des résultats similaires ont été obtenus sur les cafés récoltés en 2013 (données non présentées). Nous pouvons expliquer le changement des populations bactériennes au cours de la voie sèche par le fait que des microorganismes adhèrent à l'enveloppe (coque ou cerise séchée) très riche en pulpe (contenant sucres, etc..) et permet ainsi le développement microbien. Le décortilage permet l'élimination des micro-organismes présents sur la coque alors que d'autres vont s'installer sur le café vert. L'absence de variations au cours de la voie humide s'explique par le fait que le café parche est protégé par une fine membrane très fragile (parche) qui permettrait le passage des microorganismes vers les grains de café, c'est pourquoi le déparchage n'a montré aucune (ou très peu de) variations au niveau de la structure des populations bactériennes.

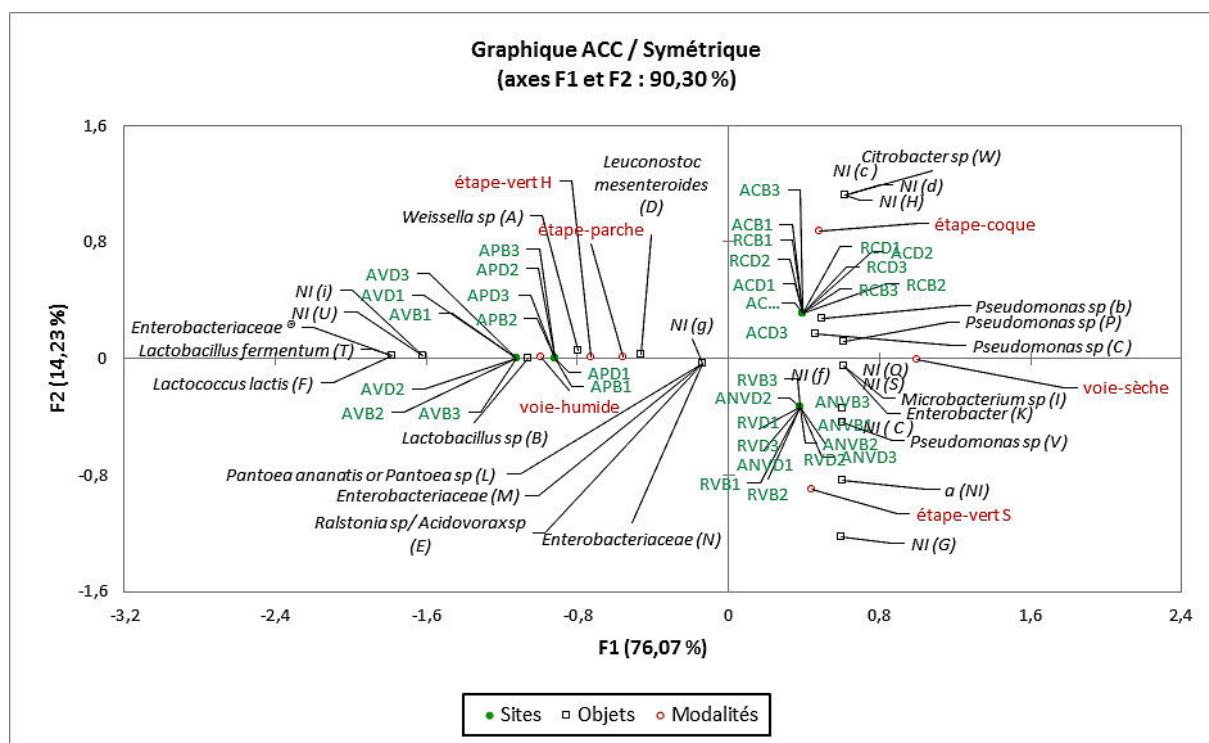


Figure 30 : L'Analyse Canonique des Correspondances (ACC) des profils d'ADN Bactérien montrant l'effet des étapes du traitement du café (AP : café parche, AV : café vert) obtenu par voie humide (AC : café coque, ANV : café vert) et voie sèche et du café Robusta (RC : café coque, ANV : café vert) obtenus uniquement par voie sèche, dans 3 fermes (B1, B2 et B3) à Bafoussam et 3 fermes (D1, D2 et D3) à Dschang. NI : bandes non identifiées

b) Variations de la structure des populations fongiques

Malgré la variation des profils DGGE selon le traitement du café appliqué (Figure 31), on note plusieurs espèces fongiques communes sur les deux voies du traitement du café comme *Hanseniaspora uvarum* (bande C), *Candida quercitrusa* (bande G), *Penicillium* sp (bande X) et une espèce non identifiée (bande S). Neuf espèces sont détectées sur les cafés issus de la voie sèche (bandes K, M, N, P, S, L, J et O, D) dont deux seulement sont identifiées par séquençage, *Sordariomycetes* sp (L), *Meyerozyma (Pichia) caribbica* (J) (Figure 31 + Tableau 15). Six autres espèces sont uniquement présentes sur les échantillons de café traités par voie humide comme *Aspergillus* sp (B), une espèce appartenant à la famille des *Saccharomycetes* (Y) et deux autres espèces non identifiées (V et R). L'abondance des espèces est exprimée par le volume des bandes détectées. Cependant, l'abondance de certaines espèces était différente selon le mode de traitement appliqué comme l'exemple de l'espèce non identifiée (bande F) qui est plus abondante sur les cafés issus de la voie sèche et faible sur ceux issus de la voie humide. La

situation inverse a été observée pour l'espèce *H. uvarum* (C). Des variations au niveau des populations fongiques sont également notées au cours des étapes du traitement. Quelques espèces (bandes B et F) disparaissent au cours de la voie humide après déparchage. C'est le cas d'*Aspergillus* sp (B). La bande ADN correspondant à l'espèce *Sordariomycetes* sp (L) est d'intensité faible sur le café coque (AC) et est intense sur le café vert (ANV), d'autres bandes ADN correspondant à des espèces non identifiées apparaissent seulement après décortiquage (bande T, N). L'espèce (M) a été détectée uniquement sur café coque et n'est plus détectable sur café vert après décortiquage (Figure 31).

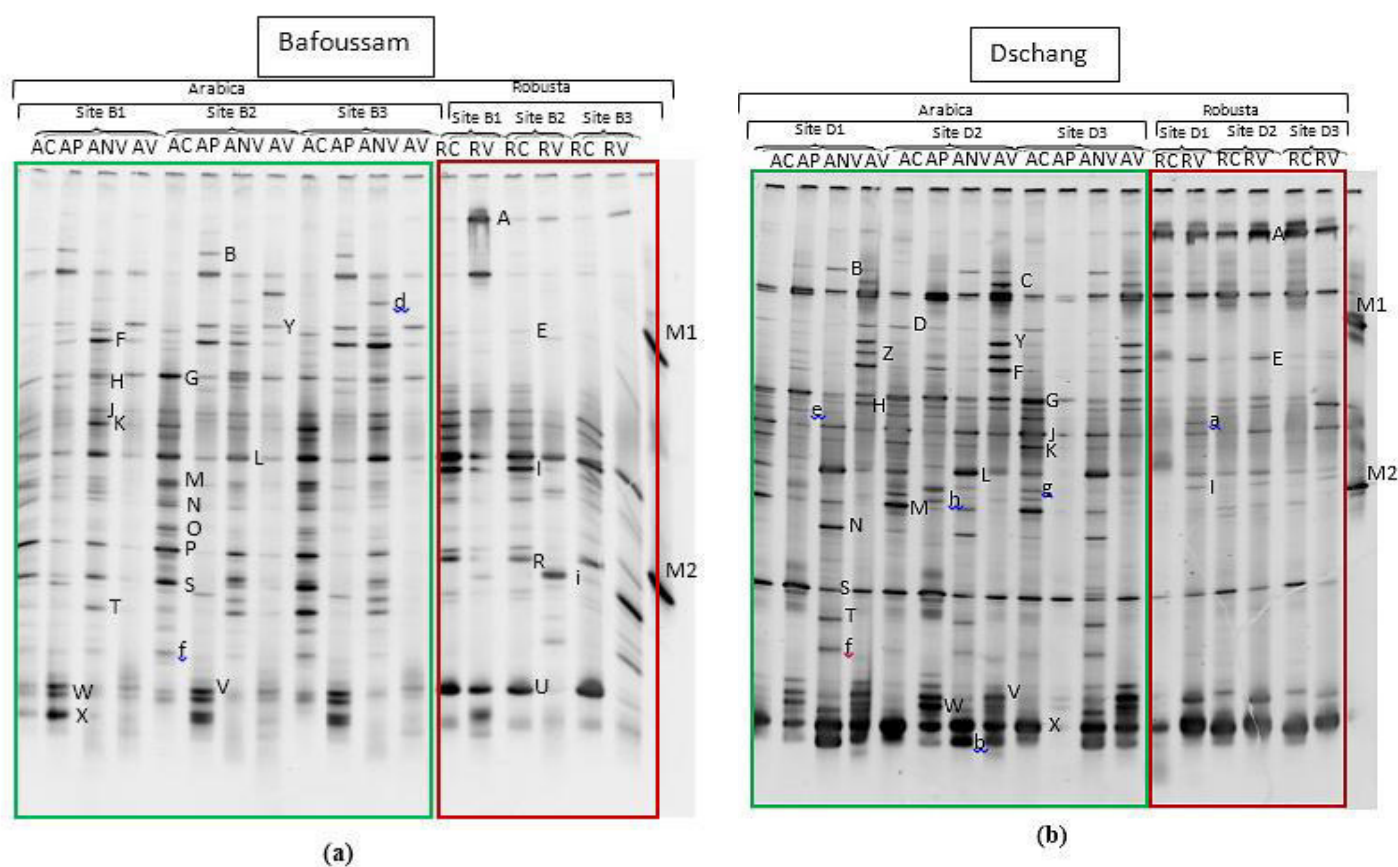


Figure 31 : Profils DGGE des ADN fongiques obtenus à partir des échantillons du café au cours des deux voies de traitement dans deux régions au Cameroun, Bafoussam (a) et Dschang (b). Sites B1, B2 and B3 correspond à Bafoussam ; Sites D1, D2 and D3 correspond à Dschang. M1 : ADN *C. apicola* M2 : ADN *Lodderomyces elongisporus*. Identification des bandes Tableau 15.

**Tableau 15 : Identification des bandes d'ADN fongiques issus des profils
DGGE par séquençage de l'ADN 26S.**

Bande	Famille/ Genre/ Espèce	% d'identité	% Query cover	E-value	N° d'accès
A	<i>Wallemia sp</i>	90%	100%	3e-85	*
B	<i>Aspergillus sp</i>	99%	100%	3e-121	*
C	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	95%	100%	2e-66	KM816754
D	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	99%	100%	3e-122	AB572904
G	<i>Candida quercitrusa</i>	99%	100%	1e-79	KF830174
J	Meyerozyma (Pichia) caribbica	100%	100%	6e-124	KM822611
	<i>M. guilliermondii</i>	100%	100%	6e-124	KF359926
L	<i>Sordariomycetes sp</i>	99%	100%	6e-117	JX174148
U	<i>Aspergillus</i>	100%	100%	9e-125	*
X	<i>Penicillium</i>	99%	100%	6e-77	*
Y	<i>Saccharomycetes</i>	91%	100%	1e-42	KP012325
B, E, F, M, H, I, N, O, P, R, K, S, T, V, W, Z, a, c, d, e, f, g, h, i, f	<i>NI</i>				

NI : Non identifiée, * : plusieurs n° d'accès sont proposés.

L'analyse ACP effectuée sur les profils fongiques (ARNr 26S) nous a permis de discriminer les cafés selon le traitement appliqué et selon un autre paramètre (espèce de café) qui va être étudié dans la prochaine partie (Figure 32). Ces résultats suggèrent que la composition des populations microbiennes est influencée par le mode de traitement post-récolte appliqué.

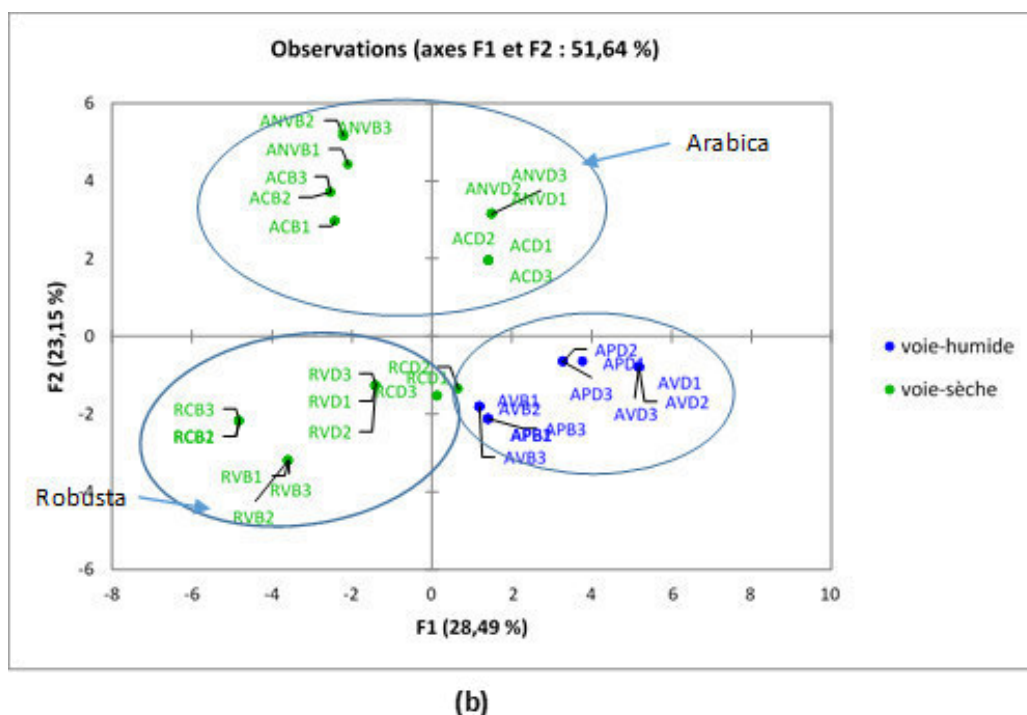


Figure 32 : Analyses en Composantes principales réalisées sur les profils d'ADN 26S obtenus des cafés du Cameroun traités par deux voies de traitements (AP : café parche, AV : café vert) obtenus par voie humide (AC : café coque, ANV : café vert) et voie sèche et du café Robusta (RC : café coque, ANV : café vert) obtenu uniquement par voie sèche, chez 3 producteurs (B1, B2 et B3) à Bafoussam et 3 producteurs (D1, D2 et D3) à Dschang.

L'analyse par ACC effectuée sur les profils fongiques a permis de distinguer 4 groupes de cafés (Figure 33) : les cafés parches (voie humide), les cafés verts (voie humide), les cafés coques (voie sèche) et les cafés verts (voie sèche). L'axe 1 explique 72,00% de variations des communautés fongiques entre le café obtenu par voie sèche et le café traité par voie humide. L'ACC relie la souche de *Penicillium sp* (X), à celle appartenant à la classe des *Saccharomycetes* (Y), et les espèces non identifiées par séquençage (c, Z, B, G, W, V) provenant du procédé par voie humide. Les espèces de la famille des *Saccaromycetes* sont impliquées dans la fermentation alcoolique ce qui peut expliquer leur présence sur le café traité par voie humide qui comprend une étape dite de fermentation. Le genre *Saccharomyces* a déjà été isolé au cours de la fermentation du café traité par voie semi-humide (Vilela *et al.*, 2010). L'axe F2 à décrit 17,36% des successions des communautés fongiques sur les étapes des deux traitements (Figure 33). L'ACC réalisée sur les profils fongiques nous a montré l'effet du déparchage au cours de la voie humide. L'ACC a raccordé plus d'espèces fongiques sur le café vert obtenu par les deux voies de traitement ; cela est peut-être dû à l'installation des autres communautés

fongiques par les manipulations et les matériels utilisés pour le déparchage et le décortiquage. L'ACC nous a permis de combiner les espèces fongiques aux étapes du procédé, en revanche, la plupart de ces espèces n'ont pas été identifiées par séquençage, du fait de la faible concentration d'ADN extraite du gel DGGE.

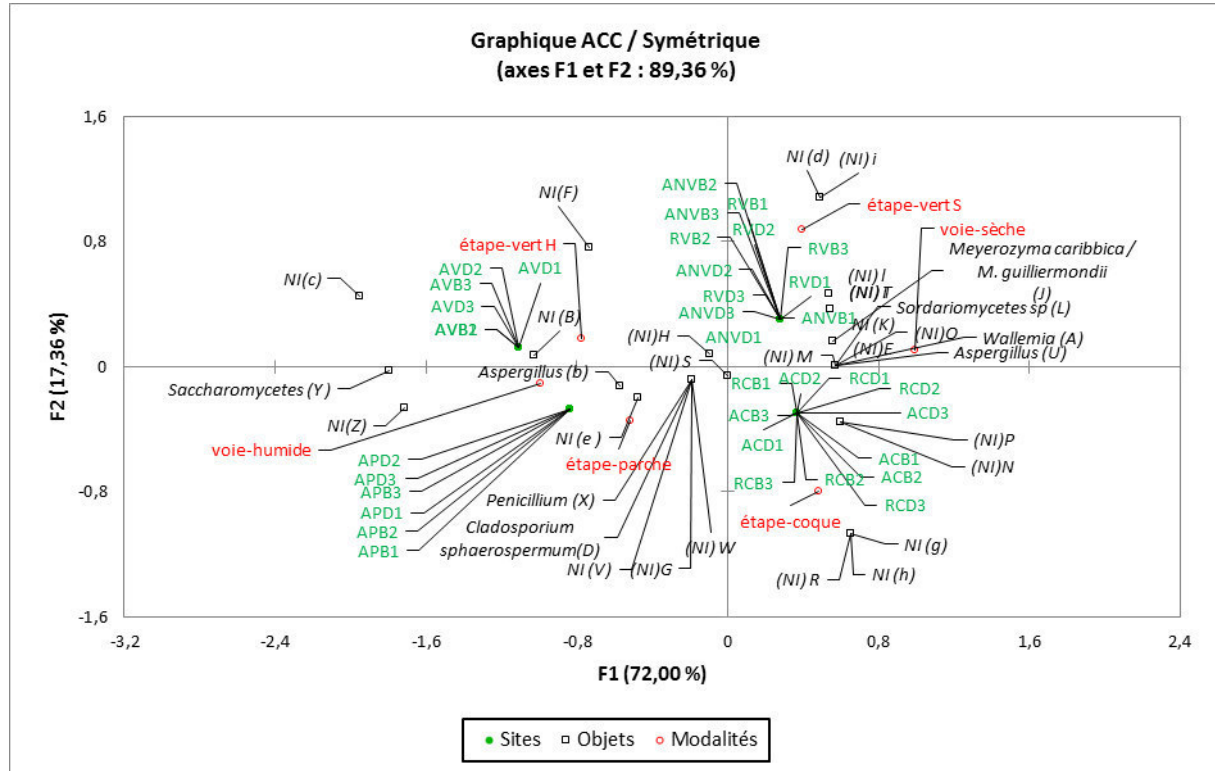


Figure 33 : Analyse Canonique des Correspondances (ACC) des profils d'ADN fongique montrant l'effet des étapes du traitement du café (AP : café parche, AV : café vert) obtenu par voie humide (AC : café coque, ANV : café vert) et voie sèche et du café Robusta (RC : café coque, ANV : café vert) obtenu uniquement par voie sèche, dans 3 fermes (B1, B2 et B3) à Bafoussam et 3 fermes (D1, D2 et D3) à Dschang. NI : bandes non identifiées.

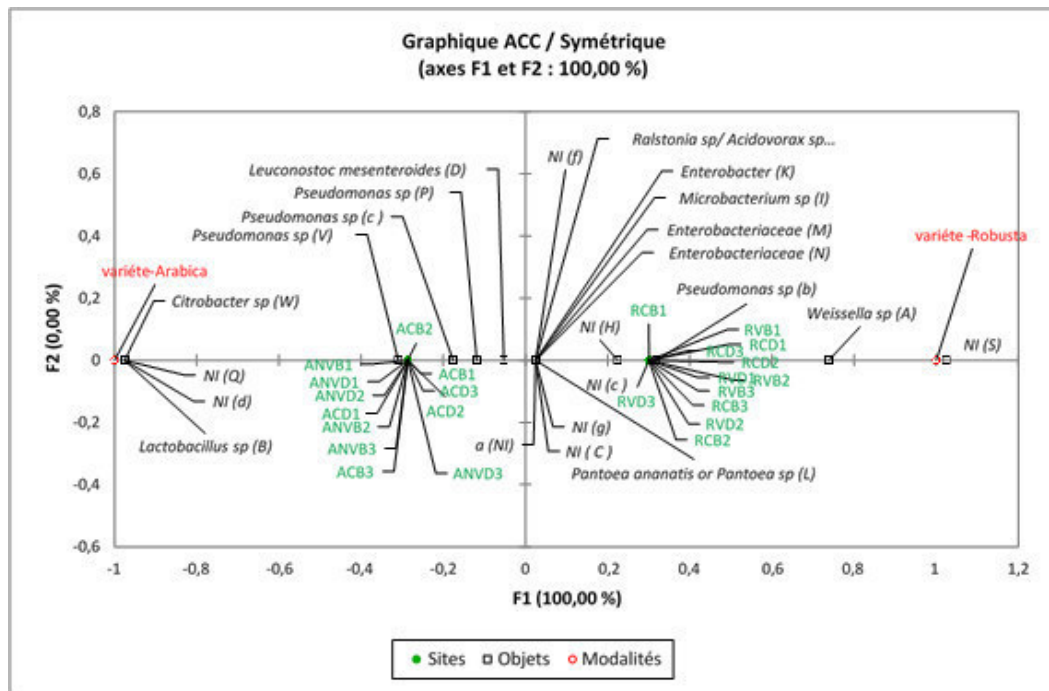
1.1.2. Variation de la structure des communautés microbiennes en fonction de l'espèce de café analysée

La structure de l'écologie microbienne est analysée sur deux espèces de cafés *C. arabica* et *C. robusta*. La plupart des espèces bactériennes communes entre ces deux espèces de café sont (situées au bas du gel DGGE) *Pantoea ananatis* ou *Pantoea sp.* (L), *Enterobacter sp.* (K), et les deux espèces appartenant aux *Entérobactériaceae* (Figure 28). On observe 4 bandes (S, C, H, I) qui semblent spécifiques du café Robusta dont (I) est identifiée comme *Microbacterium sp.* (Figure 28). Les profils DGGE de l'ADN fongique des cafés Robusta présentent quelques variations par rapport aux cafés Arabica. L'espèce la plus remarquable est *Wallemia sp* (bande

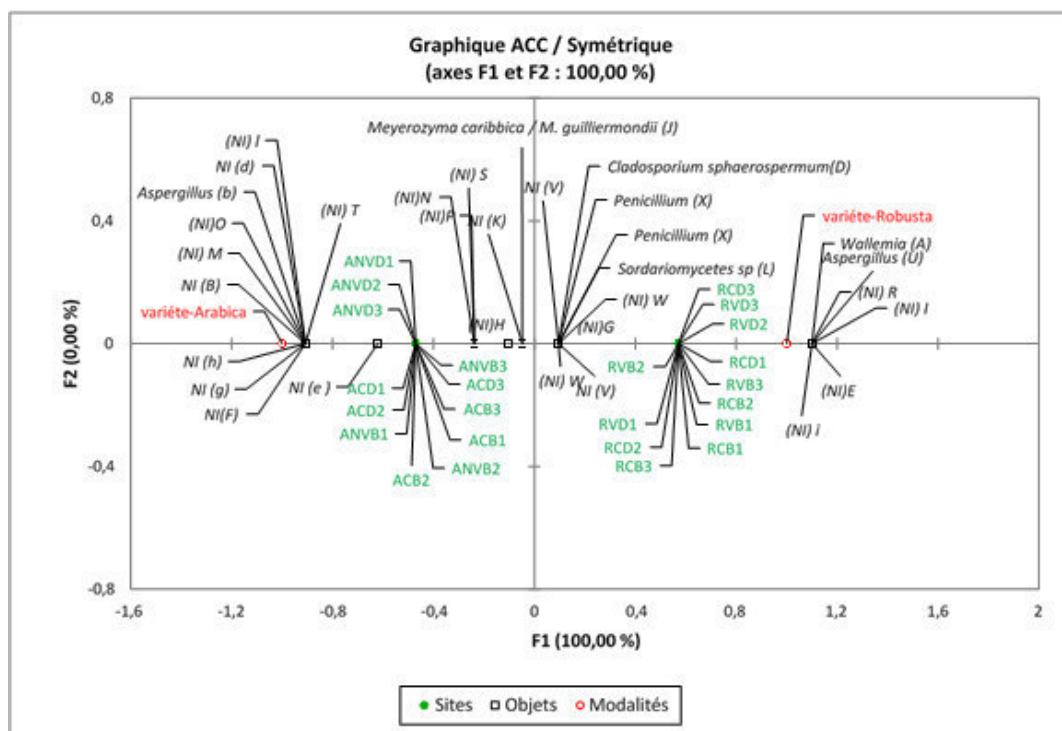
A) située en haut du gel DGGE (Figure 31). D'autres bandes ADN sont également présentes sur les profils de café Robusta comme (*I*, *i*, *E*) (Figure 31).

Les axes de l'ACC sont déterminés par rapport au nombre de variables explicatives étudiées. Sur cette analyse, un seul axe F1 (100%) a été défini par rapport à la seule variable ciblée qui est l'espèce du café (Figure 34). Cet axe a permis de discriminer les deux espèces du café Arabica et Robusta et d'établir les relations entre l'espèce du café et les communautés bactériennes et fongiques associées.

Les genres bactériens *Citrobacter* sp (*W*) et *Lactobacillus* sp (*B*), ainsi que les espèces non séquencées (*Q*, *d*) sont reliées à l'Arabica alors que *Weissella* sp (*A*) et l'espèce bactérienne (*S*) sont associées au Robusta (Figure 34.a). Pour ce qui est des communautés fongiques, *Wallemia* sp (*A*), *Aspergillus* (*U*), et les espèces non identifiées (*R*), (*I*), (*E*) et (*i*) sont rapprochées au Robusta et les espèces fongiques (*F*, *B*, *M*, *O*, *I*, *T*, *g*, *h*, *d*, *b*) sont associées à l'Arabica (Figure 34.b). Les variations observées sur les communautés microbiennes associées aux deux espèces du café sont peut être liées aux variations de la composition chimique des deux espèces de café (Oestreich-Janzen 2010).



(a)



(b)

Figure 34 : Analyse Canonique des Correspondances (ACC) des profils d'ADN Bactérien. (a) et fongique (b) montrant l'effet des variétés du café (AP : café parche, AV : café vert) obtenus par voie humide (AC : café coque, ANV : café vert) et voie sèche et du café Robusta (RC : café coque, ANV : café vert) obtenus uniquement par voie sèche, dans 3 fermes (B1, B2 et B3) à Bafoussam et 3 fermes (D1, D2 et D3) à Dschang. NI : bandes non identifiées.

1.1.3. Variation de la structure des communautés microbiennes en fonction de l'origine géographique

Une analyse globale de l'écologie microbienne a été réalisée sur des échantillons de café vert Robusta obtenu par voie sèche et prélevés dans 3 fermes pour chaque région au Cameroun: Bafoussam (B1, B2 et B3), Dschang (D1, D2 et D3), Bafia (F1, F2 et F3) et Batouri (T1, T2 et T3) (Figure 35).

Les régions sont éloignées l'une de l'autre (elles sont situées dans les régions de l'Ouest (Bafoussam, Dschang) du centre (Bafia) et de l'Est (Batouri). Les distances séparant les fermes sont respectivement :

Bafoussam : entre le site B1 et le B2 : 12 km ; entre les sites B2 et B3 : 10 km

Dschang : entre D1 et D2 : 7 km ; entre D2 et D3 : 5 km

Bafia : entre F1 et F2 : 5 km; entre F2 et F3 : 7 km

Batouri : entre T1 et T2 : 4 km; entre T2 et T3 : 5 km

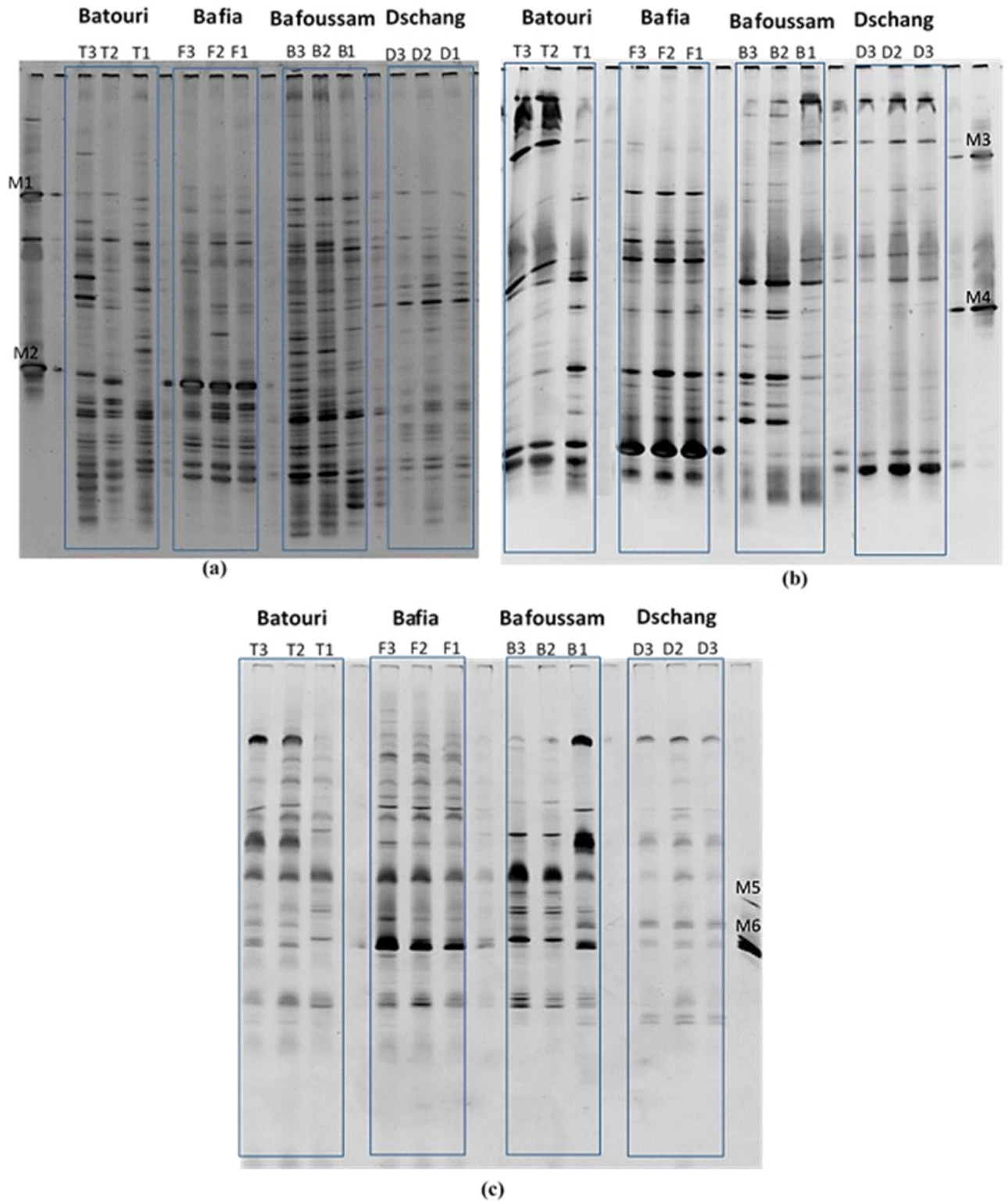


Figure 35 : Profils DGGE des ADN bactériens (a), des levuriens (b) et des moisissures (c) extraits du café vert Robusta. L'ADN marqueur : M1 : *L. plantarum*, M2 : *E. coli*, M3 : *C. apicola*, M4 : *Lodderomyces elongisporus*, M5 : *Alternaria alternata*, M6 : *A. niger*.

➤ **Profils DGGE des ADN bactériens**

Les profils d'ADNr 16S obtenus à partir du café vert provenant des quatre régions ont été étudiés (Figure 35.a). Au sein d'une même région, nous observons 3 profils qui correspondent aux cafés provenant des 3 fermes (producteurs). Le nombre de bandes ADN (phylotypes) détectées sur la région de Dschang varie de 20 à 29 avec 17 bandes communes entre les 3 fermes. A Bafoussam, 15 à 21 bandes sont observées avec 14 bandes communes entre les 3 fermes (Figure 35.a). 15 à 17 bandes ont été détectées sur le café provenant de Bafia avec 15 bandes en commun entre les 3 sites. Les profils obtenus sur les échantillons provenant de Batouri présentent 17 à 28 bandes avec 12 bandes communes entre les 3 fermes. Environ 14 bandes sont communes entre les quatre régions (Figure 35.a). A 45% de similarité (Figure 36.a), deux groupes principaux ont été observés : le premier groupe comprenait les échantillons provenant du Dschang et le deuxième groupe les échantillons provenant de Bafia, Batouri et Bafoussam. Les cafés provenant Bafia sont séparés (50%) par rapport à ceux qui proviennent des deux autres régions (Batouri et Bafoussam qui ont une similarité de 60%).

Nous observons que les profils DGGE des cafés de Dschang, de Bafia sont différents de ceux de Batouri et Bafoussam. Les cafés issus de 3 fermes de chaque région se regroupent dans un même cluster à 70% pour les sites de Batouri, à 90% pour Bafoussam, à 80% pour les sites de Bafia et 90% pour les cafés de Dschang (Figure 36.a). Ces résultats montrent que les cafés issus des sites d'une même région ont tendance à avoir une plus grande similarité entre eux qu'avec ceux d'autres régions.

➤ **Profils DGGE des ADN fongiques des levures (26S ADNr ciblé)**

Le nombre de bandes d'ADN de levures détectées à Batouri varie entre 11 et 15 avec 9 bandes en commun entre les 3 sites. A Bafia, 13 bandes communes sont présentes sur les 3 profils. 13 bandes sont présentes et communes sur les 3 fermes de la région Dschang. Le nombre de bandes varie de 12 à 14 bandes, et 7 bandes sont considérées communes sur les profils des cafés provenant de Bafoussam. 7 bandes sont communes entre les 4 régions (Figure 35.b). Sur le café provenant de Bafia et Dschang nous observons des profils similaires pour les 3 fermes, tandis que dans les deux régions Batouri et Bafoussam, plus de variations entre les profils des 3 sites sont observés. A 62% de similarité (Figure 36.b), Deux groupes principaux apparaissent, un regroupe les cafés de Bafoussam et Batouri et le deuxième groupe comprend les cafés provenant de Bafia et Dschang. Comme observé sur les profils bactériens, les cafés de Bafoussam et Batouri présentent plus de similarité par rapport aux autres régions, malgré leur éloignement géographique. Ce résultat s'accorde avec les résultats de notre étude préliminaire. Les cafés

issus de fermes d'une même région se regroupent dans le même cluster, à 74% pour Bafoussam, à 93% pour Batouri, à 90% pour Dschang et à 100% à Bafia. Cela montre que l'écologie levurienne des cafés provenant des fermes au sein d'une même région est très proche.

➤ **Profils DGGE des ADN fongiques de moisissures (28S ADNr ciblé)**

Entre 8 et 10 bandes sont trouvées sur le café provenant de Batouri avec 5 bandes communes entre les sites. Le nombre varie de 12 à 15 à Bafia avec 12 bandes communes. Entre 11 et 12 et entre 8 et 10 bandes sont détectées respectivement à Bafoussam et Dschang avec 8 bandes communes entre les fermes de chaque région. 7 bandes sont communes entre les 4 régions (Figure 35.c). Les profils DGGE des ADN de moisissures montrent quelques variations au niveau des 3 sites pour chaque région et présentent plus de bandes ADN en commun entre les régions par rapport aux profils des ADN bactériens des levuriens.

L'analyse statistique des profils des moisissures a séparé à 52% de similarité deux principaux clusters, contenant d'une part les cafés de Dschang et Bafoussam et les cafés provenant de Bafia et Batouri d'autre part (Figure 36.c). Le pourcentage de similarité entre les clusters regroupant les régions est variable pour les 3 profils DGGE obtenus à partir des trois types de souches, en effet chaque famille de microorganisme a un impact différent (Figure 36). Pour l'analyse des moisissures, les fermes provenant de la même région se regroupent dans le même cluster à des pourcentages de similarité presque similaires à ceux obtenus sur les profils d'ADN des levures, à 78% pour Bafoussam, à 89% pour Batouri, à 90% pour Dschang et à 95% à Bafia (Figure 36.c). Le degré de similarité entre les fermes de chaque région peut être expliqué par la distance entre les sites par exemple à Bafoussam, la distance entre le site 1 et 2 est de 12 Km, entre 2 et 3 10 Km, et à Dschang, 7 Km sont mesurés entre le site 1 et le site 2 et 5Km entre le site 2 et le site 3. On suppose que la variation entre les profils des 3 fermes de chaque région augmente avec la distance.

Ces résultats nous ont conduits à conclure que l'écologie microbienne du café varie selon l'origine géographique. Les différents groupes de populations (bactéries, levures et moisissures permettent d'obtenir des regroupements différents entre les régions en ciblant chaque famille de microorganismes. Nos résultats se corrèlent avec les résultats de notre équipe obtenus par Nganou Donkeng *et al.* (2012) qui ont précédemment employé la PCR-DGGE pour déterminer l'origine du café au Cameroun en ciblant l'ADN fongique (ADNr 28S). Ils ont montré que la structure des communautés fongiques associées aux cafés variait selon l'origine.

Il a été remarqué que la flore fongique, soit levure ou moisissure, contribue plus à la discrimination de l'origine géographique de café. La famille des moisissures regroupe les régions et les fermes au sein d'une même région selon la distance.

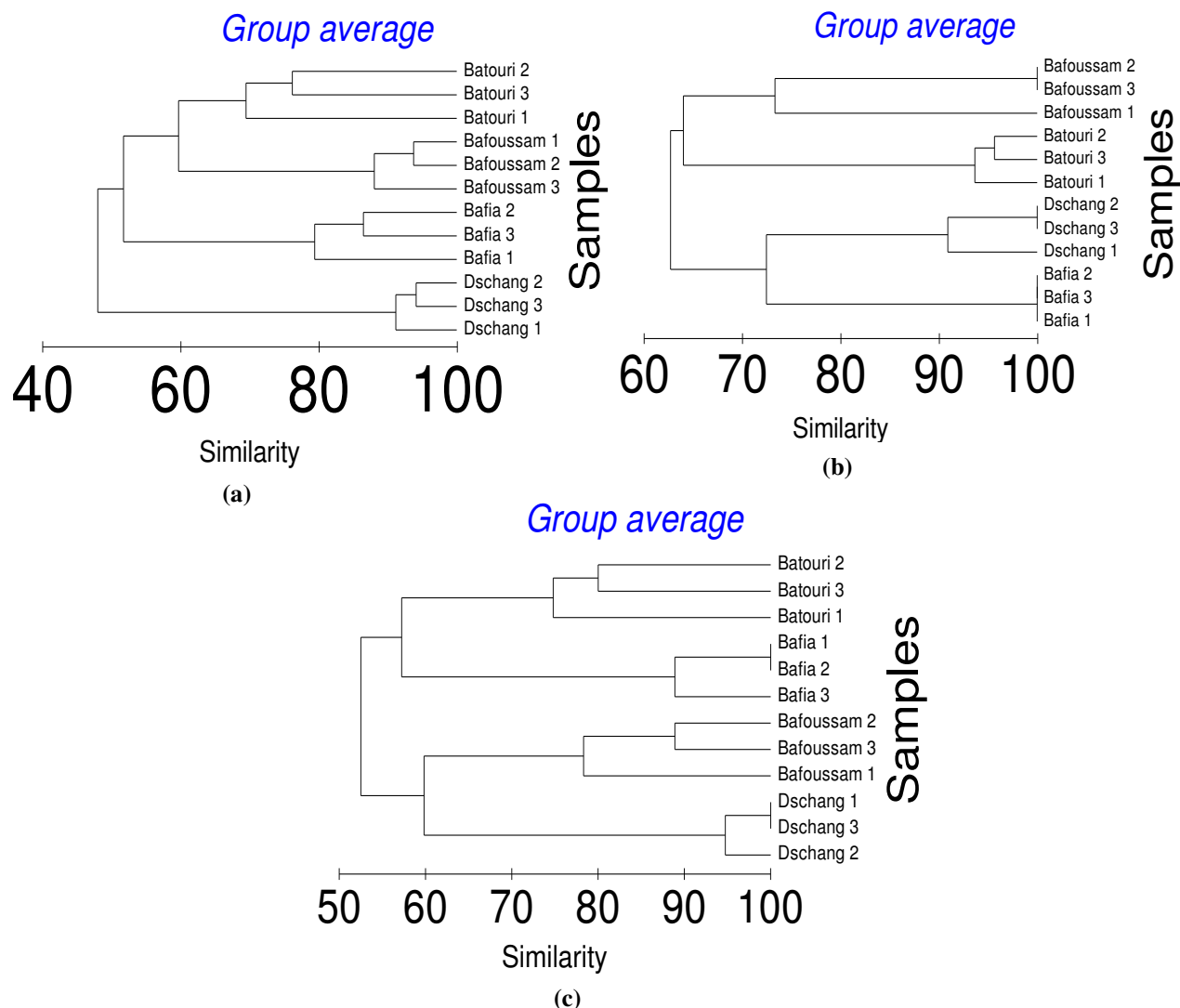


Figure 36 : Dendrogrammes par analyse Cluster des profils DGGE des ADN bactérien (a), fongique (26S ADNr) (b) et (28S ADNr) (c).

1.1.4. Étude combinée des paramètres influençant la structure des populations microbiennes

Les Analyses par ACC précédemment appliquées sur les profils DGGE ont montré que les traitements, les étapes de traitement (principalement le décorticage), l'origine géographique et l'espèce ont un impact sur l'écologie microbienne du café. Dans le but de hiérarchiser le niveau d'impact de chaque paramètre, une analyse de classification ascendante hiérarchique (CAH) a été réalisée sur l'ensemble des profils DGGE des ADNs bactériens et fongiques.

L'analyse sur les communautés bactériennes et fongique donne deux clusters principaux à faible pourcentage de similarité respectivement à 50% (Figure 37.a) et 48% (Figure 37.b), l'un regroupe les cafés obtenus par voie sèche et l'autre rassemble les cafés traités par voie humide (Figure 37).

Pour les communautés bactériennes, les échantillons de cafés issus de la voie sèche se divisent en deux classes à 73% de similarité ; la première classe regroupe les cafés provenant de Dschang et la deuxième comprend les cafés originaires de la région Bafoussam. Par exemple les cafés de Dschang sont séparés selon l'espèce (Arabica et Robusta) à 80% de similarité (Figure 37.a).

Pour les communautés fongiques, le cluster regroupant les cafés traités par voie sèche est subdivisé en deux classes à 67% de similarité selon l'origine géographique du café. Chaque cluster regroupant les cafés de chaque région est subdivisé en deux sous-classes à environ de 70 à 73% de similarité ; la première représente le café Arabica et la deuxième comprend le café Robusta. Chaque sous-classe sépare à 83% de similarité les cafés coques et les cafés verts (Figure 37.b).

Le cluster qui regroupe les cafés obtenus par voie humide se divise également en deux classes qui correspondent aux deux régions à 73% de similarité (Figure 37.b). Les deux classes regroupent deux sous-classes entre 88 et 90% de similarité qui représentent le café parche et le café vert. Dans chaque région les cafés provenant de 3 fermes sont regroupés environ à 95% de similarité (Figure 37).

Cette analyse nous a permis de mesurer l'impact des paramètres sur l'écologie microbienne principalement sur l'écologie fongique. Nous avons pu déterminer que le traitement appliqué (voie sèche ou humide) est le principal facteur influençant les communautés bactériennes, suivi de l'origine géographique, de l'espèce du café et le dernier facteur est l'étape du décortilage pour la voie sèche. Nos résultats s'accordent avec notre étude préliminaire (non détaillée ici) et l'étude menée par Durand *et al.* (2012) qui ont montré une variation des communautés ochratoxinogènes en fonction des traitements post-récolte appliqués. Nous avons également montré l'effet de l'étape de décortilage au cours de la voie sèche et l'absence d'impact mesurable du déparchage sur l'écologie microbienne au cours de la voie humide. Ces résultats sont concordants avec ceux de Silva *et al.* (2000). L'étude réalisée sur les cafés récoltés en Mai 2014 nous a informés sur le fait que l'espèce de café utilisé peut influencer l'écologie microbienne. Les communautés microbiennes associées aux cafés issus d'une même région présentent peu de variations.

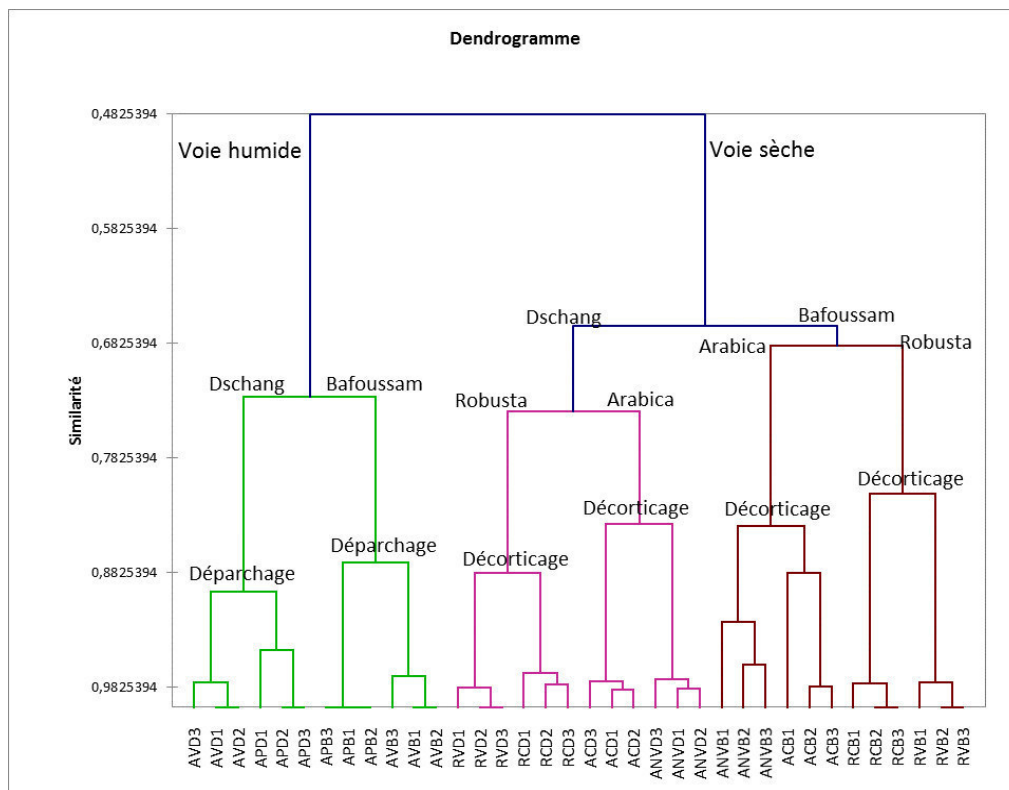
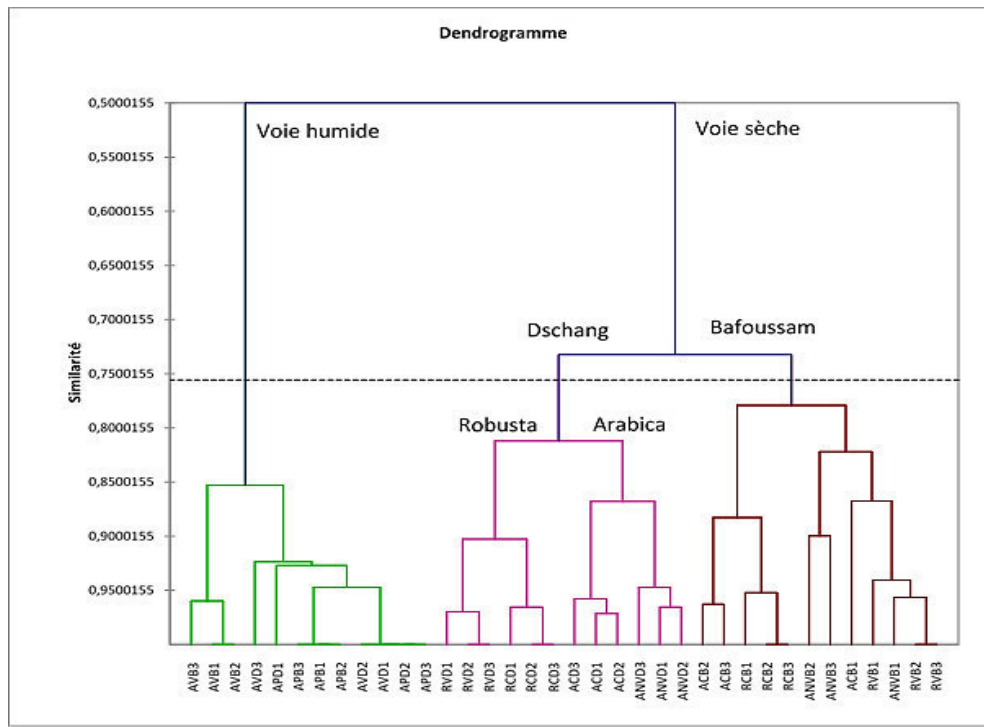


Figure 37 : Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) de l'ensemble des profils d'ADN bactérien (a) et fongique (b) obtenus à partir des cafés Camerounais.

1.1.5. Dynamique des communautés microbiennes au cours des deux années de récolte

Les résultats obtenus lors de l'étude préliminaire sur le café de 2013 ainsi que l'étude sur le café de 2014 nous ont orientés vers les mêmes conclusions. La diversité microbienne varie en fonction du traitement, de l'étape du traitement, de l'origine et de l'espèce du café. Cependant, nous avons voulu déterminer si les communautés microbiennes varient aussi au cours du temps. Pour cela, une analyse comparative a été appliquée sur les profils DGGE des ADN bactériens (ADNr 16S) et fongiques (ADNr 26S et 28S) extraits du café Arabica obtenus au cours de la voie humide récoltés en 2013 et 2014 dans la ferme (site) B1 à Bafoussam et D1 à Dschang.

➤ **Profils DGGE des ADNr bactériens 16S**

L'analyse comparative a été réalisée sur les deux dernières étapes au cours du traitement par voie humide : le café parche (AP) et le café vert (AV). Chaque étape a été comparée pour les deux années de récolte (Figure 38.a). A Bafoussam, 9 bandes ADN ont été détectées en 2013 et 2014 sur le café parche, avec 4 bandes en commun entre les deux années. Sur le café vert, 10 et 14 bandes ont été observées respectivement en 2013 et 2014, avec 6 bandes communes entre les deux années de récolte (Figure 38.a). A Dschang, 20 et 30 bandes ont été respectivement révélées sur le café parche, avec 10 bandes communes entre les deux années. 24 et 25 bandes ont été respectivement observées en 2013 et 2014 sur le café vert. Ces résultats montrent que globalement les communautés bactériennes persistent entre deux récoltes. Sur l'analyse des profils bactériens, l'effet de l'origine est plus important que l'effet du temps.

➤ **Profils DGGE des ADNr 26S**

A Bafoussam, 17 et 21 bandes ont été détectées en 2013 et 2014 respectivement sur le café parche avec 13 bandes communes tandis que sur le café vert, 17 et 16 bandes ont été observées respectivement en 2013 et 2014, avec 13 bandes en commun (Figure 38.b). Dans la région Dschang, sur le café parche, 11 et 19 bandes ont été respectivement observées avec 8 bandes communes, et sur les cafés vert, 10 et 16 bandes ont été détectées respectivement en 2013 et 2014 avec 9 bandes communes. Les communautés des levures persistent au cours des deux années de récolte (2013 et 2014) et présentent peu de variations par rapport aux bactéries car le nombre de bandes (donc de phylotypes) de levures communes est plus élevé que celui des bactéries.

➤ **Profils DGGE des ADNr 28S**

Sur le café parche, 14 et 13 bandes ont été observées respectivement à Bafoussam en 2013 et 2014, avec 11 bandes communes, et 12 et 13 bandes ont été respectivement détectées en 2013 et 2014 sur le café vert (Figure 38.c). A Dschang, sur le café parche, 10 et 12 bandes ont été détectées de manière respective en 2013 et 2014, avec 7 bandes communes, et sur les cafés verts 14 et 12 bandes étaient respectivement présentes en 2013 et 2014 avec 8 bandes en commun. Les résultats sur la flore des moisissures nous orientent vers les mêmes conclusions précédentes en montrant que les communautés persistent au cours du temps de récolte et présentent quelques variations.

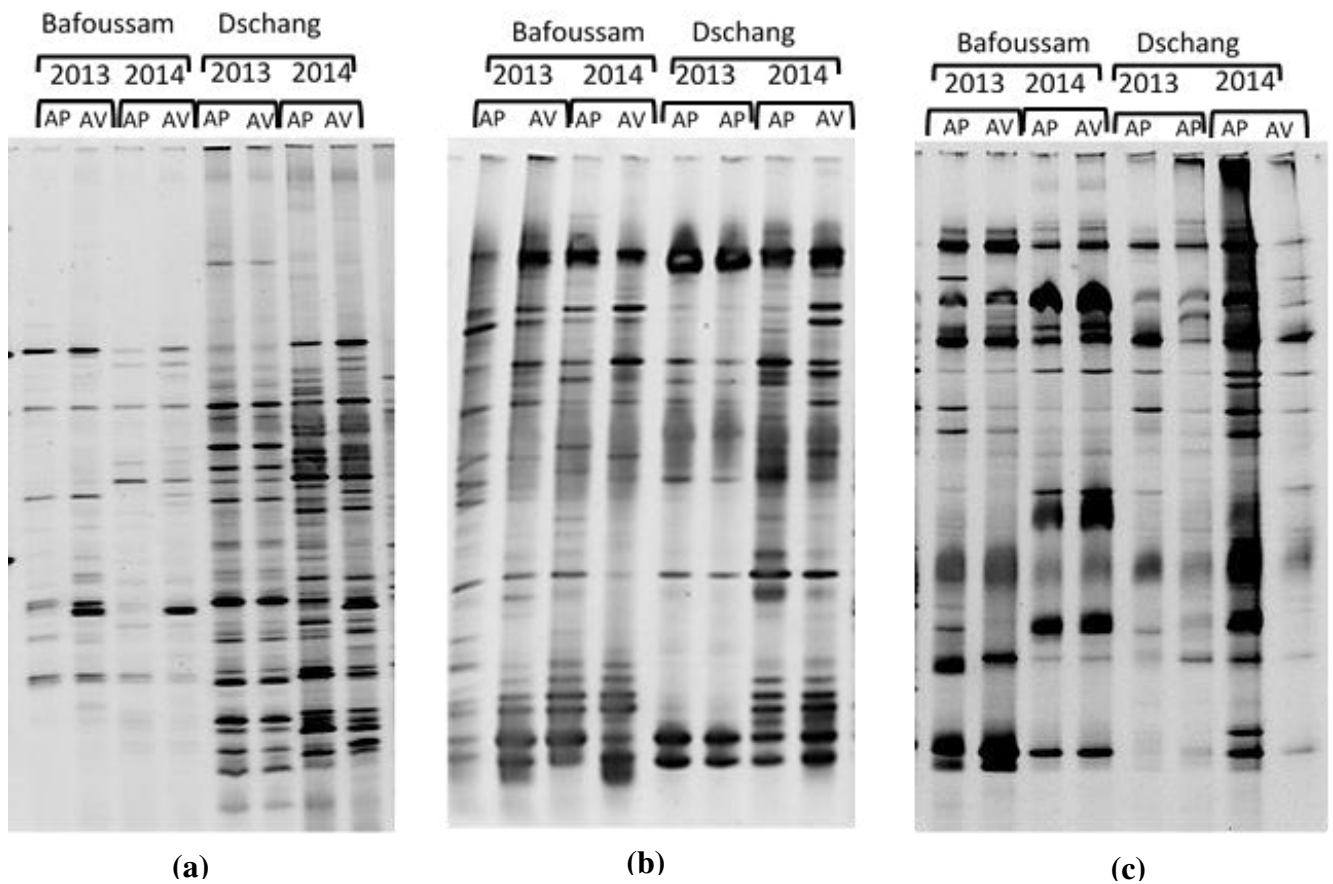
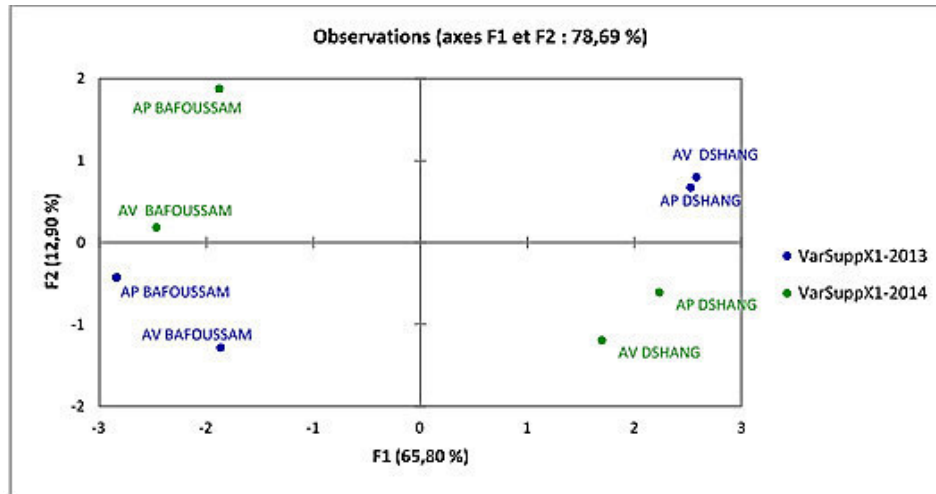


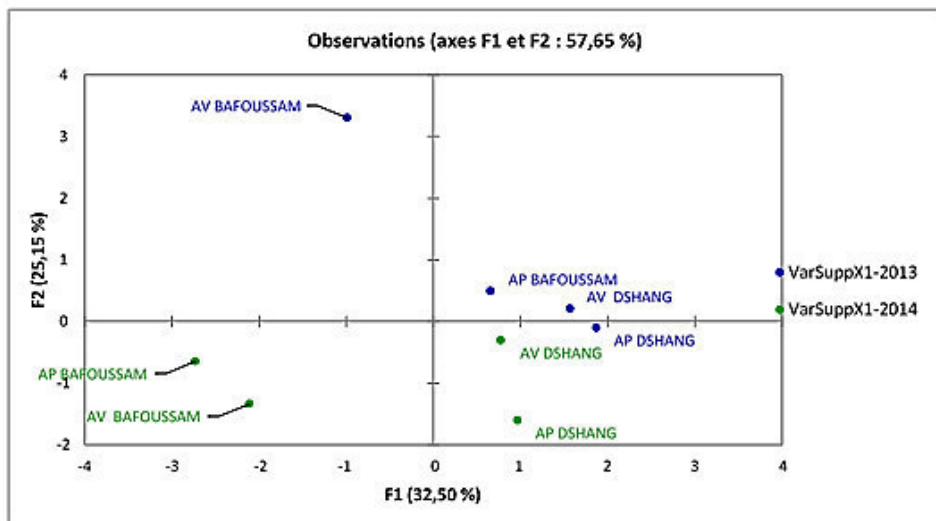
Figure 38 : Profils DGGE de l'ADN des bactéries (a), des levures (ADNr 26S) (b) et des moisissures (c) extraits à partir des cafés Arabica récoltés en 2013 et 2014.

Une analyse ACP a été réalisée sur les profils DGGE des ADNr 16S, ADNr 26S et ADNr 28S dans le but de mesurer l'évolution dans le temps de la composition des communautés microbiennes.

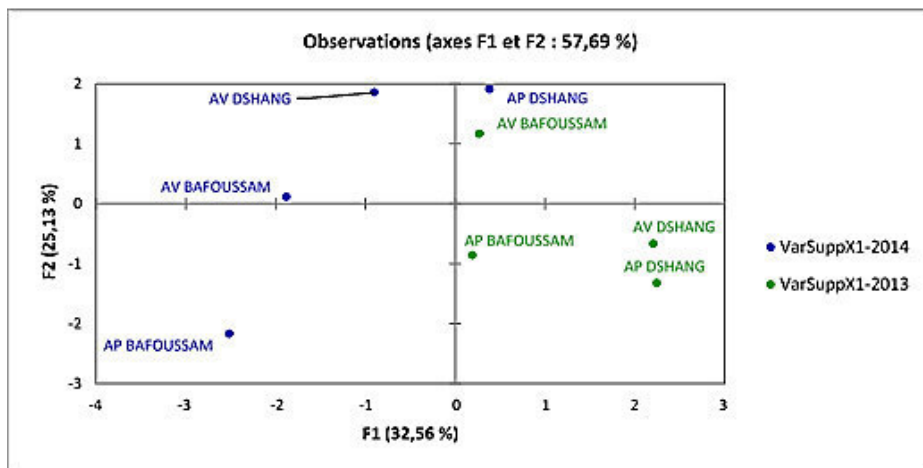
Pour les profils d'ADN bactériens, 4 groupes apparaissent dont deux principaux discriminés selon l'origine géographique par l'axe principal F1 (65, 80%) (Figure 39.a). Le deuxième axe F2 (12,90%) sépare les cafés selon les années de récolte. Un résultat similaire est observé sur l'analyse des profils d'ADNr 26S, l'axe principal (32,50%) sépare les échantillons suivant l'origine et l'axe F2 (25,15%) discrimine les cafés récoltés en 2013 de ceux récoltés en 2014 (Figure 39.b). L'analyse réalisée sur les profils d'ADNr 28S, présente un résultat différent par rapport à ceux obtenus sur les deux autres types de profils (ADNr 16S et ADNr 26S). L'axe principal (32,56%) regroupe les cafés selon l'année de récolte et l'axe secondaire (F2 25,13%) différencie les cafés par leur origine géographique (Figure 39.c) avec une efficacité relative. Nos essais expérimentaux ont donc montré que les communautés évoluent au cours du temps, mais l'effet du temps reste toujours mineur par rapport à l'effet de l'origine géographique, surtout pour les communautés bactériennes et levuriennes. Les communautés qui restent conservées au cours des deux années de récoltes devraient suffire à tracer l'origine des cafés. Pour confirmer ces résultats, il faudrait réaliser une étude complémentaire en augmentant le nombre d'échantillons du café et sur une période de temps plus importante (plusieurs années de récolte). Le café vert représente la marchandise vendue dans le monde, il est donc intéressant de réaliser des études plus approfondies sur ce café dans le but de produire un outil de discrimination et/ou d'authentification du café vert importé. Les communautés bactériennes et levuriennes peuvent être les marqueurs microbiens les plus adaptés à ce type d'outil.



(a)



(b)



(c)

Figure 39 : Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur les profils DGGE d'ADNr 16S (a), d'ADNr 26S (b) et l'ADNr 28s obtenus sur les cafés récoltés sur deux années de récolte et traités par voie humide.

I.2. Discrimination des procédés de traitement post-récolte du café indonésien

L'outil analytique PCR-DGGE nous a permis d'étudier l'effet de deux voies de traitement du café appliquées au Cameroun. La PCR-DGGE nous a également permis d'étudier l'effet des autres traitements.

Dans ce chapitre, nous proposons d'étudier des cafés verts traités par trois procédés différents en Indonésie, à savoir : la voie humide et la voie semi-humide qui donnent le café Bunisora, et la voie naturelle par ingestion par la civette qui produit le café Luwak. Ce dernier est un café récolté dans les excréments d'une civette asiatique. Cette dernière mange les « cerises » de café pour leur pulpe. Après environ un jour et demi dans leur tube digestif, les graines sont rejetées en grappes, encore dures et encore couvertes d'une partie des enveloppes intérieures du fruit. Elles sont récoltées, soigneusement lavées et séchées au soleil.

Sur le gel DGGE, chaque colonne représente un échantillon de café vert, les colonnes (H1, H2, H3 et H4), (HS1, HS2, HS3 et HS4) et (N1, N2, N3 et N4) représentent respectivement le café lavé (voie humide), le café semi-lavé (voie semi-humide) et le café obtenu par voie naturelle par l'action de la civette (Figure 40).

a- Analyse des communautés bactériennes

Les profils DGGE des ADN bactériens extraits du café issu des trois voies de traitement présentent un nombre de bande ADN différent (Figure 40.a). Les profils des échantillons de cafés provenant du même procédé donnent des résultats similaires. Sur le café Luwak et le café lavé, 21 bandes sont détectées et sur le café semi lavé 20 bandes sont révélées avec 10 bandes communes entre les trois groupes de café. Parmi les 10 bandes communes, 2 bandes sont très intenses et dominantes sur tous les échantillons (dont une identifiée comme de l'ADN chloroplastique est intrinsèque au café (*bande 21*). La deuxième bande est identifiée comme *Weissella sp.* Deux bandes sont détectées spécifiquement sur le café Luwak digéré par l'action intestinale de la civette et qui sont identifiées comme *Staphylococcus saprophyticus* (*bande 4*) et *E. coli* (*bande 17*) (Figure 40.a).

b- Analyse des communautés fongiques (ADNr 28S)

Comme cela a été observé sur l'analyse des communautés bactériennes, les profils DGGE d'ADN fongiques obtenus à partir des cafés traités par le même procédé sont similaires. 21, 26 et 25 bandes ADN sont présentes respectivement sur le café lavé, semi lavé et le café Luwak. 12 bandes sont communes aux 3 groupes de café. Dans chaque groupe d'échantillons, nous remarquons des bandes spécifiques à chaque procédé comme la bande (*P*) non identifiée par

séquençage présente sur le café obtenu par voie humide, les bandes (*H*, *W*, *b*, *c*) non identifiées par séquençage sur le café traité par voie semi-humide et les bandes (*G*, *I*, *V*, *Y*, *Z*, *i*) présentes sur le café Luwak dont 3 ont été identifiées comme *Wallemia sebi* (*G*), *Hanseniaspora uvarum* et *Kodamea ohmeri* (*i*) (Figure 40.b).

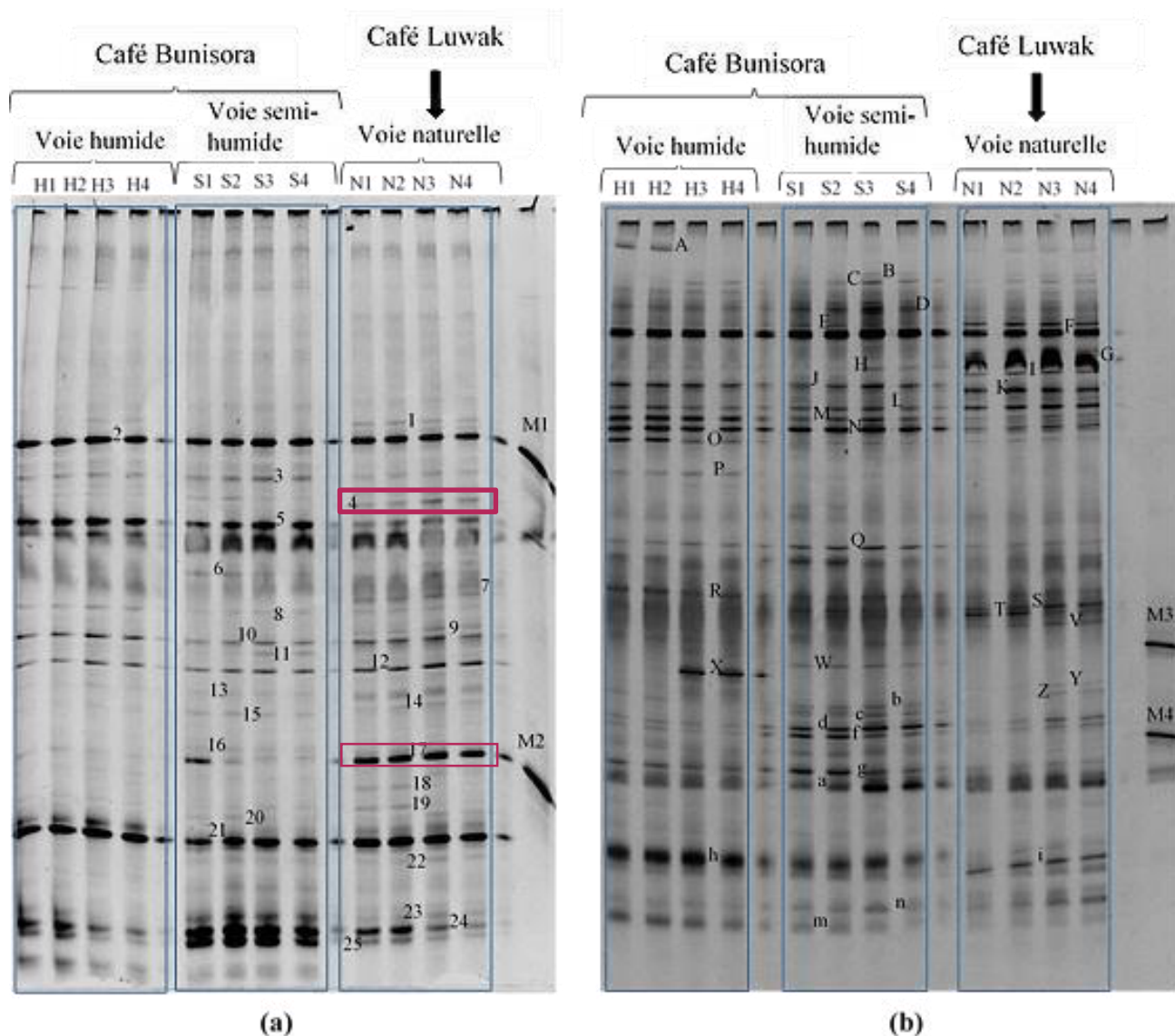


Figure 40 : Profils DGGE des ADN bactériens (a) et fongiques (ADNr 28S) (b) obtenus à partir des échantillons de café traités par trois méthodes différentes en Indonésie. Identification de quelques bandes d'ADN bactérien (4, 17) et fongique (E, F, G, V, i) dans le tableau 16. M1 : *L. plantarum*, M2 : *E. coli*, M3: *Altenaria alternata*, M4 : *Aspergillus niger*.

Tableau 16 : Identification de quelques bandes d'ADN microbiens obtenu sur le café indonésien.

Bande	Genus/species	Percent cover	Percent identity	E-value	Références
2	<i>Weissella sp</i>	96%	100%	5e-52	
4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97%	100%	1e-87	KJ095673
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%	100%	1e-100	JQ446513
17	<i>Escherichia coli</i>	100%	100%	1e-97	KF981877
E	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100%	99%	3e-84	KF992155
F	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100%	99%	7e-130	JX188161
	<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	100%	99%	7e-130	AY953954
G	<i>Wallemia sebi</i>	100%	99%	3e-144	JN938862
O	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100%	98%	8e-50	KF840566
V	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100%	97%	5e-32	EU268633
i	<i>Kodamaea ohmeri</i>	100%	96%	1e-82	KC111449

* : plusieurs n° d'accès sont proposés

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) a été appliquée sur les profils DGGE des ADNr bactériens et fongiques dans le but de discriminer les cafés vert traités par les trois procédés. Les dendrogrammes obtenus à partir des deux profils (bactériens et fongiques) présentent la même hiérarchisation avec des pourcentages de similarité différents (Figure 41). Deux clusters principaux sont obtenus à savoir 68% de similarité sur les bactéries (Figure 41.a) et 73% de similarité sur la flore fongique (Figure 41.b), l'un des clusters regroupe les cafés Luwak et l'autre regroupe les cafés Bunisora. Le cluster des cafés Bunisora se divise lui-même en deux clusters à 90% pour les communautés bactériennes (Figure 41.a) et 89% pour les communautés fongiques (Figure 41.b), l'un regroupe les cafés verts traités par voie humide et l'autre regroupe les cafés obtenus par voie semi-humide. Nous constatons que le traitement par voie naturelle est très différent par rapport aux deux autres traitements. Ce résultat n'est pas surprenant car la manière de traiter le café Luwak est très différente et fait intervenir un animal appelé civette qui mange les cerises fraîches, dans le but de digérer l'enveloppe du café par action enzymatique intestinale. Les grains de café sont libérés dans les excréments des civettes. C'est pourquoi les communautés microbiennes associées à ce café peuvent comporter des bactéries associées au tractus digestif de la civette.

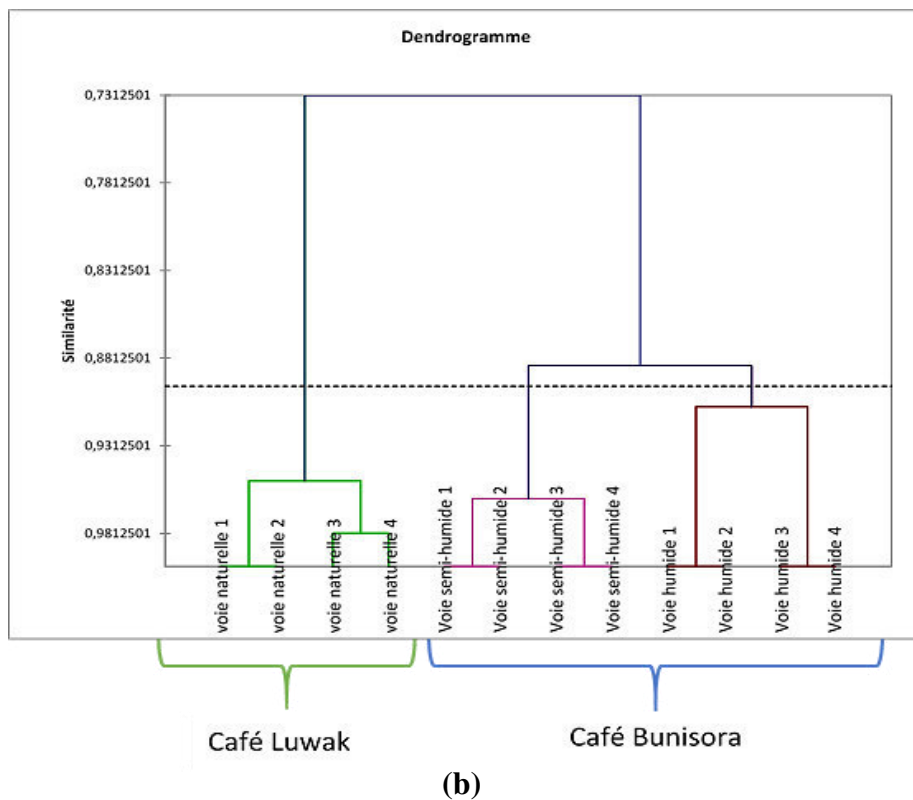
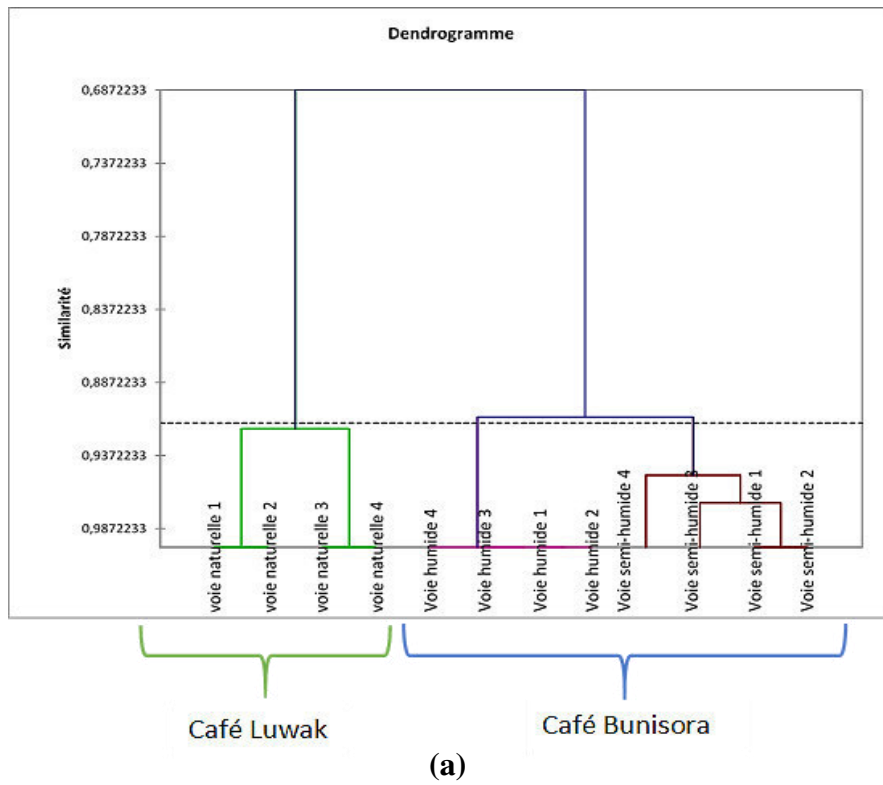


Figure 41 : Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) des profils DGGE d'ADN bactérien (a) et fongique (b) des cafés verts obtenus par les trois traitements en Indonésie.

Dans le but d'observer les relations entre les communautés microbiennes et les types de traitements appliqués sur le café, nous avons réalisé une Analyse Canonique des Correspondances (ACC) sur l'ensemble des profils d'ADNr bactérien et fongique obtenus. L'axe F1 explique 78,89% des variations de la structure des communautés microbiennes de l'ensemble des échantillons comparés et permet de séparer le café Luwak des cafés Bunisora. L'axe F2 explique 21,11% de variations entre le café traité par la voie humide et celui traité par la voie semi-humide, ce qui confirme que le café Luwak est très différent du café Bunisora et des deux café Bunisora (Figure 42). L'ACC a montré que 26 espèces bactériennes et fongiques sont reliées aux 3 types de procédé dont une majorité n'a pas pu être identifiée par séquençage. Cet outil statistique a montré des populations spécifiques à chaque traitement. Les espèces bactériennes non identifiées (6, 11, 16) et fongiques non identifiées (W, c, b) sont reliées aux cafés traités par voie semi-humide, et les espèces bactériennes (15, 22 et 23) et fongiques (H, J, P, X et h) associées à la voie humide. Sur le café traité par la civette, nous observons des populations bactériennes comme les espèces 1, 4, 7, 9, 14, 17, 18 et 19 pour les bactéries dont *E. coli* (17) et *S. saprophyticus* (4) (Figure 42). Hedman *et al.* (1993) ont analysé les communautés microbiennes de certains animaux et ont montré que 7% des microorganismes du bétail était des *S. saprophyticus*. Nous supposons que la civette est un réservoir de *S. saprophyticus*. Les espèces fongiques qui sont reliées au café Luwak sont *Wallemia sebi* (G), *Hanseniaspora uvarum* (V), *Kodamea ohmeri* (i) et les espèces non identifiées (I, Y). Ces moisissures avaient déjà été isolées de grains de café vert brésilien (Liardon *et al.*, 1990).

Les résultats obtenus suggèrent que la structure des communautés microbiennes varie en fonction des traitements appliqués et que le café traité par la civette présente une communauté microbienne différente de celle des autres cafés. D'autres études ont permis de discriminer ce café par identification du profil métabolique en sélectionnant des marqueurs discriminants pour l'authentification du café obtenu par la civette (Jumhawan *et al.*, 2013). La composition et la concentration des composés volatils ont également permis de caractériser le café Luwak (Ongo *et al.*, 2012) .

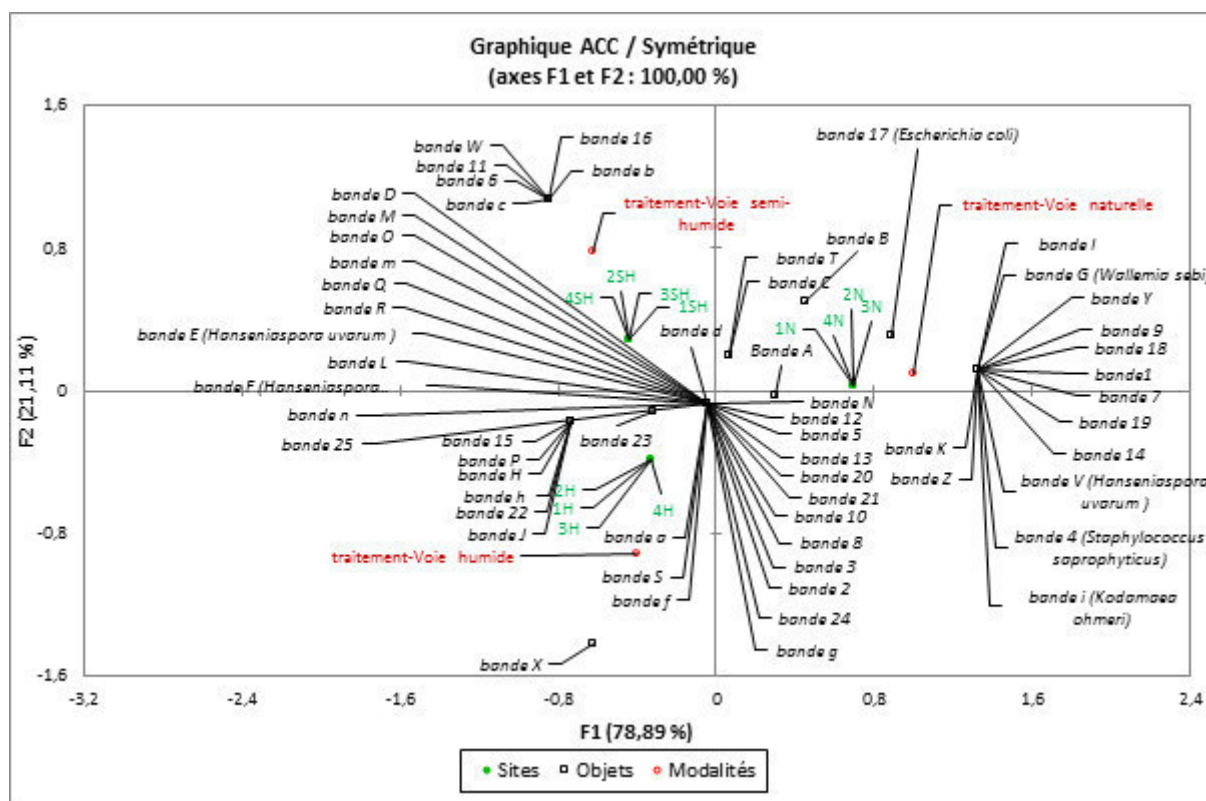


Figure 42 : Analyse Canonique des Correspondances (ACC) réalisée sur l'ensemble des profils d'ADN bactérien et fongique à partir des cafés verts obtenus par les trois traitements en Indonésie.

I.3. Hiérarchisation des procédés post-récolte du café camerounais et indonésien

Après avoir appliqué l'outil moléculaire sur les cafés camerounais et indonésiens séparément, nous avons souhaité réaliser une étude plus globale sur l'ensemble des échantillons pour mesurer l'effet des procédés utilisés dans les deux pays. Pour cela une étude de classification hiérarchique a été appliquée sur les profils DGGE des ADN bactériens et fongiques extraits à partir du café vert Arabica obtenu par voie sèche et voie humide au Cameroun et voie humide, semi-humide et naturelle en Indonésie (Figure 43).

➤ Profils d'ADN bactérien

Sur le café indonésien, 22, 29 et 25 bandes sont détectées respectivement sur le café traité par voie humide, semi-humide et voie naturelle (par la civette). Au Cameroun, 26 et 23 bandes sont révélées de manière respective à Bafoussam et Dschang sur le café traité par voie humide. Sur le café traité par voie sèche, 29 et 23 bandes sont présentes respectivement à Bafoussam et Dschang. Nous avons détecté 10 bandes communes entre la voie humide, semi-humide et naturelle (civette), parmi ces bandes 3 sont identifiées comme LAB : *Weissella* sp (A),

Leuconostoc mesenteroides (C) et *Lactococcus lactis* (D). Nous avons observé seulement 4 bandes communes entre toutes les voies de traitement (humide, semi-humide, naturelle et voie sèche), parmi lesquelles celle de l'ADN de chloroplaste (qui ne doit pas être prise en compte) (Figure 43.a). Bien que les cafés proviennent de deux continents différents, ils présentent des espèces microbiennes communes.

➤ **Profils d'ADN fongique (26S)**

Un nombre de bandes de 17, 17 et 13 est observé respectivement sur le café traité par voie humide, semi-humide et voie naturelle (par la civette) en Indonésie (Figure 43.b). Au Cameroun, 14 et 10 bandes sont révélées de manière respective à Bafoussam et Dschang sur le café traité par voie humide. Sur le café traité par voie sèche, 20 et 15 bandes sont présentes respectivement à Bafoussam et Dschang. Nous avons détecté 6 bandes communes entre toutes les voies de traitement provenant des deux pays et 9 bandes entre les cafés traités par voie humide, semi-humide et naturelle, parmi lesquelles la bande identifiée comme *Hanseniaspora uvarum* (G). Les profils fongiques présentent plus de ressemblances entre les traitements appliqués que l'origine du café qui est pourtant discriminante entre les cafés d'Indonésie et du Cameroun.

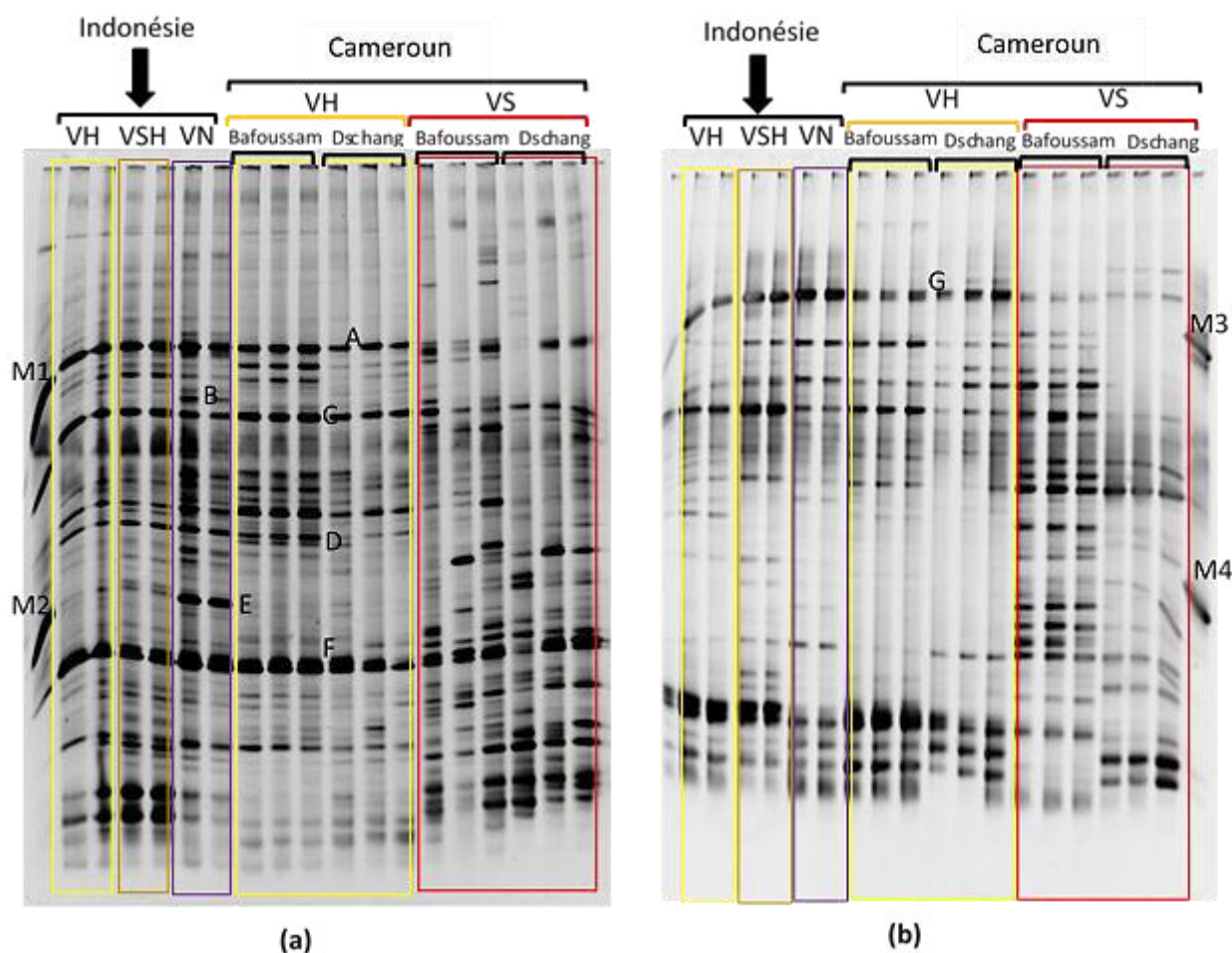


Figure 43 : Gel DGGE représentant les profils d'ADN bactérien (a) et fongique (26S) (b) obtenus à partir du café vert Arabica traité au Cameroun et Indonésie. VH : voie humide, VSH : voie semi-humide, VS : voie sèche et VN : voie naturelle par la civette. M1: *L. plantarum*, M2 : *E.coli*, M3 : *Candida apicola*, M4 : *Lodderomyces elongisporus*.

Quel que soit le profil DGGE, bactérien ou fongique, les dendrogrammes montrent la même hiérarchisation des cafés. Deux principaux clusters sont obtenus à 50% et 45% de similarité respectivement sur les communautés bactériennes et fongiques. Un cluster comprend les cafés traités par voie sèche et le deuxième regroupe les cafés obtenus par les trois voies de traitement (voie humide, semi-humide et naturelle) (Figure 44). Le deuxième cluster, regroupe les cafés traités par voie humide au Cameroun et les cafés d'Indonésie (voie humide, semi-humide et naturelle) à environ 60 et 65% de similarité par rapport aux populations fongiques et bactériennes. Le cluster regroupant les cafés d'Indonésie se divise en deux classes à 63% de similarité chez les bactéries et 70% de similitude chez la flore fongique (Figure 44). La première classe comprend les cafés Luwak et la deuxième regroupe les cafés Bunisora (lavé et semi-

lavé). Les résultats obtenus sont très logiques car le traitement par voie sèche est différent des trois autres traitements qui incluent une étape de fermentation soit dans l'eau, sans eau, ou bien dans l'intestin de la civette en favorisant la croissance de certains microorganismes.

Nous confirmons aussi dans cette étude que l'effet du traitement du café a un impact plus important sur les flores microbiennes que l'effet de l'origine, ce qui explique que l'activité humaine est fondamentale dans l'élaboration de la qualité du produit. L'outil moléculaire PCR-DGGE nous a ainsi permis de mesurer l'effet de plusieurs facteurs influençant la structure des communautés microbiennes associées au café.

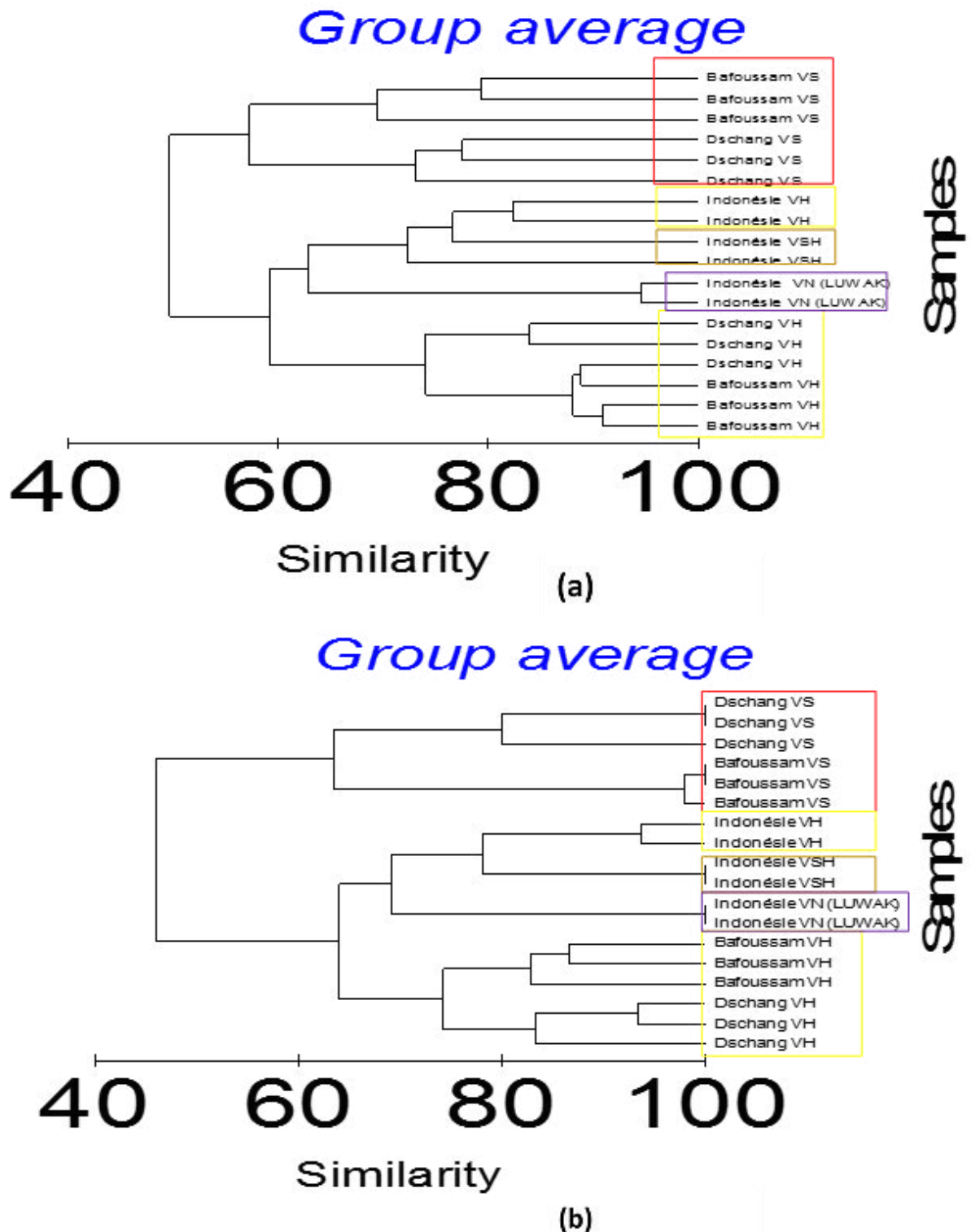


Figure 44 : Analyse Hiérarchique Ascendante des profils d'ADN bactérien (a) et fongique (b) des cafés verts traités par différentes voies au Cameroun et Indonésie. VH : voie humide, VSH : voie semi-humide, VS : voie sèche et VN : voie naturelle par la civette.

I.4. Conclusion partielle

Les communautés microbiennes associées aux grains de café diffèrent en fonction des traitements appliqués. Sur les cafés issus de la voie sèche nous avons identifié des espèces de *Pseudomonas sp.* et *Microbacterium sp.* spécifiquement sur le café coque ; ces dernières sont sûrement présentes sur les cerises fraîches des cafés et subsistent au cours du séchage de l'enveloppe, tandis que les populations spécifiques à la voie humide sont les LAB comme *L. mesenteroides*, *Weissella sp.* Il a été remarqué que l'écologie microbienne du café issu de la voie sèche varie après décorticage et non pas au cours de la voie humide après déparchage. En conséquence, l'analyse des communautés microbiennes (par PCR-DGGE) nous a permis de différencier les cafés selon leur mode de traitements post-récolte. L'origine géographique a également un impact sur la structure des communautés microbiennes du café. Ainsi des variations importantes ont été observées entre les régions avec par contre de faibles variations constatées au sein d'une même région. L'effet région est donc très important (reste donc à déterminer les limites d'une région). Il a été constaté que les communautés microbiennes évoluent au cours du temps (années de récolte) mais malgré cette évolution, la plupart des populations restent conservées dans les fermes et même les régions au cours des années de récolte. D'autre part, l'espèce de café a également une influence sur la structure des communautés, une espèce fongique *Wallemia sp.* a été clairement identifiée sur l'espèce *C. robusta* mais pas sur *C. arabica*, elle pourrait être spécifique à cette espèce de café.

L'analyse comparative des traitements post récolte appliqués dans deux pays provenant de deux continents différents a suggéré que les populations varient principalement en fonction des traitements subis et que le pays d'origine a moins d'effet sur la communauté microbienne. Par ailleurs, l'analyse a montré plus de similarité sur les cafés traités par les procédés comprenant une étape de fermentation, soit procédé par voie humide, semi-humide et voie naturelle (par la civette). L'analyse globale des communautés microbiennes associées au café nous a permis de répondre à plusieurs questions posées au début de l'étude (Figure 45). Les communautés microbiennes varient selon les traitements appliqués, selon l'origine géographique soit entre les pays, ou entre les régions au sein d'un même pays, par contre ne varient pas beaucoup entre les fermes d'une même région. L'espèce du café utilisée influence également, mais dans une moindre mesure, la structure des populations microbiennes. Le paramètre principal influençant la composition en populations microbiennes est le procédé appliqué sur le café suivi de l'origine et enfin de l'espèce du café.

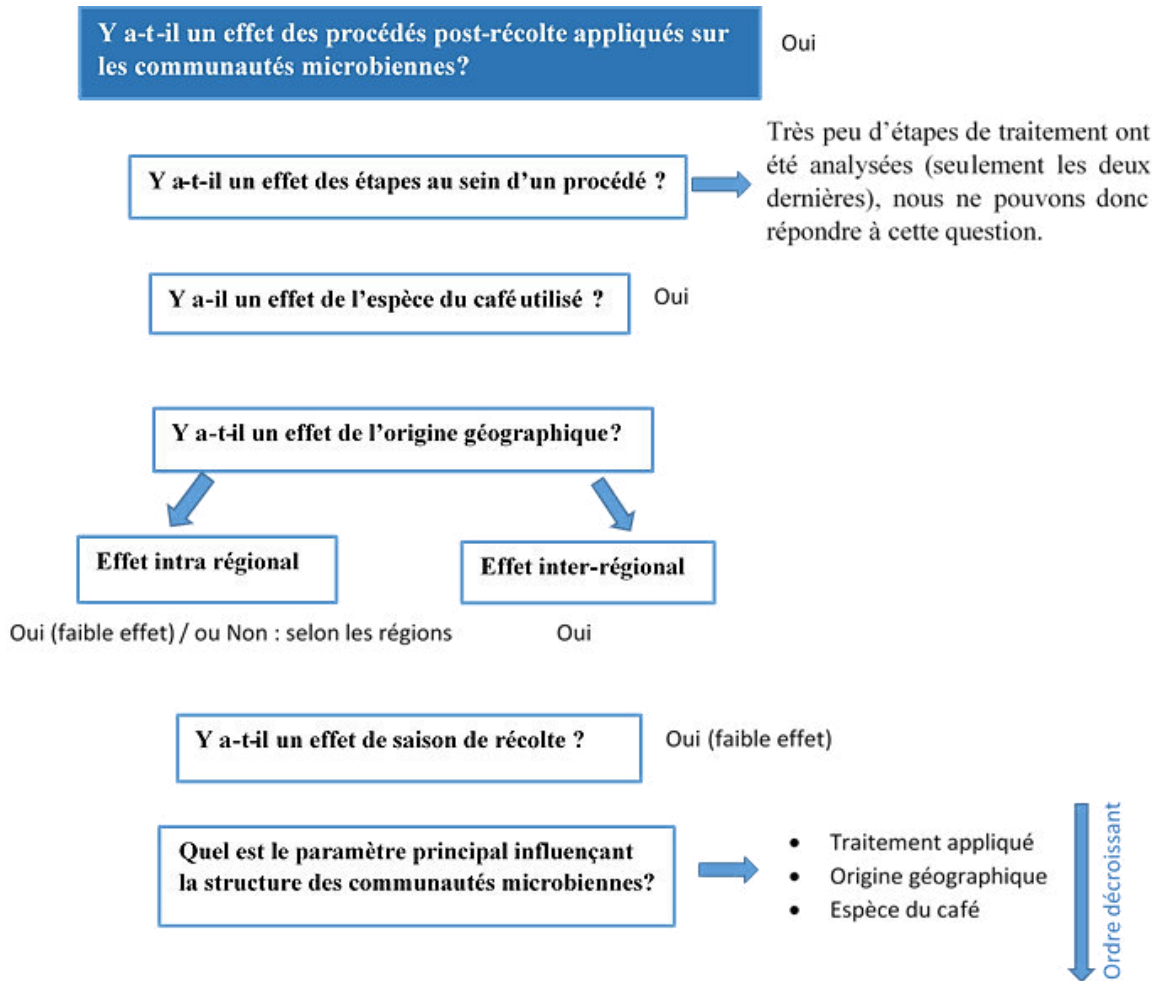


Figure 45 : Réponses aux questions de recherche posées

Chapitre II. Discrimination des traitements post-récolte du cacao

Les procédés post récolte du cacao sont composés de plusieurs étapes (Figure 46). Ces dernières varient selon les variétés, d'un pays à un autre, voire d'un agriculteur à un autre. Chaque étape du procédé peut avoir un impact sur la qualité finale du chocolat (Saltini *et al.*, 2013). Le chocolat est produit par la plupart des pays importateurs (pays développés) du cacao, qui le reçoivent sous forme de fèves traitées (fermentées et séchées). Le commerce international des produits vers ces pays est crucial pour la satisfaction des consommateurs. En Europe, suite aux nombreuses crises dans les secteurs agroalimentaires, la réglementation européenne (Règlement CE 178/2002) exige des systèmes de traçabilité fournissant des informations liées à la fabrication, la transformation, la distribution et la consommation des produits. C'est dans cette optique que cette étude a été menée, afin de mesurer l'impact des étapes du procédé ainsi que l'influence de la variation des paramètres au cours des procédés post-récolte (Délai de stockage des cabosses, techniques de fermentation, aérations) sur l'écologie microbienne du cacao et sur sa qualité finale. L'analyse globale de l'écologie microbienne par PCR- DGGE a été réalisée sur des échantillons de cacao provenant de Côte d'Ivoire. Au cours de cette étude, plusieurs questions de recherche ont été posées auxquelles nous avons tenté d'apporter des réponses en effectuant une étude sur deux lots de cacao récoltés sur deux saisons, Mars et Novembre 2013 (Figure 47).

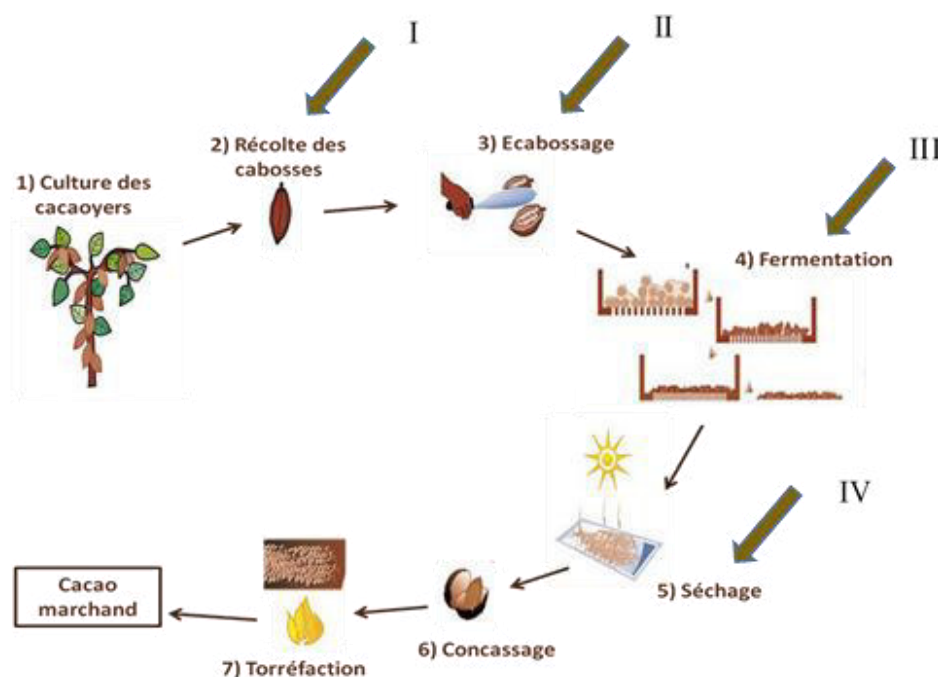


Figure 46: Procédé de transformation du cacao, du cacaoyer au cacao marchand. I, II, III, IV : étapes du procédé post-récolte étudié.

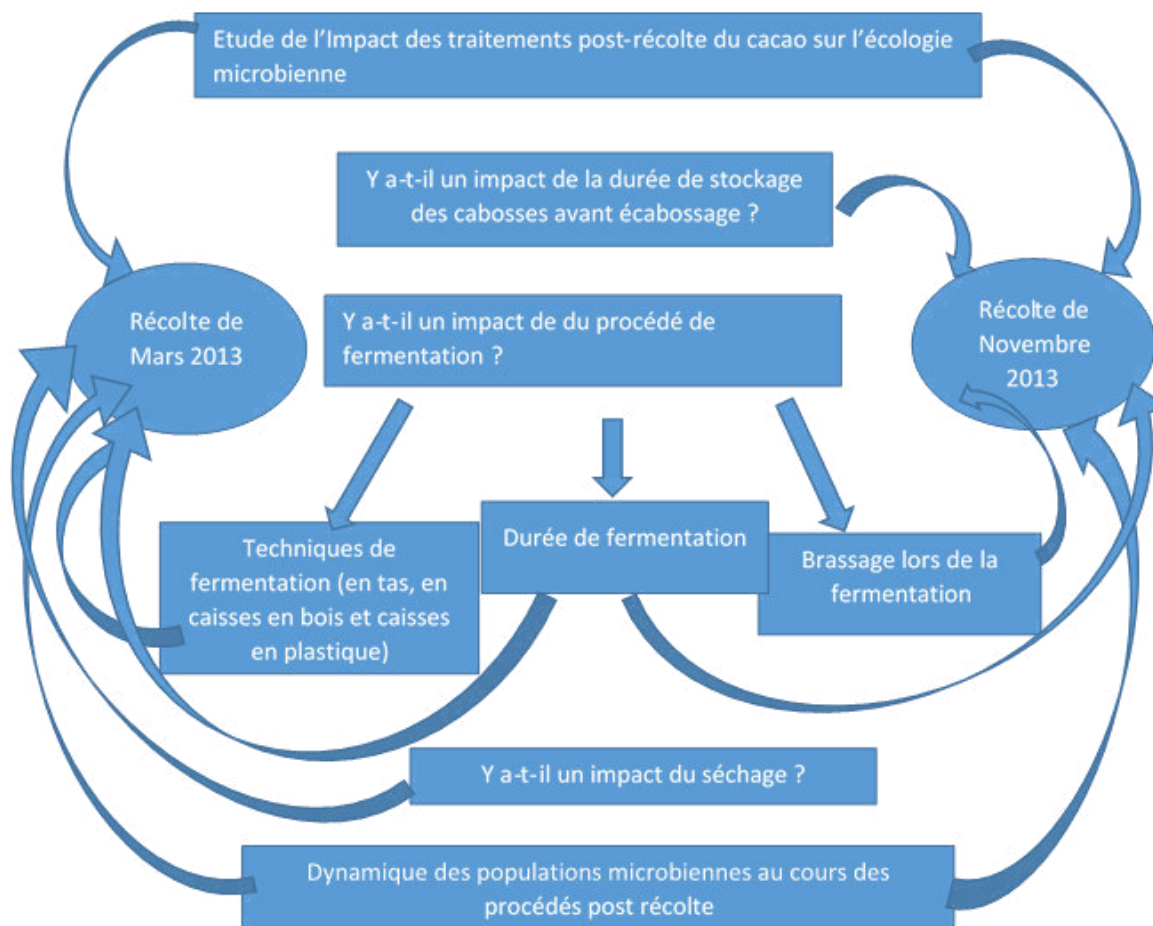


Figure 47 : Schéma représentant les différentes questions de recherche avec les échantillons du cacao utilisés pour répondre à ces questions.

III.1. Impact des paramètres au cours de traitement post-récolte

L'effet de plusieurs paramètres a été étudié sur l'écologie microbienne, à savoir la durée de stockage des cabosses avant fermentation, la durée de fermentation, les techniques de fermentation et le séchage.

III.1.1. Impact du délai d'écabossage

Le délai d'écabossage correspond à la durée du stockage des cabosses avant leur ouverture. Il a été rapporté que le délai d'écabossage avait un impact positif sur la qualité du cacao par la réduction de plusieurs facteurs : éthanol, acide acétique, sucres, protéines, et sels minéraux et l'augmentation du pH avec ainsi l'amélioration de la saveur finale (Meyer *et al.*, 1989 ; Tomlins *et al.*, 1993 ; Guehi *et al.*, 2010 ; Afoakwa *et al.*, 2013 a, 2013 b). Le stockage peut être bénéfique (car il peut permettre aux cabosses de terminer leur maturation) mais aussi présente quelques inconvénients comme l'augmentation du pourcentage des fèves moisies (contaminées

par des moisissures) (Tomlins *et al.*, 1993). Par contre aucun travail n'a montré l'influence du stockage des cabosses sur la flore microbienne. Cependant, des travaux en cours tendraient à montrer qu'une augmentation du délai de stockage augmenterait le risque de contamination par l'OTA produite par une moisissure (principalement du genre *Aspergillus* dans le cacao, Kedjebo *et al.*, 2015). Il semble donc que ce délai puisse avoir un effet sur la flore microbienne associée au cacao. Ce travail a pour but de mesurer l'effet du stockage sur la structure des communautés microbiennes associées au cacao. Cet effet a été mesuré en réalisant des fermentations des fèves issues de cabosses stockées durant 3 durées différentes (2, 4 et 8 jours). Les échantillons ont été prélevés à 2, 4, 5, 6 et 7 jours de fermentation, puis analysés par PCR-DGGE.

Les profils DGGE des ADN des bactéries sont similaires pour les 3 délais d'écabossage avec quelques variations comme la présence de l'espèce (*Z*= *Klebsiella pneumoniae*) identifiée uniquement sur les fèves issues du délai 4 et 8 jours (Figure 48.a + Tableau 17). Cette espèce peut être présente sur la surface du fruit (cabosse) et se développe au cours du stockage, ce qui la rend détectable par DGGE sur les cabosses stockées plus longtemps. Sur le gel DGGE des levures, nous observons plus de différences entre les profils des 3 délais d'écabossage, principalement sur les fèves stockés 8 jours. Les espèces identifiées sont *Pichia galeiformis*/ *P.membranifaciens* (4) *Hanseniaspora uvarum* (5) et d'autres non identifiées par séquençage (6, 13) sont présentes uniquement au délai 8 jours (Figure 48. b + Tableau 18). L'espèce *Pichia* sp (9) est présente seulement au 5^{ème} jour de fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage de 4 jours et aux 2, 4 et 5^{ème} jours de fermentation des fèves provenant des cabosses stockées durant 8 jours. L'analyse statistique par ANOVA réalisée sur la présence et l'intensité des bandes montre une différence significative au niveau de l'intensité de la bande de *P. manshurica* (11) qui est plus abondante au délai 8 jours (Figure 48.b + Tableau 18) Cette espèce pourrait être utilisée comme un marqueur de stockage des cabosses. Ces résultats suggèrent un effet du stockage des cabosses sur la structure des populations de levures et dans une moindre mesure sur les populations bactériennes associées aux fèves de cacao. Concernant les moisissures, des analyses ont été réalisées en ciblant ces derniers (ADNr 28S) mais aucun ADN fongique (moisissure) n'a été détecté : cela est sûrement dû à la limite de l'approche utilisée. Une concentration en moisissure inférieure à 10⁴ UFC/ g d'échantillon, n'est pas détectable par PCR-DGGE, cela montre que les moisissures présentes sur les fèves fermentées présentent une concentration inférieure.

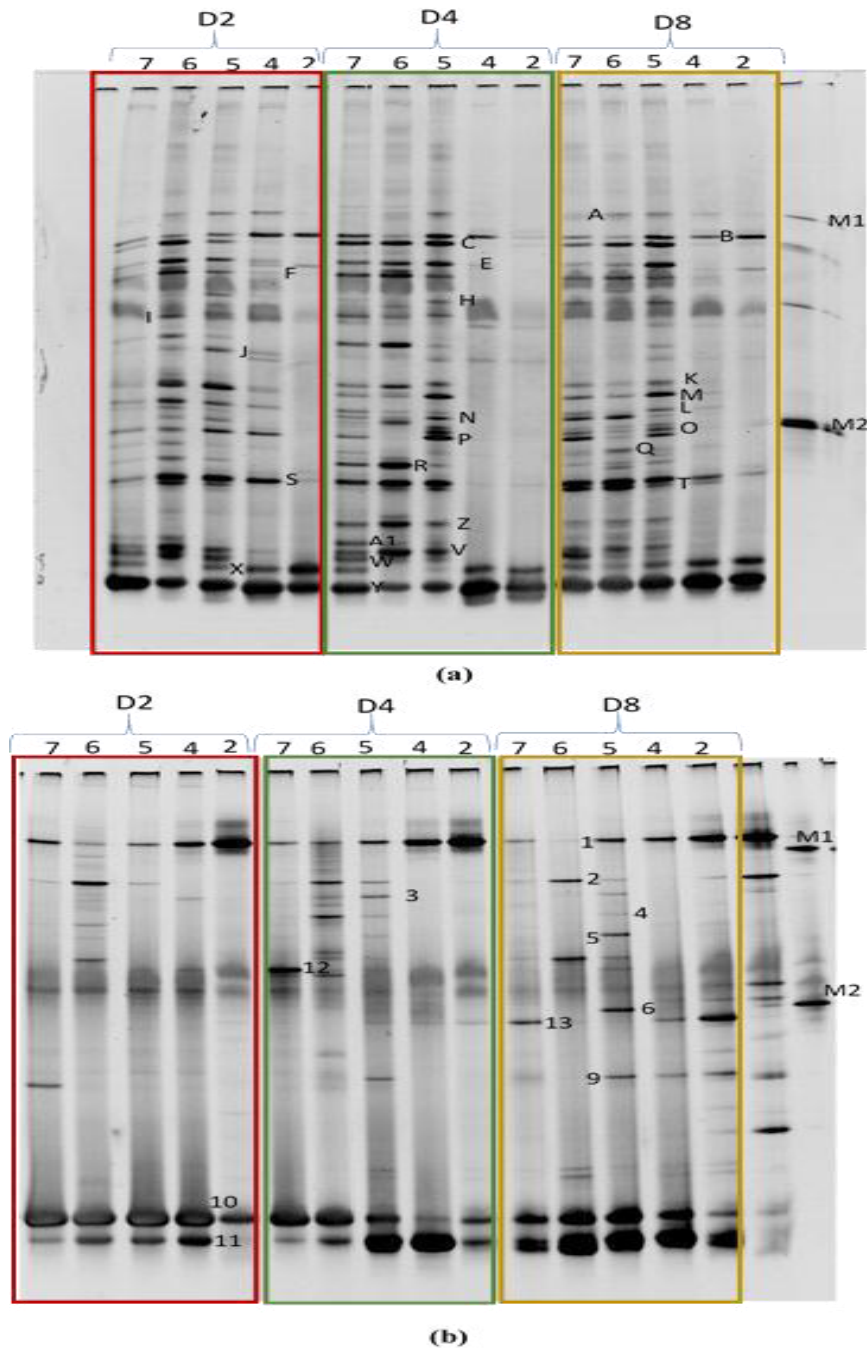


Figure 48 : Profils DGGE des ADNr 16S des bactéries (a) et 26S des levures (b) des fèves fermentées provenant des cabosses stockés 2 (D2), 4 (D4) et 8 (D8) jours. Fermentations réalisées pendant 2, 4, 5, 6 et 7 jours. M1 : ADN *E. coli* , M2 : ADN *L. plantarum* (ADN marqueur bactérien) et M1 : ADN *C. apicola*, M2 : *L. elongisporus* (ADN marqueur levurien). Identification des bandes dans les tableaux 17 et 18 ci-dessous.

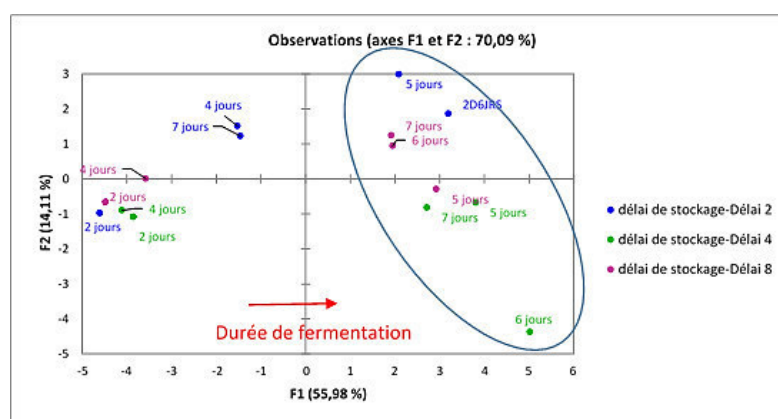
Tableau 17 : Identification des bandes d'ADN bactérien par séquençage

Bande	Famille/ Genre/ espèce	% d'identité	% Query cover	E-value	N° d'accès
A	<i>Lactobacillus curvatus</i>	93%	99%	5e-74	FJ609221
A1	<i>Enterobacteriaceae</i>	100%	100%	2e-97	KM021355
B	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99%	100%	1e-95	LC042465
C	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99%	100%	1e-78	KJ571214
E	<i>Bacillus megaterium</i>	94%	100%	2e-77	KJ004421
F	<i>Bacillus sp</i>	99%	100%	8e-97	HG794259
H	<i>Acetobacter sp</i>	98%	100%	1e-89	AB853266
I		98%	100%	6e-88	
L		99%	100%	2e-92	
W		90%	99%	1e-53	
K		97%	99%	1e-84	
J	<i>Acinetobacter sp</i>	92%	100%	2e-51	KJ814994
M	<i>Bacillus sp</i>	100%	100%	2e-97	KM983003
N	<i>Providencia sp</i>	89%	97%	5e-64	AB920789
O	<i>Enterobacteriaceae</i>	87%	99%	7e-42	
P	<i>Bacillus sp</i>	89%	100%	5e-43	FJ235680
Q	<i>Providencia sp</i>	97%	100%	2e-67	KM059194
R	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99%	100%	1e-95	LN623623
S	<i>Bacillus sp</i>	91%	97%	1e-53	KC236480
T	<i>Enterobacter sp</i>	99%	100%	8e-97	GU944492
V	<i>Klebsiella sp</i>	92%	99%	7e-57	GQ416571
X	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	100%	100%	1e-83	KM983001
Y				5e-83	
Z	<i>Klebsiella pneumonia</i>	100%	100%	2e-97	KP761422

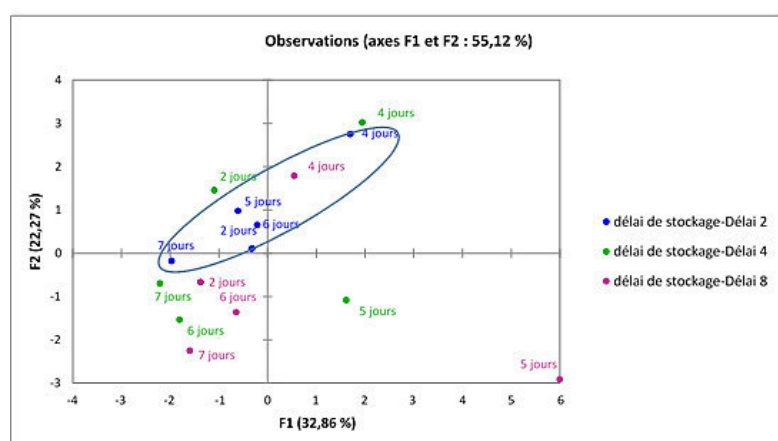
Tableau 18 : Identification des bandes d'ADN des levures par séquençage

Bande	Famille/ Genre/ espèce	% d'identité	% Query cover	E-value	N° d'accès
1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	98%	100%	6,00E-93	KC111446
2	<i>Candida ethanolica/ Pichia deserticola</i>	93%	100%	8,00E-56	KM234475
12	<i>Candida ethanolica/ Pichia deserticola</i>	91%	99%	2,00E-64	KM005182
3	<i>Pichia sp</i>	99%	100%	1,00E-79	JX408867
4	<i>Pichia galeiformis</i>	93%	100%	3,00E-76	HM212622
	<i>P.membranifaciens</i>				
5	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	93%	100%	4,00E-65	KM816746
6	NI				
9	<i>Pichia sp</i>	95%	100%	4,00E-65	EU884437
10	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99%	100%	2,00E-47	KC494718
11	<i>Pichia manshurica</i>	99%	100%	7,00E-11	JQ419868
13	NI				

L'ACP réalisée sur les profils des bactéries a regroupé les échantillons de cacao selon la durée de fermentation par l'axe principal F1 (55,98%) et n'a montré aucun effet du stockage des cabosses (Figure 49.a) sur les communautés bactériennes. Nous constatons que l'effet de la durée de fermentation est beaucoup plus important que l'effet du stockage des cabosses dans le cas des bactéries. Sur les profils des levures, l'ACP a différencié par l'axe F1 (32,86%) les fèves fermentées 4 et 5 jours des autres fèves fermentées 2, 6 et 7 jours (Figure 49.b). Ceci montre que les communautés levuriennes subissent des variations au cours de la fermentation, et que malgré ces changements, certaines espèces détectées au début de fermentation restent conservées à la fin de cette celle-ci. L'axe F2 (22,27%) (Figure 49.b) discrimine le délai d'écabossage « 2 jours » des deux autres délais (4 et 8 jours). D'après les résultats de l'analyse statistique nous constatons que le délai d'écabossage n'affecte pas la flore bactérienne mais affecte la flore levurienne qui présente une variation en augmentant le délai d'écabossage de 4 et 8 jours.



(a)



(b)

Figure 49 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les profils DGGE des ADNr 16S des bactéries (a) et 26S des levures (b) des fèves fermentées à des différentes durées issues des cabosses stockés 2, 4 et 8 jours.

Afin de relier les variations entre la composition en communautés microbiennes sur les fèves et les 3 durées de stockage, une analyse discriminante (ACC) a été réalisée (Figure 50) sur l'ensemble des profils des bactéries et des levures. L'axe principal F1 a révélé 59,72% de variation de l'écologie microbienne entre le délai 2 jours et les autres délais de 4 et 8 jours. L'ACC a montré un nombre important d'espèces microbiennes communes entre les 3 délais de stockage, ce qui a rendu la mesure de l'effet de la durée de stockage difficile. Malgré le nombre important des espèces communes entre les 3 délais d'écabossage, l'ACC a montré que les espèces les plus discriminantes de la longue durée de stockage sont *P. mashurica* (11), les espèces appartenant aux *Entérobactéries* (*O*, *T*) avec *K. pneumoniae* (Z). D'autres levures non identifiées (*bande 6 et 8*) par séquençage sont également associées aux fèves provenant du délai de 8 jours (Figure 50).

En résumé, les Entérobactéries et certaines levures : *Pichia manshurica* (11), *Pichia sp* (9), *Hanseniaspora uvarum* (5) et deux autres levures non identifiées par séquençage (6, 13) sont présentes ou abondantes au cours de stockage et peuvent être considérées comme des marqueurs pour ce traitement (durée de stockage).

La durée de stockage impacte la qualité finale du cacao et nous avons vu également l'écologie microbienne.

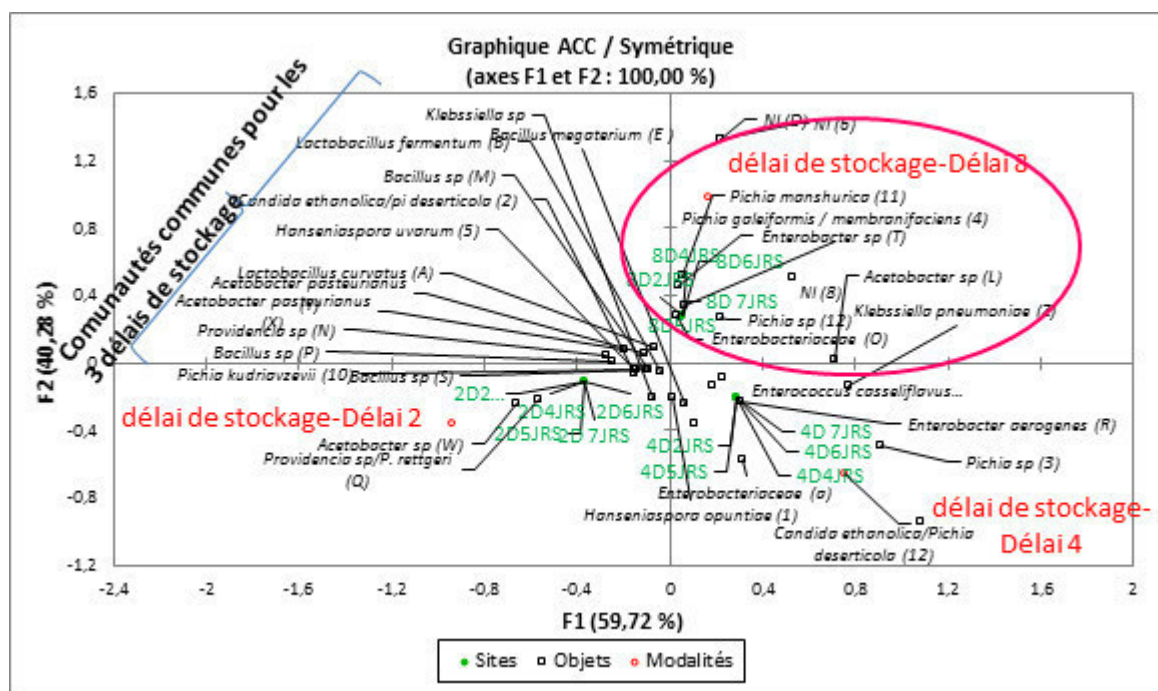


Figure 50 : Analyse canonique des correspondances réalisées sur les profils DGGE d'ADNr 16S des bactéries et 26S des levures des fèves fermentées à des différentes durées issues des cabosses stockées 2 jours (2D2JRS, 2D4JRS, 2D5JRS, 2D6JRS et 2D7JRS), 4 jours (4D2JRS, 4D4JRS, 4D5JRS, 4D6JRS et 4D7JRS) et 8 jours (8D2JRS, 8D4JRS, 8D5JRS, 8D6JRS et 8D7JRS). Variables explicatives : communautés microbiennes. Variables à expliquer : voies de traitement appliquées.

III.1.2. Impact de l'étape de fermentation

La fermentation est l'étape cruciale du traitement post-récolte ; elle permet l'élaboration de la qualité du cacao. Les méthodes de fermentation, la durée de fermentation et l'aération au cours de la fermentation ont une influence sur la qualité du cacao (Saltini *et al.*, 2013).

III.1.2.1. Méthodes de fermentation

Différentes techniques de fermentation sont appliquées selon l'origine et les agriculteurs, en utilisant des feuilles de bananiers (en tas), ou des caisses en bois et ou encore des plateformes. La méthode de fermentation dans des caisses en bois est classée comme une méthode à faible uniformité car on observe la présence de fèves défectueuses (Tomlins *et al.*, 1993 ; Guehi *et al.*, 2010), alors que la fermentation en tas est une fermentation uniforme et présente moins de fèves défectueuses (Guehi *et al.*, 2010). La technique de plateforme (ou claies) produit un cacao peu fermenté et peut induire la croissance de moisissures indésirables (Doyle *et al.*, 2001). D'après la littérature nous constatons que les techniques de fermentation influencent la qualité du cacao, raison pour laquelle, au cours de ce travail, l'effet de ces techniques sur l'écologie

microbienne du cacao est recherché. Pour cela, trois techniques de fermentation utilisées en Côte d'Ivoire ont été comparées, fermentation dans des caisses en bois, dans des caisses en plastique et en tas (dans des feuilles de bananier).

Les profils DGGE des communautés bactériennes des fèves fermentées par les trois techniques différentes sont similaires. A 2 jours de fermentation, nous observons les mêmes espèces à l'exception d'*E.coli* (*i*) qui est uniquement présente sur les fèves fermentées en tas et dans des caisses en bois. Cependant, à 4 jours de fermentation, nous constatons des variations entre les trois types de fermentations en termes d'intensité des bandes. Certaines bandes ne sont plus détectables à 6 jours de fermentation dans les caisses en plastique et les feuilles de bananiers et restent visibles sur les fèves fermentées dans les caisses en bois (Figure 51.a). Cette observation peut être expliquée par l'étude de Bankoff *et al.* (2014) qui ont comparé la fermentation en caisse, en tas, et sur des bâches par microbiologie classique. Ils ont ainsi observé la succession de flores dans les 3 fermentations mais avec un temps d'apparition différent qui est peut-être dû à l'aération et à la température. Sur les profils des fèves fermentées pendant 6 jours, nous remarquons que les deux espèces correspondant aux AAB (X, W) (Figure 51.a + Tableau 19, page 140) sont plus abondantes dans le cas de la fermentation dans des caisses en bois (Figure 51.a) ; ceci est peut être expliqué par l'étude de Bankoff *et al.* (2014) qui ont montré que les fermentations en caisses de bois offraient une meilleure croissance aux AAB.

Les profils DGGE des levures sont identiques pour les 3 techniques de fermentation au cours des 3 intervalles de temps. Au 6^{ème} jour nous remarquons que la bande identifiée comme étant *P. kudriavzevii* (7) (Figure 51.b + Tableau 20, page 141) est très intense sur les fèves fermentées dans les caisses en bois alors que sur les 2 autres fermentations cette bande n'est que légèrement détectée (Figure 51.b). Nous supposons que cette espèce est plus abondante dans la fermentation dans des caisses en bois, ce qui ne se corrèle pas avec l'étude de Bankoff *et al.* (2014) qui montre que la croissance de levures est 17 fois plus importante dans les feuilles de bananier.

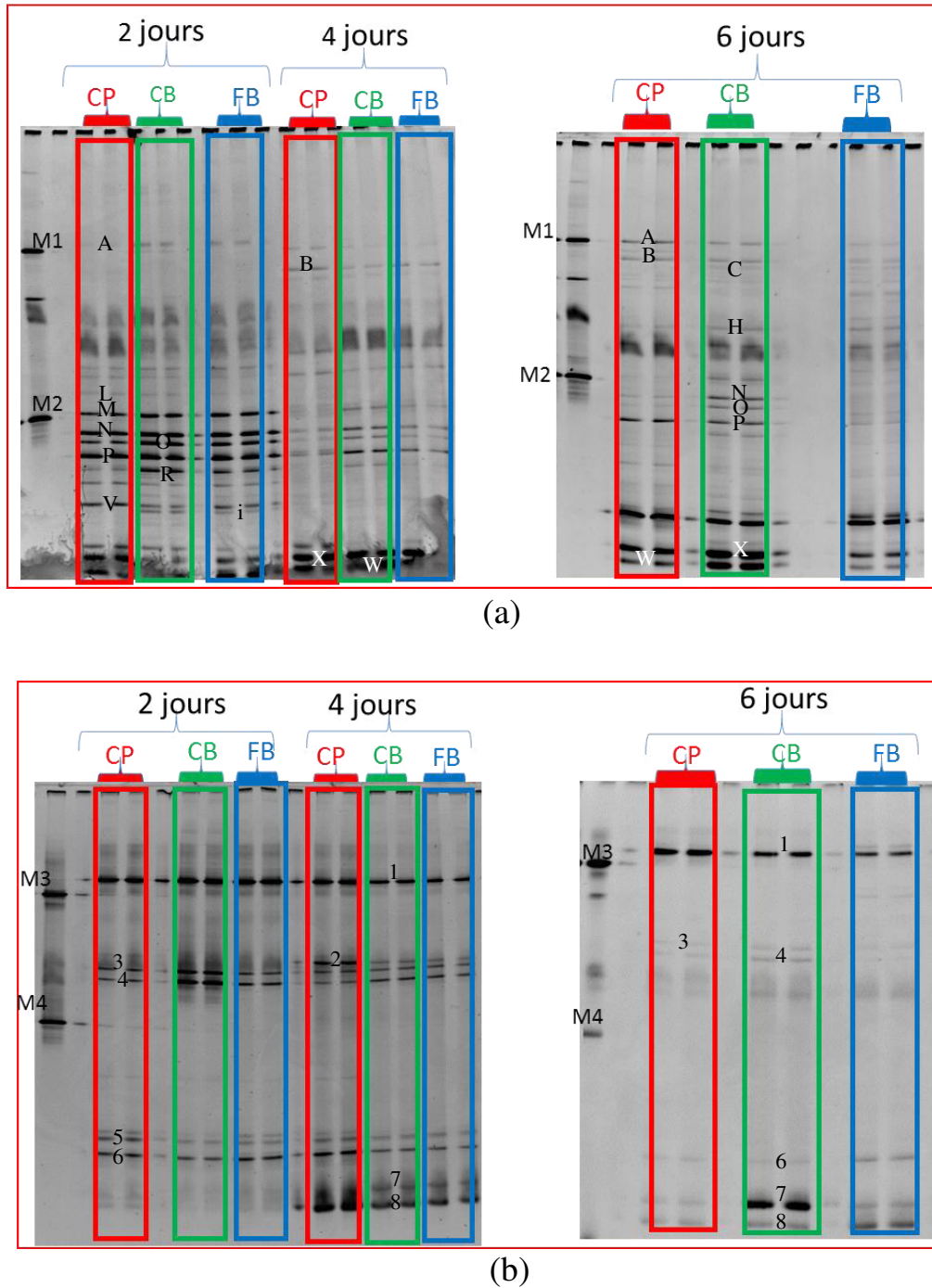


Figure 51 : Profils DGGE des ADN bactériens (a) et levuriens (b) obtenus sur des fèves de cacao fermentées dans des caisses en bois (CB), dans des caisses en plastique (CP) et dans des feuilles de bananier (FB) à trois intervalles de temps (2, 4 et 6 jours). M1 : ADN de *L. plantarum* et M2 : ADN d'*E. coli*. M3: *C. apicola*, M4: *L. elongisporus*. Identification des bandes dans le Tableau 19 et 20.

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) réalisée sur les profils DGGE a montré deux clusters principaux à 63% et 70% de similarité respectivement pour les profils bactériens et les profils des levures. Un des clusters regroupe les fèves fermentées pendant 2 jours et le deuxième rassemble toutes les fèves fermentées pendant 4 et 6 jours (Figure 52.a e b). Ce dernier cluster sépare deux classes à 75% sur les profils bactériens et 78% sur les profils des levures, une classe regroupe les fèves fermentées 4 jours et la deuxième classe réunit les fèves fermentées 6 jours. Sur les profils des bactéries, la CAH a séparé les fèves fermentées dans des caisses en bois des deux autres techniques à 90% et 85% respectivement au 4 et 6^{ème} jour (Figure 52.a). Par contre sur les profils des levures, la CAH a discriminé les fèves fermentées en tas (feuilles de bananier) des deux autres techniques à 93% et 85% respectivement au 4 et 6^{ème} jours (Figure 52.b). L'impact de la technique a été observé qu'à partir du 4^{ème} jour de fermentation. Ces résultats ont également montré que les communautés des levures associées aux fèves fermentées en tas sont différentes des deux autres techniques. Alors que les communautés bactériennes sont différentes sur les fèves fermentées dans des caisses en plastique par rapport aux autres types de fermentations.

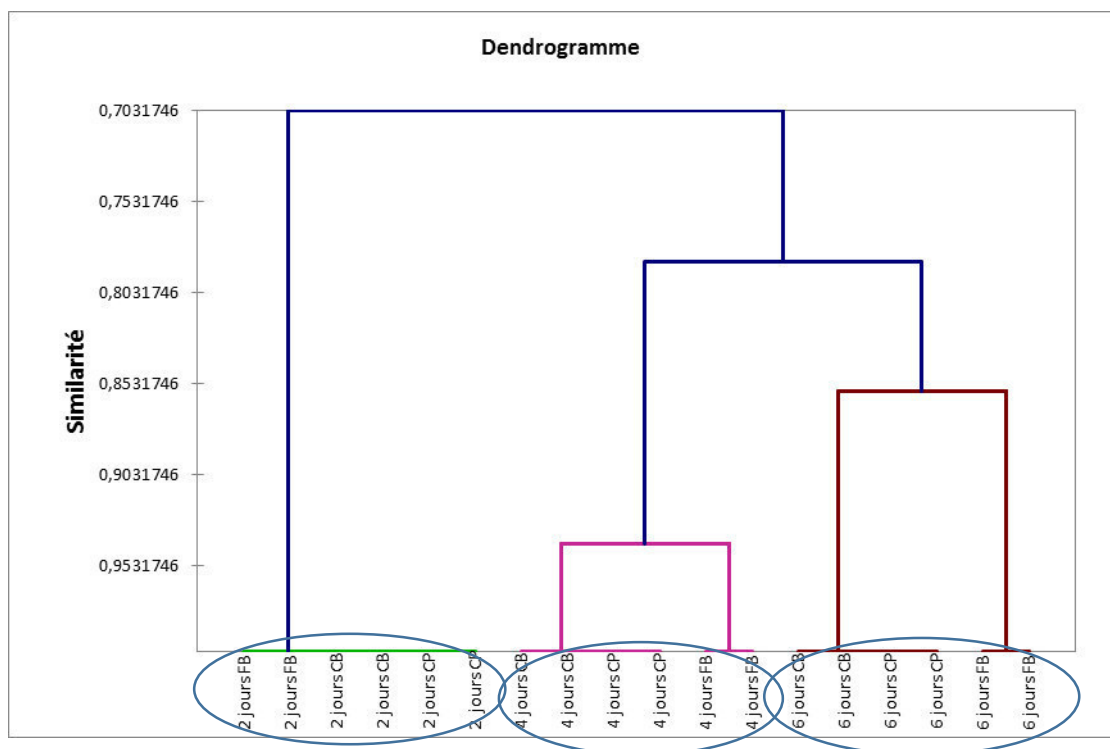
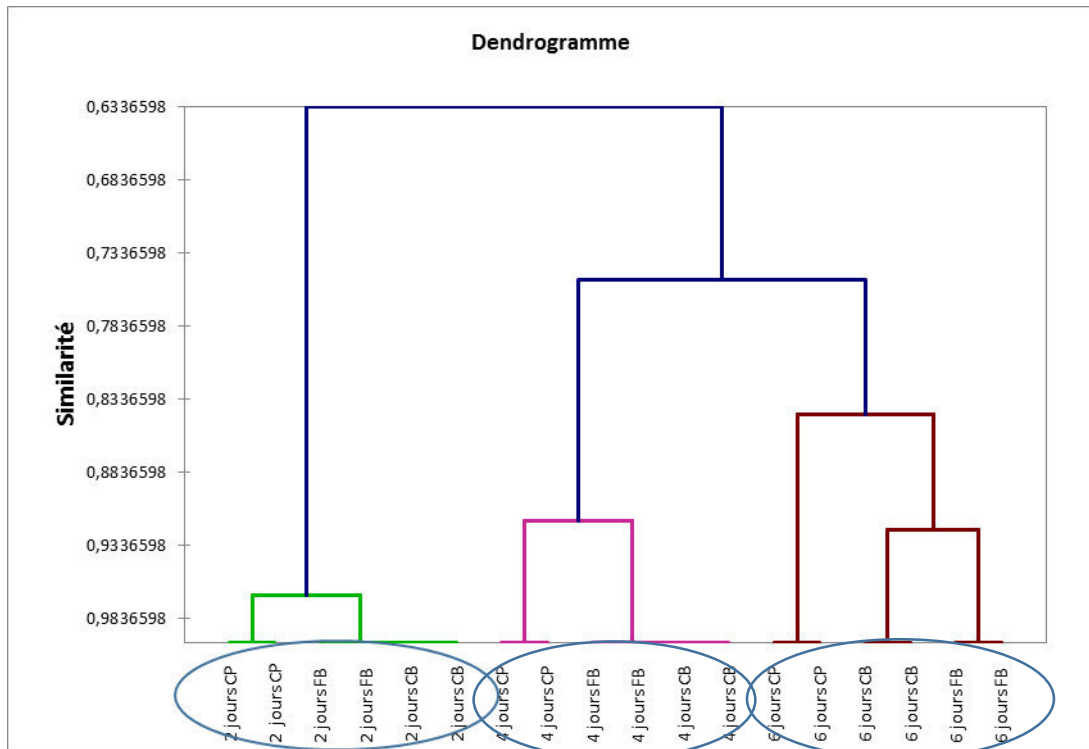


Figure 52: Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) des profils d'ADN des bactéries (a) et des levures (b) obtenus à partir des fèves fermentées dans des caisses en bois (CB), caisses en plastique (CP) et feuilles de bananier (FB).

III.1.2.2. Durée de fermentation

La durée de fermentation influence la qualité du cacao : la teneur en acides aminés augmente au cours de la fermentation et atteint une valeur maximum au 4^{ème} jour de fermentation (Hashim *et al.*, 1998 a, 1998 b) alors que la teneur en sucres diminue devient minimale au 5^{ème} jour (Rohan *et al.*, 1967). Saltini *et al.* (2013) affirment d'après les données de la littérature qu'un procédé de fermentation plus long que de 4 à 5 jour n'améliore pas le potentiel aromatique des fèves de cacao, à la place il pourrait être nuisible à la qualité par le développement des moisissures. Toutefois, cela n'exclut pas que le taux de fermentation peut être augmenté ou diminué à l'intérieur en dehors de cette durée, en fonction de la fermentation souhaitée. Dans notre étude, l'effet de trois durées de fermentation (2, 4 et 6 jours) sur l'écologie microbienne du cacao a été étudié.

Les profils DGGE montrent que les communautés microbiennes varient selon la durée de fermentation. Sur les profils d'ADN bactériens nous observons une dominance des entérobactéries (représentent 57,14% des espèces identifiées) sur les fèves fermentées à 2 jours, dominance qui diminue au fur et à mesure que la durée de fermentation se prolonge (Figure 53.a). Par ailleurs, les AAB sont dominantes sur les fèves fermentées à 4 et 6 jours.

Les profils d'ADN des levures montrent des communautés spécifiques pour chaque durée de fermentation. Par exemple le genre *Candida* sp est uniquement détecté sur les fèves fermentées à 4 jours, d'autres espèces appartenant au genre *Pichia* apparaissent également avec l'augmentation de la durée de fermentation (Figure 53.b). Nous concluons que les communautés microbiennes varient en fonction de la durée de fermentation, plus la durée augmente, plus le nombre d'espèces bactériennes diminue.

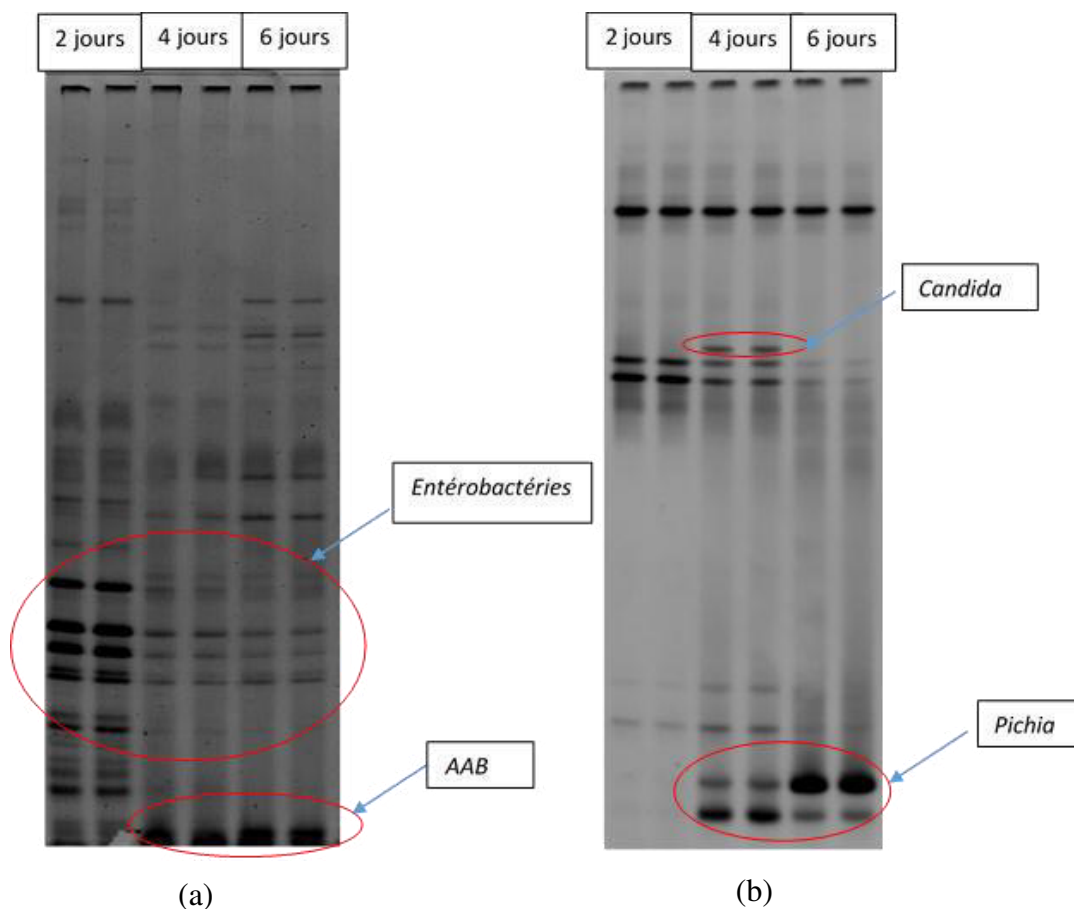


Figure 53: Profils DGGE de l'ADN des bactéries (a) et des levures (b) obtenus à trois intervalles de temps de fermentation (2, 4 et 6 jours).

III.1.2.3. Effet de l'aération durant la fermentation

Une étude comparative de deux types de fermentations avec des masses de fèves différentes réalisée dans les mêmes conditions, a montré que la fermentation d'une masse très élevée conduirait à la diminution de l'aération pendant le processus, ce qui ralentirait l'activité de la microflore et augmenterait la température (Biehl *et al.* 1985 ; Camu *et al.*, 2008 ; Guehi *et al.*, 2010). Les études précédentes n'avaient pu montrer l'effet de l'aération sur les précurseurs d'arôme du cacao par manque de données (Saltini *et al.*, 2013). Au cours de notre étude, l'effet du brassage sur l'écologie microbienne a été étudié et l'effet sur les précurseurs d'arômes sera présenté dans le chapitre suivant.

Le brassage consiste à mélanger les fèves de cacao par les mains lors de la fermentation. Deux types de fermentations ont été réalisés, une fermentation avec brassage à 48 h et 96 h et l'autre sans brassage (Figure 54). Une analyse comparative de l'écologie microbienne a été effectuée sur des fèves fermentées à 2 et 5 jours.



Figure 54 : Fermentation avec et sans brassage.

Les profils DGGE des ADN bactériens présents sur les fèves fermentées ont montré des communautés bactériennes communes entre les deux types de fermentation (avec et sans brassage), seule le volume des bandes qui les a différencié et qui était plus important dans le cas de la fermentation menée par brassage. Ceci est expliqué par le développement des espèces aérobies en présence d'aération (Figure 55.a) qui sont principalement identifiées comme *Acetobacter* et *Bacillus*. L'abondance des espèces appartenant au genre *Bacillus* est due à l'augmentation de la température après deux jours de fermentation et au moment du brassage qui favorise le développement des espèces thermophiles et/ou aérobies (Lima *et al.*, 2011).

Sur les profils d'ADN des levures nous observons plus d'espèces en absence de brassage avec des bandes plus intenses comme *H. opuntiae* (1), *P. kudriavzevii* (10) et *P. manshurica* (11) (Figure 55.b). Ceci est peut être expliqué par le fait que ces microorganismes se développent mieux en absence d'aération vu que les levures interviennent dans la phase anaérobie de la fermentation.

La différence au niveau des communautés microbiennes entre les deux types de fermentation est observée après 48h de fermentation, et cela est expliqué par l'effet de brassage qui a été effectué à 48h.

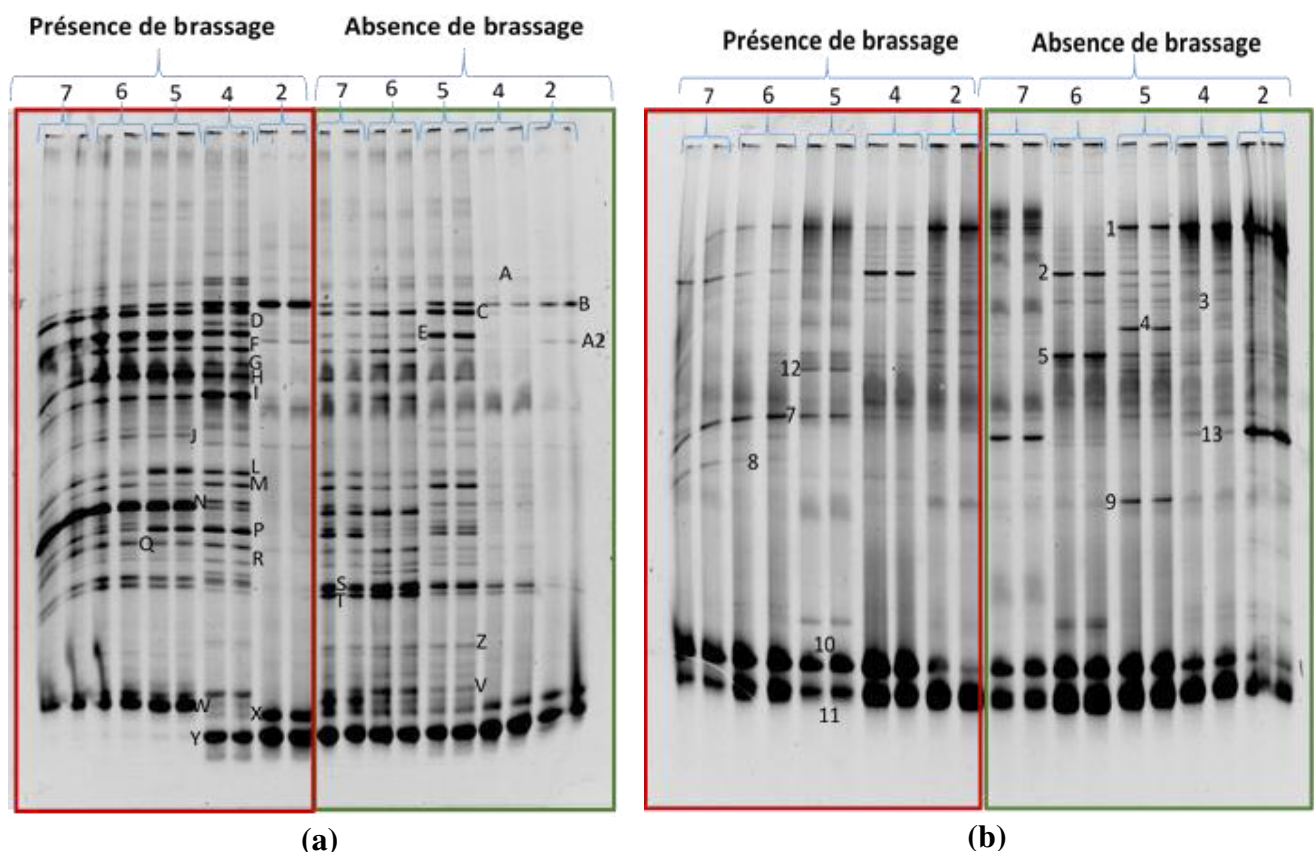


Figure 55: Comparaison des profils DGGE d'ADN bactériens (a) et levuriens (b) au cours de la fermentation des fèves de cacao avec et sans brassage. 2, 4, 5, 6 et 7 représentent la durée de fermentation. Identification des bandes dans le tableau 17 et 18.

III.2. Dynamique des communautés microbiennes du cacao au cours du traitement post-récolte

La dynamique des communautés microbiennes du cacao a été suivie au long de toutes les étapes post récolte depuis l'écabossage jusqu'au séchage. Le gel DGGE (Figures 56 et 57) représente le profil microbien des échantillons prélevés lors de l'écabossage (0 jours), au cours des fermentations (2, 4 et 6 jours) dans des caisses en bois dont la durée totale de fermentation est de 6 jours puis au cours du séchage (2, 3 et 4 jours). Les analyses ont été réalisées en duplicat.

Le séchage est un processus qui permet de réduire la teneur en eau des fèves fermentées à jusqu'à environ 8%. La température, la durée et les méthodes de séchage ont un impact sur la qualité du cacao. Des études ont montré qu'au cours du séchage, la teneur en acides, principalement l'acide acétique, diminue et que la contamination par les moisissures augmente avec la durée de séchage (Faborode *et al.*, 1995 ; Hashim *et al.*, 1999 ; Jinap *et al.*, 1994 ; Hii *et al.*, 2006). L'objectif de notre étude était de vérifier si les communautés microbiennes

associées aux fèves fermentées varient au cours du séchage et si la durée de ce dernier a un impact sur l'écologie microbienne.

➤ *Analyse des communautés bactériennes associées aux fèves de cacao fermentées dans des caisses en bois et séchées au soleil*

Les profils DGGE sont obtenus à partir d'ADN bactérien extrait à différentes étapes au cours de la fermentation et du séchage. Deux bandes d'ADN sont détectées sur les fèves fraîches ; une a été identifiée comme l'ADN du Chloroplaste (*Q*) et la deuxième n'a pas été identifiée (Figure 56). Ces deux bandes sont détectées sur tout le procédé mais ne sont pas informatives (ne font pas partie des communautés microbiennes). Par contre, après 2 jours de fermentation, nous observons la présence d'un nombre élevé d'espèces bactériennes (13 bandes), dont la plupart appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* : *Shigella dysenteriae* (*V*), *Enterobacter sp* (*N et M*), *Escherichia albertii* (*I*), *Escherichia sp* (*U*), *Escherichia fergusonii* (*R*), *Tatumella terrestris* ou *T. saanichensis* (*O*). Deux autres bandes sont détectées au 2^{ème} jour et identifiées comme des bactéries acétiques (AAB) du genre *Acetobacter* : *A. pasteurianus* (*W*) et *Acetobacter sp* (*X*) (Figure 56+ Tableau 19). Après 4 jours de fermentation, des bandes précédemment détectées (2 jours) restent présentes comme les bandes (*N, O et M*), les autres espèces d'Entérobactéries ne sont plus détectées au 4^{ème} jour. Deux nouvelles bandes correspondent également à des AAB, *Acetobacter sp* (*D*) et *Acetobacter sp* (*J*) qui s'ajoutent aux deux bandes AAB mentionnées précédemment (2^{ème} jour). *L. fermentum* (*C*), *Weeksella sp* (*E*), *Enterobacter cloacae* (*F*) et *Acetobacter lovaniensis* (*H*) sont détectées à 6 jours de fermentation. Toutes les bandes correspondant aux espèces AAB restent détectables sur la totalité du procédé de fermentation.

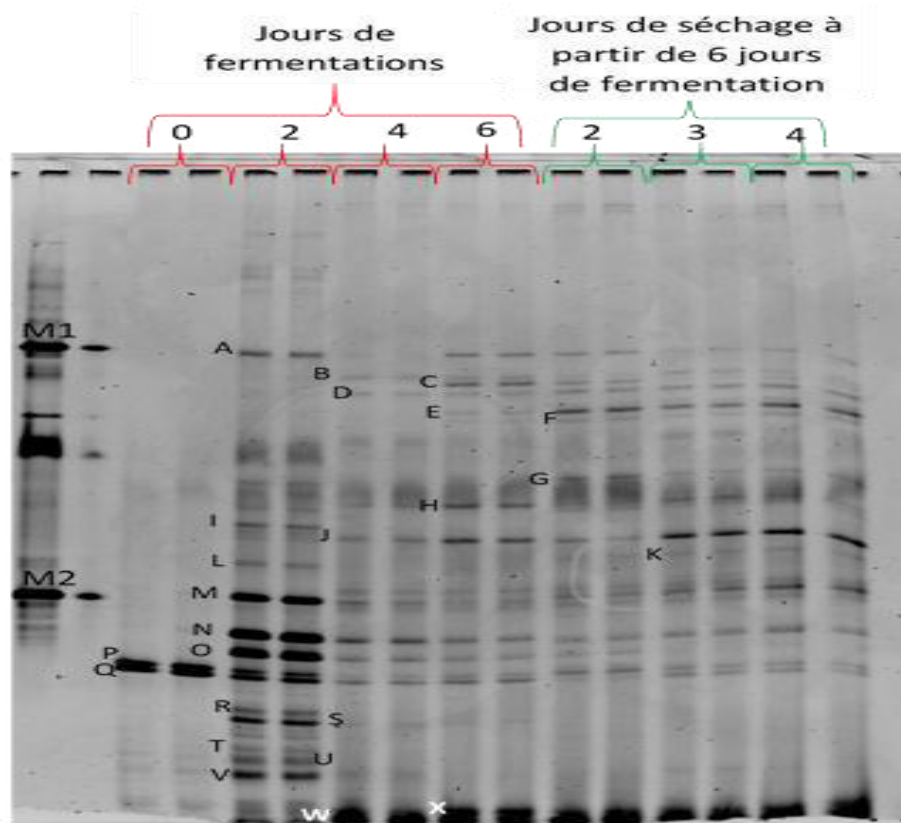


Figure 56: Profils DGGE des ADN des bactéries extraits des fèves de cacao au cours de la fermentation (caisses en bois) et du séchage. Nombre de jours de fermentation (0, 2, 4, 6) et jours de séchage (2, 3, 4) des fèves fermentées 6 jours. M1 : ADN de *L. plantarum* et M2 : ADN d'*E. coli*. Toutes les espèces identifiées sont consignées dans le Tableau (19).

Tableau 19 : Identification des bandes d'ADN bactérien par séquençage de l'ADN 16S.

Bande	Famille/ genre/ espèce	% d'identité	% Query cover	E-value	N° d'accès
A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	100%	1e-46	KM875556
B	NI				
C	<i>Lactobacillus fermentum</i>	95%	98%	1e-58	EU130908
E	<i>Weeksella sp</i>	96%	100%	1e-52	JX628863
F	<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	100%	4e-50	HG421017
G	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	97%	100%	1e-47	CP004360
H	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	98%	100%	8e-47	HM217974
I	<i>Escherichia albertii</i>	97%	100%	2e-58	HM194885
J	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	100%	100%	3e-51	KC485819
K	<i>Clostridium sp</i>	100%	100%	4e-41	KF581533
L	NI				
M	<i>Enterobacteriaceae</i>	92%	100%	1e-48	EF474081
N	<i>Enterobacteriaceae</i>	99%	100%	5e-94	EF474081
O	<i>Tatumella saanichensis</i>	100%	100%	2e-97	JQ726633
	<i>Tatumella terreia</i>	100%	100%	2e-97	JQ726629
P	NI				
Q	<i>Chloroplast DNA</i>	100%	100%	4e-41	KJ566590
R	<i>Escherichia fergusonii</i>	100%	100%	7e-97	KM577680
S	<i>Tatumella saanichensis</i>	100%	100%	2e-98	EU215774
T	NI				
U	<i>Escherichia sp</i>	100%	100%	2e-68	HM346189
V	<i>Shigella dysenteriae</i>	100%	100%	8e-62	KC768788
W	<i>Acetobacter sp</i>	100%	100%	1e-52	AB906414
D	<i>Acetobacter sp</i>	100%	100%	2e-54	AB906414
X	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	100%	100%	1e-83	KJ095003
	<i>Acetobacter sp</i>				KM596913
i	<i>Escherichia coli</i>	100%	100%	1e-69	CP011343

NI : non identifiée

➤ *Analyse des communautés levuriennes associées aux fèves de cacao fermentées dans des caisses en bois et séchées au soleil*

Une seule bande est détectée sur les fèves fraîches qui correspond à *Hanseniaspora opuntiae* (1) et qui est l'espèce dominante au cours de toute l'étape de fermentation (Figure 57). Quatre autres bandes sont détectées et identifiées comme *Candida insectorum* (3), *Pichia kudriavzevii* (4), un groupe d'espèce du genre *Pichia* (5) et une bande (6) non identifiée après 2 jours de fermentation. Après 4 jours, les bandes majoritaires (1, 3 et 4) restent détectables, et 3 bandes apparaissent et correspondent à *Candida sp* (2), *P. kudriavzevii* (7) et *P. manshurica* (8) (Figure 57+ Tableau 20).

Au 6^{ème} jour de fermentation, les bandes (2 et 5) *Candida* et *Pichia* ne sont plus détectables alors que les bandes (1, 3, 4, 6, 7 et 8) restent présentes et sont retrouvées après 3 jours de

séchage. Au dernier jour de séchage, seulement la moitié du nombre de bandes trouvées sur les 3 jours (3 bandes) sont détectées *H. opuntiae* (1), *P. kudriavzevii* (7) et *P. manshurica* (8).

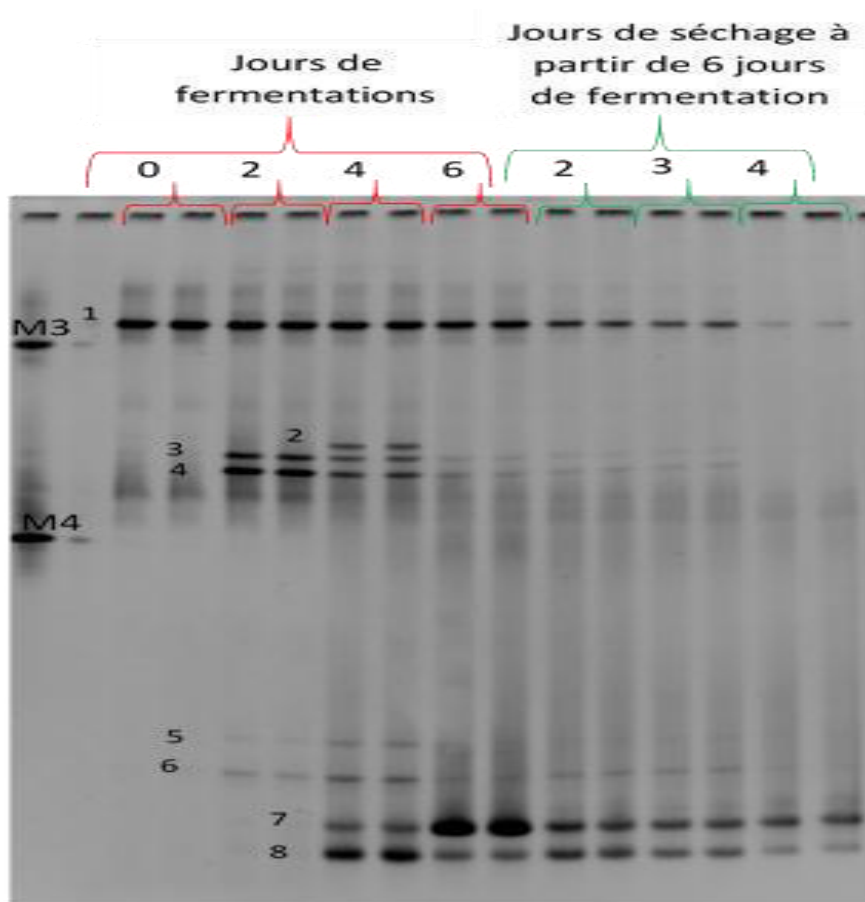


Figure 57: Profils DGGE des ADN des levures extraits des fèves de cacao au cours de la fermentation (dans caisses en bois) et du séchage. Nombre de jours de fermentation (0, 2, 4, 6) et jours de séchage (2, 3, 4). M3 : ADN de *C. apicola*, M4 : ADN de *L.elongisporus*. Identification des bandes levuriennes dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Espèces de levures identifiées par séquençage de l'ADN 26S

Bande	Famille/ genre/ espèce	% d'identité	% Query cover	E-value	N° d'accès
1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	98%	100%	6e-93	KC111446
2	<i>Candida sp</i>	99%	100%	2e-87	AB285026
3	<i>Candida insectorum</i>	98%	100%	2e-81	AB365476
4	<i>Pichia kudriavzevii</i>	95%	100%	4e-100	JQ650230
5	Species group of <i>Pichia</i> : <i>Pichia klyvera</i> <i>Pichia fermentans</i>	89%	100%	3e-49	KP132503 KC905053
6	<i>Pichia galeiformis</i>	100%	100%	4e-49	JX880398
7	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99%	100%	2e-47	KC494718
8	<i>Pichia manshurica</i> (<i>Pichia galeiformis</i>)	99%	100%	7e-118	JQ419868 JQ419986

L'analyse globale de l'écologie bactérienne et levurienne a montré que les étapes de traitement post-récolte ont une influence sur les variations de l'environnement microbien en terme de nombre d'espèces détectées. L'ACP réalisée sur l'ensemble des profils DGGE de bactéries et levures a permis de séparer 3 groupes d'échantillon par l'axe F1. Un groupe comprend les fèves fraîches, le deuxième regroupe les fèves fermentées durant 2 et 4 jours et le 3^{ème} groupe comprend les fèves fermentées durant 6 jours (fermentées ou séchées) (Figure 58.a). Les bandes d'ADN discriminantes sont également représentées (Figure 58.b), les espèces d'Entérobactéries sont les plus discriminantes sur la première étape de fermentation (2 et 4 jours). Trois bandes faisant partie du genre *Escherichia* (U, I, R) et d'autres comme *Tatumella* (S) et *Shigella* (V) sont également discriminantes de la durée de fermentation à 2 jours. Des espèces de levure sont également discriminantes de cette durée (2 jours) à savoir : *P. kudriavzevii* (4) et le groupe (5). La plupart des bandes discriminantes du dernier jour de fermentation et de l'étape du séchage sont des bactéries : *L. fermentum* (C), *Weeksella* sp (E), *Gluconacetobacter xylinus* (G), *Clostridium* sp (K) et *Acetobacter* sp (W) et *Acetobacter pasteurianus* (X). La communauté bactérienne subit des changements très importants après 2 jours de fermentation ; la plupart des espèces d'Entérobactéries disparaissent, ces dernières peuvent contribuer à la fermentation du glucose en acide lactique et en acide citrique (Grimont et Grimont, 2006). D'autres études ont montré que les Entérobactéries étaient impliquées durant la phase initiale de fermentation (Garcia-Amisen *et al.*, 2010; Papalexandratou *et al.*, 2011a, b, c, 2013). *Tatumella saanichensis* peut être impliquée dans la dégradation des pectines de la pulpe de cacao et l'assimilation de l'acide citrique (Marin-Cevada *et al.*, 2010).

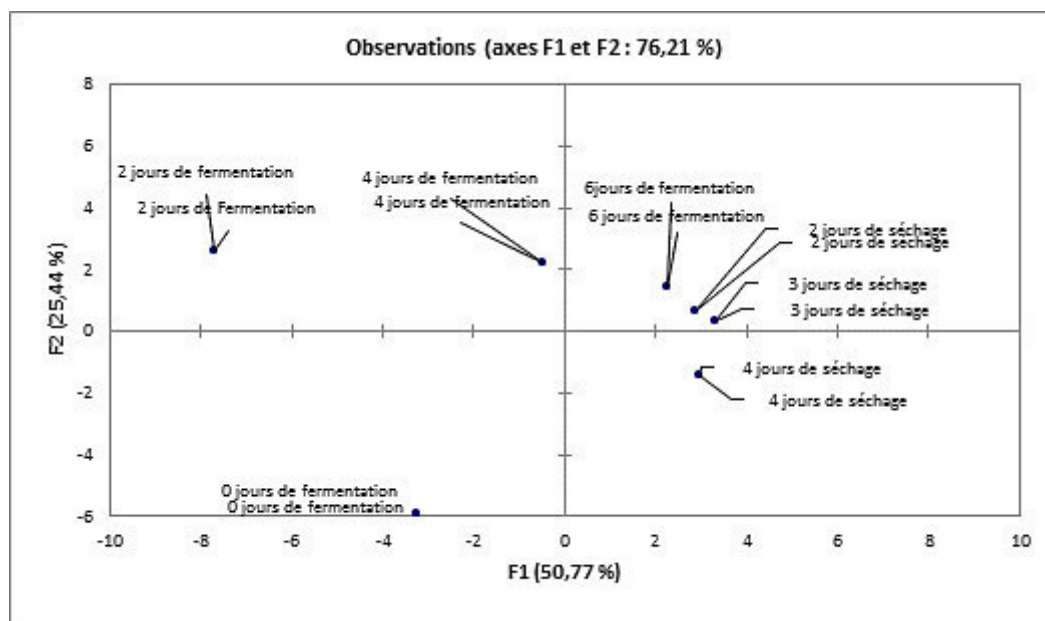


Figure 58: Analyse en composantes principales réalisée sur l'ensemble des profils DGGE (bactéries et levures) (a) réalisés sur les fèves de cacao au cours du traitement post-récolte (fermentation dans des caisses en bois et séchage). Les variables discriminantes sont représentées (b). (0F, 2F, 4F et 6F) : jours de fermentation, (2F, 3F et 4S) : jours de séchage.

L. plantarum domine durant toute la fermentation alors que *L. fermentum* est détectée seulement à la fin de celle-ci. *L. plantarum* a été déjà isolée au cours de la fermentation du cacao Malaisien, Brésilien, Ivoirien et Ghanéen (Gracia-Amisen *et al.*, 2010 ; Papalexandratou *et al.*, 2011a,b,c, et 2013 et Camu *et al.*, 2007). *L. fermentum* a été isolée sur les fèves fermentées et est considérée souvent comme l'espèce dominante (Nielsen *et al.*, 2007b ; Camu *et al.*, 2007, 2008b ; Kostinek *et al.*, 2008, Papalexandratou *et al.*, 2011a). Dans notre cas *L. fermentum* est détectée à partir de la fin de la fermentation et jusqu'au 3^{ème} jour de séchage.

L'activité des bactéries acétiques (AAB) est cruciale dans la fermentation du cacao et permet d'obtenir un cacao de bonne qualité. *A. pasteurianus* et d'autres espèces d'*Acetobacter* (*A. syzygii*, *A. ghanensis*, *A. senegalensis*, *A. tropicalis* etc.), *Ga. medellinensis* (anciennement *Ga. xylinus*) et *G. oxydans* sont les AAB les plus représentées dans la fermentation du cacao (De Vuyst *et al.*, 2010, Papalexandratou *et al.*, 2011 et 2013). Deux bandes identifiées AAB sont trouvées au cours des premières étapes de fermentation *A. pasteurianus* et *Acetobacter sp* et d'autres espèces identifiées comme *A. lovaniensis*, *A. cervisiae* et *Ga. Xylinus* sont présentes aux dernières étapes de fermentation à 4 et 6 jours et durant l'étape de séchage. Nielsen *et al.* (2007) ont montré la succession des différentes espèces d'AAB qui prennent place pendant la

fermentation comme *A. syzygii* et *A. pasterianus* qui sont dominantes durant les premières étapes de fermentation et *Acetobacter tropicalis* est dominante à la fin de la fermentation.

Dans notre étude, nous constatons que les AAB sont dominantes au cours des dernières étapes de fermentation et tout le long du séchage et cela peut être expliqué par leur résistance à l'acidité et à la chaleur (Ndoye *et al.*, 2006) générées à la fin de la fermentation par la fermentation acétique exothermique. Ces espèces peuvent être potentiellement utilisées comme de bons marqueurs du cacao complètement fermenté et séché.

Ga. xylinus et *Clostridium sp* sont détectées au cours de l'étape de séchage, ces espèces peuvent provenir de l'environnement (sols, matériels) et contaminent les fèves lorsqu'elles sont mises à sécher sur des bâches posées à ras le sol. Les espèces du genre *Clostridium* sont généralement considérées comme des contaminants du sol (Jeong-Dong *et al.*, 2004).

H. opuntiae est l'unique levure détectée sur les fèves fraîches de cacao, confirmant la qualité des cabosses de cacao et la stérilité relative des fèves à l'intérieur du fruit. Cette espèce peut être présente à la surface du fruit, elle a été impliquée dans la majorité des fermentations de cacao réalisées jusqu'à présent (Camu *et al.*, 2007, Lefebvre *et al.*, 2011, Papalexandratou & De Vuyst, 2011, Papalexandratou *et al.*, 2011a, b, c, 2013). Dans notre cas, *H. opuntiae* était dominante sur toutes les étapes de la fermentation et du séchage suivie par *P. kudriavzevii* et *P. manshurica*.

Au cours du séchage, l'intensité des bandes identifiées comme *H. opuntiae*, *C. insectorum*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica* diminue et à la fin du séchage seulement trois espèces sont détectées. Les autres bandes disparaissent au cours de cette étape et aucune nouvelle espèce n'apparaît. Les variations des communautés de levures associées aux fèves fermentées sont plus importantes que celles associées aux fèves durant l'étape de séchage. Une espèce (*Candida sp*) était détectée à une étape spécifique avant la fin de fermentation (4 jours). Cette espèce peut être spécifique aux fèves subissant une fermentation incomplète.

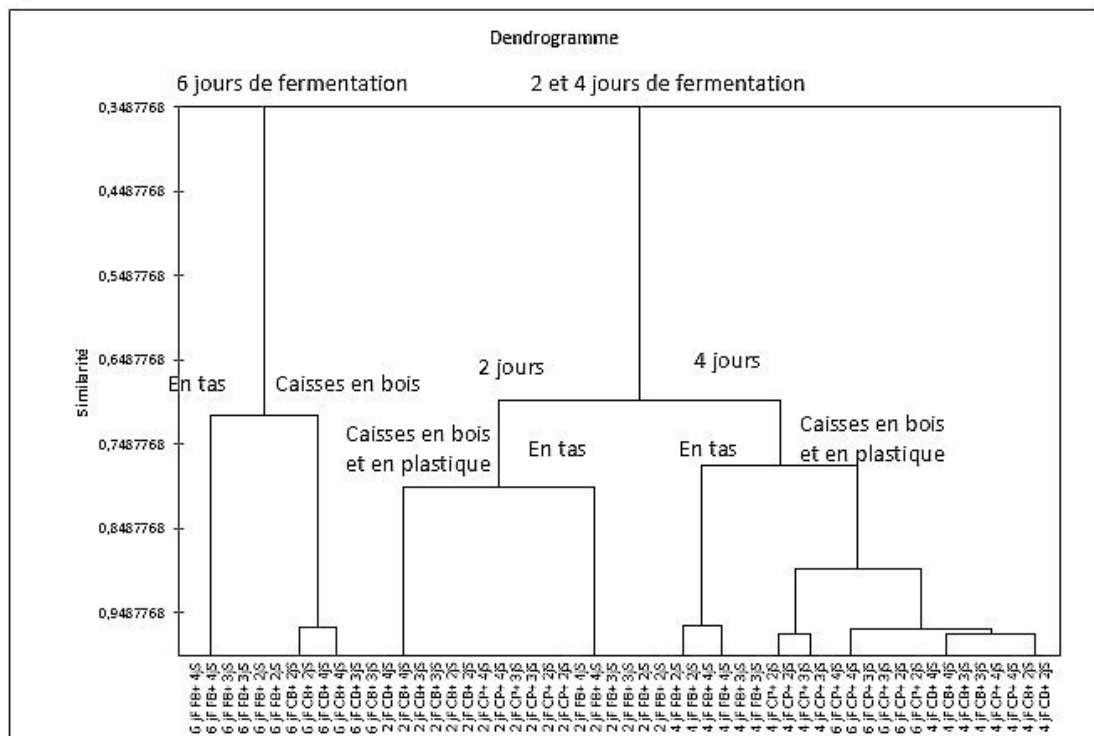
En conclusion de cette partie, la structure des populations microbiennes subit de grandes variations au cours des fermentations par rapport à l'étape de séchage qui provoque seulement de petits changements comme la disparition de quelques espèces et l'apparition de deux nouvelles espèces. L'analyse statistique a permis de montrer l'impact des jours de fermentation et a ainsi discriminé la dernière étape de fermentation et toute l'étape du séchage (4 jours) par rapport aux premières étapes de séchage (2 et 3 jours).

III.3. Conclusion partielle

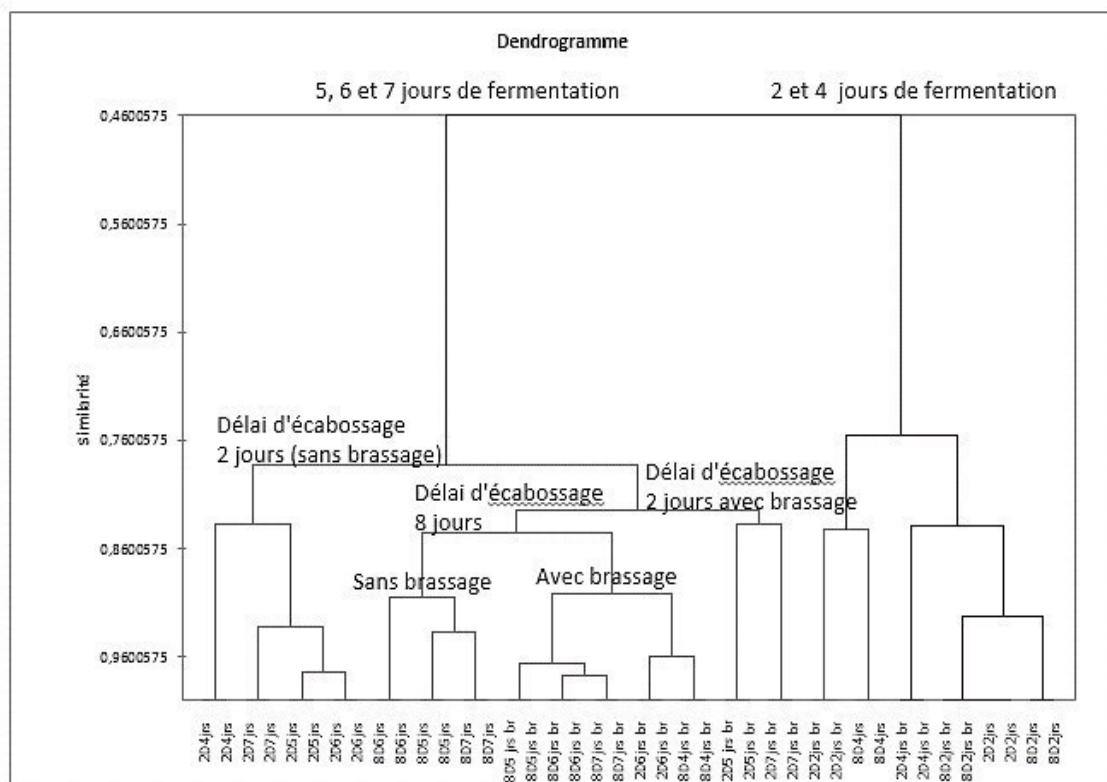
Lors de cette étude, Plusieurs paramètres influençant la structure des communautés microbiennes associées ont été étudiés au cours des traitements post-récolte du cacao. L'effet de la durée de stockage des cabosses avant ouverture a été étudié au cours de la fermentation et a montré que l'augmentation de la durée de stockage favorise la présence et l'abondance des levures et de quelques entérobactéries qui peuvent être présentes sur la surface des fruits et se multiplient au cours du temps de stockage. L'utilisation de différentes techniques de fermentation présente un effet mineur sur l'écologie microbienne des fèves fermentées ; par contre le brassage favorise la présence et la croissance des bactéries aérobies et thermophiles et défavorise l'abondance des levures anaérobies. Avant le procédé de fermentation, les fèves fraîches sont censées être stériles. L'analyse de ces fèves a montré la présence d'une seule espèce de levure *H. opuntiae* qui est sûrement présente sur la surface des fruits. Nous supposons que la flore de fermentation provient de l'environnement ou des manipulations (matériels de fermentation, mains des agriculteurs). Au cours de la fermentation, il a été observé que les bactéries sont les communautés dominantes et présentent un nombre élevé d'espèces comparées aux levures qui constituent un nombre réduit d'espèces. Les communautés microbiennes subissent de grandes variations au cours de la fermentation et cela a été déjà largement montré par de nombreuses études sur la succession des flores de fermentation du cacao (Camu *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2008, Papalexandratou *et al.*, 2011 a, 2011b et 2013). L'originalité de notre travail a été l'étude de la dynamique des populations au cours de l'étape de séchage qui n'avait jamais été effectuée auparavant. Le séchage influence principalement les communautés bactériennes qui sont affectées par la durée de fermentation des fèves. En effet l'impact de séchage était plus élevé sur les fèves fermentées moins longtemps.

Les échantillons des fèves de cacao provenant de deux saisons de récolte, nous ont permis de mesurer les paramètres influençant la structure des communautés microbiennes associées au cacao. Les échantillons récoltés en mars nous ont permis d'étudier l'effet de la technique de fermentation, la durée de fermentation. Alors que les échantillons récoltés en novembre ont été analysés dans le but d'étudier l'impact du délai d'écabossage, la durée de fermentation et le brassage lors de la fermentation. Afin de mesurer l'impact de ces paramètres et voir quel est l'impact principal influençant l'écologie microbienne, une Classification Hiérarchique Ascendante a été appliquée sur les profils DGGE d'ADN microbien (bactérien et levurien) obtenus pour chaque saison de récolte et non pas sur les profils des moisissures vu que ces derniers n'ont pas été détectées. Les études sur les deux saisons sur réalisé sur un nombre

représentatif d'échantillon suggèrent que la durée de fermentation est l'effet principal responsable de la variation des communautés microbiennes du cacao. L'analyse regroupe les durées de fermentation de 2 et 4 jours et les sépare du reste des durées de fermentation réalisées en mars (Figure 59.a) et de celles effectuées en novembre (Figure 59.b). L'effet de la durée de fermentation est suivi de l'effet de la technique de fermentation (Figure 59.a), et enfin l'effet du délai d'écabossage et le brassage (Figure 59.b).



(a)



(b)

Figure 59: Classification Hiérarchique Ascendante appliquée sur les profils DGGE d'ADN microbien (bactérien et levurien) obtenus à partir des fèves de cacao fermentées et récoltées en mars (a) et novembre 2013 (b).

Ci-dessous un schéma qui résume l'effet des paramètres post-récolte sur l'écologie microbienne du cacao (Figure 60).

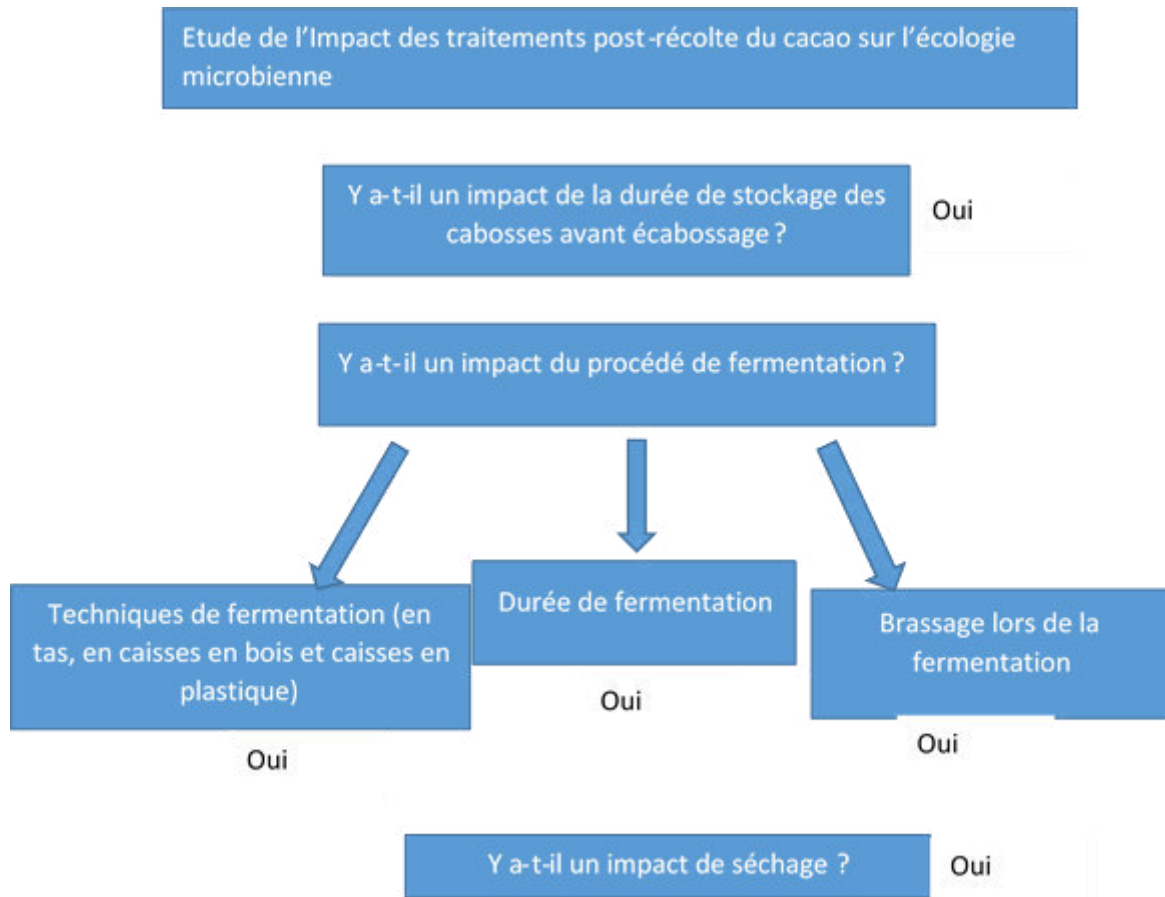


Figure 60 : Réponses aux questions de recherche posées.

Chapitre III. Discrimination des traitements post-récolte du cacao par l'analyse de ses composés aromatiques

Selon la littérature, l'arôme du cacao est largement dépendant des traitements post-récoltes comme la fermentation et la torréfaction, alors que le séchage a généralement un effet mineur sur l'arôme du cacao (Afoakwa *et al.*, 2008 ; Rodriguez *et al.*, 2011 ; 2012). La flore microbienne joue un rôle primordial dans l'élaboration des précurseurs aromatiques du cacao. La composition de cette flore varie selon le type de traitement appliqué, comme cela a été déjà montré dans le chapitre précédent par l'analyse globale de l'écologie microbienne. Une analyse globale des composés volatils a été réalisée par SMPE-GC-MS sur 3g d'échantillons de poudre de fèves de cacao utilisés précédemment pour l'analyse par PCR-DGGE, dans le but d'étudier l'impact des pratiques post-récolte (brassage, délai de stockage avant écabossage et durée de fermentation) sur les composés volatils. Pour chaque analyse trois répétitions sont effectuées. Effectivement les études précédentes n'ont pu montrer les effets des pratiques post-récolte sur les précurseurs d'arôme du cacao par insuffisance de données (Saltini *et al.*, 2013). L'autre objectif de cette étude est de relier l'analyse globale de l'écologie microbienne à la composition en composés volatils. Les acides organiques non volatils ont été également dosés afin d'évaluer l'effet des procédés sur l'acidité des fèves de cacao.

L'objectif de l'étude est de voir l'évolution des familles des composés volatils au cours des procédés post-récoltes, pour cela nous avons représenté les résultats par la somme des surfaces des pics des composés de chaque famille.

Un petit rappel sur l'échantillonnage : des fèves provenant des cabosses stockées 2 et 8 jours avant écabossage sont mises à fermenter dans des caisses en bois, une avec brassage à 48 h et à 96 h de fermentation et l'autre sans brassage. L'échantillonnage a été réalisé au cours de la fermentation à 2, 4, 5, 6, et 7 jours et chaque échantillon a été séché pendant 7 jours. Les analyses par SMPE ont été effectuées sur des broyats de fèves fermentées et séchées.

III. 1. Effet du brassage sur les composés volatils

Les composés volatils détectés se répartissent en six familles : alcools, aldéhydes, cétones, esters, acides, pyrazines. Un seul composé phénolique est également détecté (Tableau 21). Les surfaces des pics des composés volatils ont été analysées par l'analyse des variances (ANOVA) pour tester les différences significatives entre les échantillons.

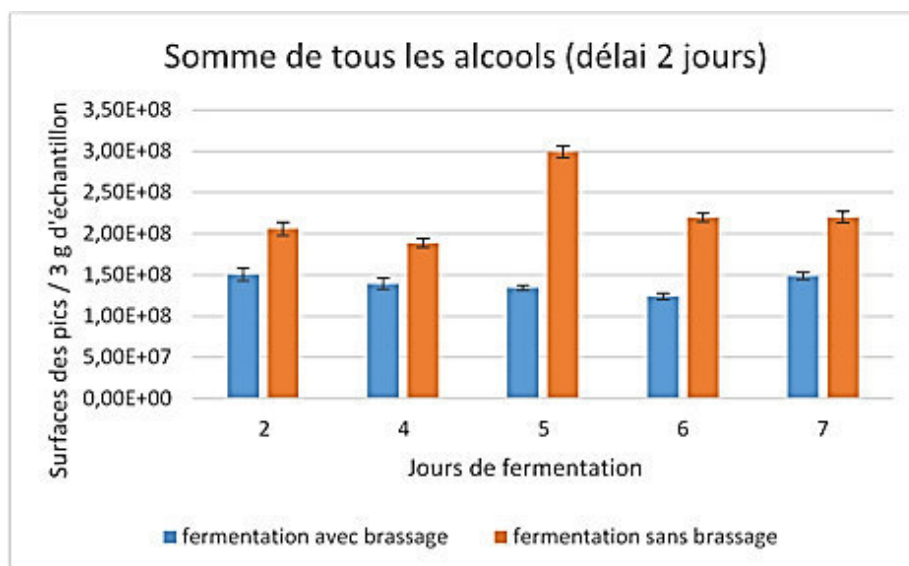
Tableau 21 : Les composés volatils identifiés des fèves de cacao

Composés volatils	Temps de rétention	Indices de kovats (calculés)	Indices de kovats (littérature)
Isobutanol	1,50	811	821
Acétate d'éthyle	1,94	886	885
2-Méthylbutanal	2,15	910	912
3-Méthylbutanal	2,19	913	910
Isovalérate de méthyle	2,28	920	916
Ethanol	2,46	934	929
2-Pentanone	2,94	971	984
Acétate d'isobutyle	3,60	1011	1005
Isopentanoate de méthyle	3,72	1016	1015
Acétate d'isoamyle	6,92	1105	1117
2-Pentanol	7,42	1115	1118
2-Heptanone	9,51	1153	1170
Isopentanol	11,44	1189	1206
Acétoïne	14,83	1252	1272
2-Heptanol	17,96	1310	1332
2-Nonanone	21,06	1367	1388
Acide acétique	24,26	1426	1449
Tétraméthylpyrazine	26,06	1460	1468
Benzaldéhyde	28,06	1497	1495
Acide isobutyrique	32,01	1570	1588
2,3-Butanediol	33,03	1588	1582
Acétophénone	35,21	1629	1645
Acide isovalérique	37,58	1680	1691
Acétate de phényléthyle	44,55	1802	1803
Phénol-2-méthoxy	46,73	1842	1848
2-phényléthanol	49,58	1895	1925

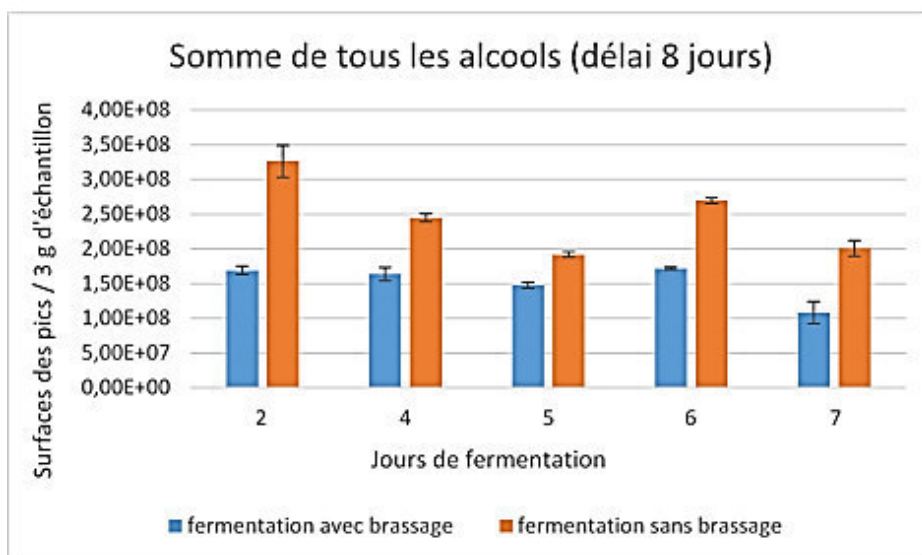
III.1.1. Effet du brassage sur les alcools obtenus durant la fermentation du cacao

Les différents composés alcooliques retrouvés sur les fèves fermentées sont : l'éthanol, le 2- pentanol, l'isopentanol, le 2-heptanol, le 2,3-butanédiol et le 2-phényléthanol. L'abondance de tous ces composés est significativement différente ($p < 0,05$) entre les fèves fermentées sans brassage et celles fermentées avec brassage (Figure 61). Sur les histogrammes, nous observons que la somme des surfaces des pics de tous les alcools est plus importante au cours de la fermentation sans brassage qu'en présence de brassage. La représentation des alcools individuellement a montré la même tendance que la représentation par famille. L'exemple de trois alcools est montré (Figure 62). Cela est peut être dû à l'évaporation des alcools par

aération des fèves vu que ces composés sont très volatils. Ce résultat concorde avec les résultats de Camu *et al.* (2008) qui ont également montré que l'éthanol disparaît plus rapidement au cours de la fermentation avec brassage grâce à la meilleure aération de la masse de fermentation. Ils ont montré aussi que l'aération favorise la croissance des bactéries acétiques (AAB) qui oxydent l'éthanol en acide acétique.



(a)



(b)

Figure 61 : Histogrammes montrant la somme de tous les alcools détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a) et 8 jours (b) avant écabossage.

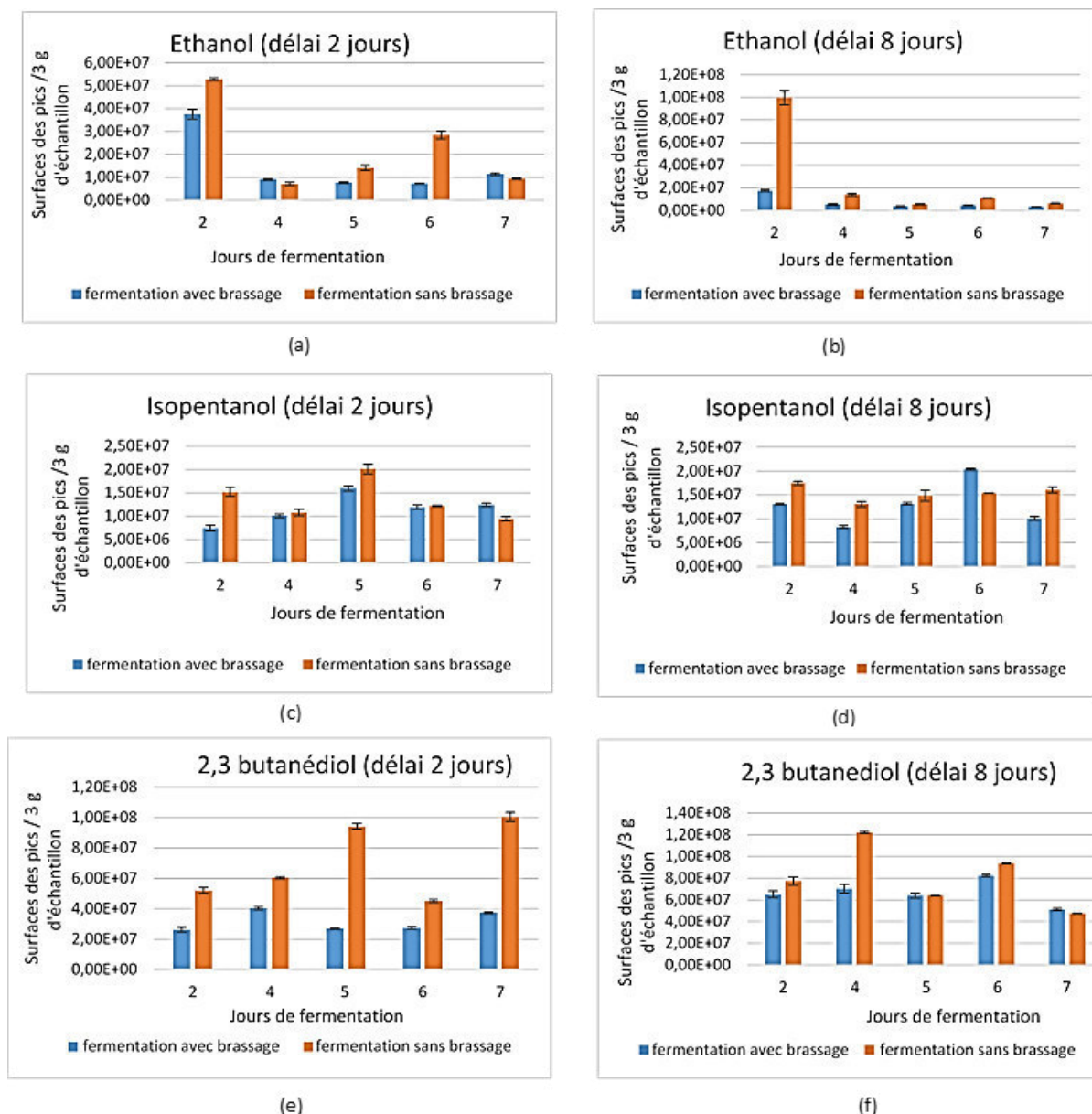


Figure 62 : Histogrammes montrant la surface des pics des alcools détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a, c et e) et 8 jours (b, d et f) avant écabossage.

III.1.2. Effet du brassage sur les aldéhydes obtenus durant la fermentation du cacao

Les différents composés d'aldéhydes rencontrés sont : l'isobutanol, le 2 et 3-méthylbutanal et le benzaldéhyde. Le test statistique (ANOVA) a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les deux fermentations avec et sans brassage seulement sur deux composés à savoir le 2- méthylbutanal et le benzaldéhyde (Figure 63). Sur les histogrammes, nous remarquons que les aldéhydes sont plus importants dans le cas de la fermentation avec brassage surtout vers la fin de fermentation (5, 6 et 7 jours) (Figure 63.c et d). Ces observations sont sûrement liées à

l'écologie microbienne, car ces composés sont produits par des réactions enzymatiques microbiennes à partir des acides aminés. La production de 2 et 3-méthylbutanal se fait généralement à partir de l'isoleucine et la leucine, alors que la production du benzaldéhyde se fait à partir de la phénylalanine par l'action des LAB (Jinap *et al.*, 1994 ; Groot and De Bont 1998, Smit *et al.*, 2004 ; Bonnarme *et al.*, 2004)). Lors du brassage, la température augmente et atteint son maximum (Camu *et al.*, 2008) ce qui augmente la vitesse enzymatique puisque l'interaction entre l'enzyme et son substrat devient plus importante à forte température, ce qui explique l'importance de la production des aldéhydes au cours de la fermentation avec brassage.

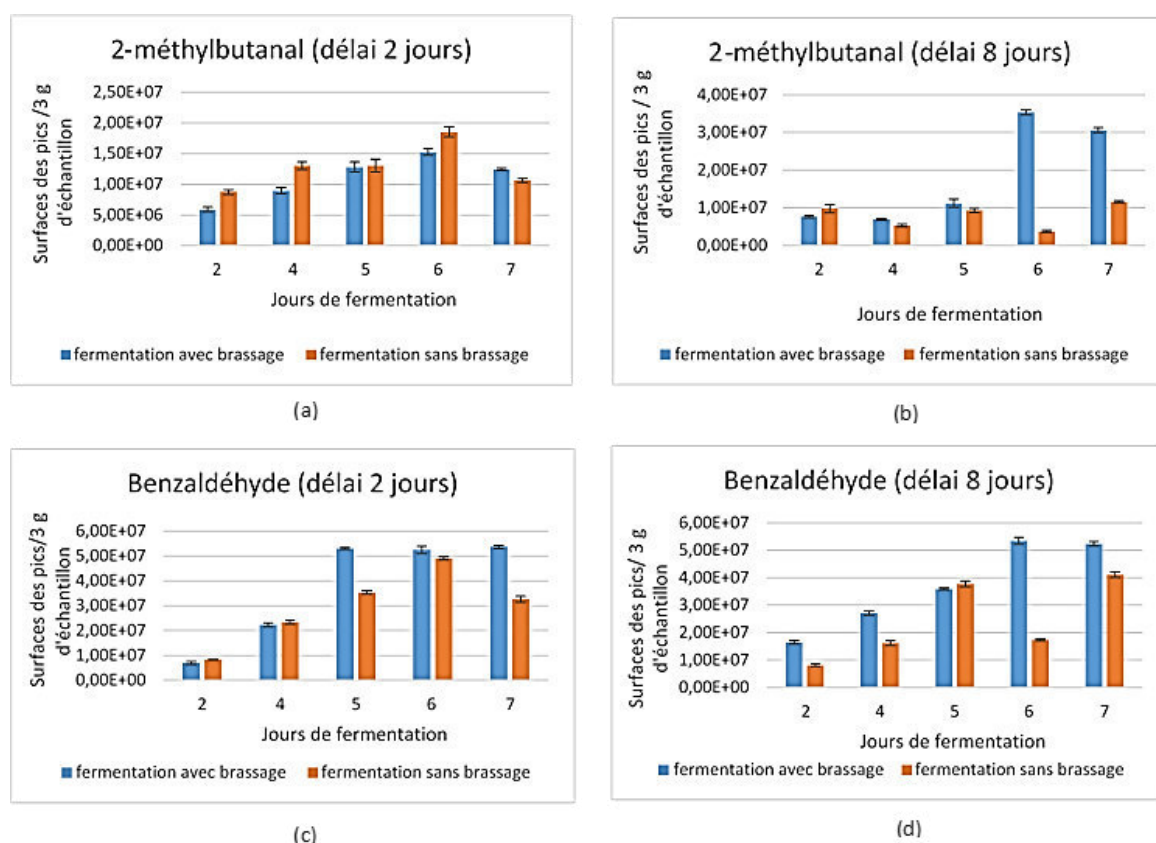
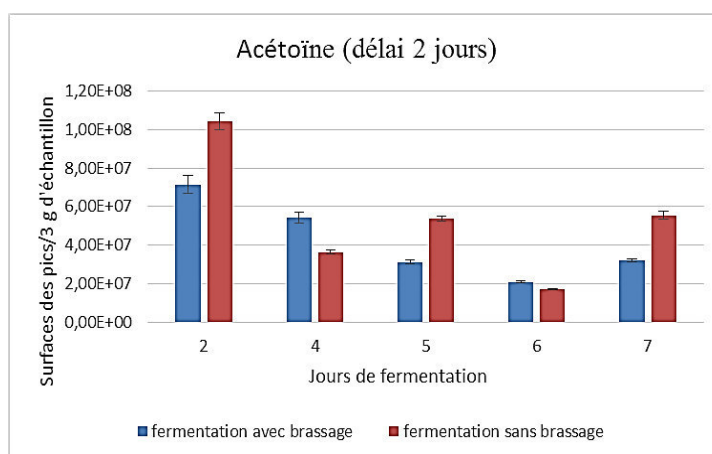


Figure 63 : Histogrammes montrant la surface des pics du 2-méthylbutanal et du benzaldéhyde détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a et c) et 8 jours (b et d) avant écabossage.

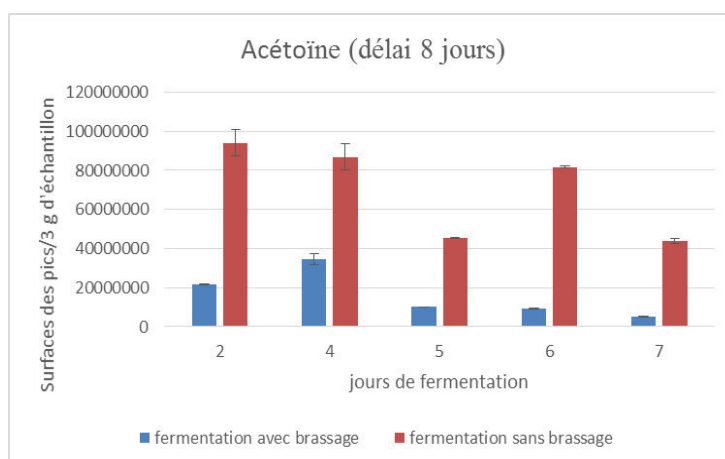
III.1.3. Effet du brassage sur les cétones obtenues durant la fermentation du cacao

Pour cette famille, les composés retrouvés sont : la 2-heptanone, la 2-pentanone, la 2-nonanone, l'acétophénone et l'acétoïne. La surface des pics de trois composés (acétoïne, 2-nonanone et acétophénone) est significativement différente ($p < 0.05$) entre la fermentation avec et sans brassage. L'acétoïne (3-hydroxy-2-butanone) représente le pic avec la plus grande

surface par rapport aux autres cétones détectées, cela montre que ce composé est le plus dominant principalement au cours de la fermentation réalisée en absence de brassage (Figure 64). L'acétophénone a été décrit comme un composé initialement présent dans les fèves fraîches et ne serait pas affecté par la fermentation (Rodriguez-Campos *et al.*, 2012). On suppose donc que les cétones naturellement présentes dans le cacao ont été plus dégradées ou catabolisées dans le cas de la fermentation avec brassage, où plus de diversité et d'abondance bactérienne mesurée par PCR-DGGE ont été observées (Chapitre II. Résultats et discussion). L'acétoïne est un précurseur d'autres composés comme la tétraméthylpyrazine (Hashim *et al.*, 1999). Elle est produite par les levures à partir du pyruvate et du 2,3 butanediol (Romano and Suzzi, 1993 ; 1996, Pretorius, 2000) et par les bactéries (Xiao and Xu, 2007) comme les LAB (Cogan *et al.*, 1981) et *Bacillus* (Liu *et al.*, 2011a).



(a)



(b)

Figure 64 : Histogrammes montrant les surfaces des pics de l'acétoïne détectées sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 jours (a) et 8 jours (b) avant écabossage.

III.1.4. Effet du brassage sur les esters obtenus durant la fermentation du cacao

Les composés détectés lors de cette étude et qui appartiennent à cette famille sont : l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isobutyle, l'acétate d'isoamyle, l'acétate de phényléthyle, l'isopentanoate de méthyle, et l'isovalérate de méthyle. L'acétate d'éthyle est l'ester le plus dominant (grand pic) par rapport aux autres, la surface de son pic est significativement différente ($p < 0,05$) entre la fermentation réalisée avec brassage et celle réalisée sans brassage avec une importance en absence de brassage (Figure 65.a). Les esters sont des molécules généralement synthétisées par les levures qui contiennent des enzymes appelées alcools estérases et qui leur permettent de synthétiser ces esters à partir des alcools produits lors de la fermentation alcoolique (Claderbank et Hammond, 1994 ; Rojas *et al.*, 2002 ; Ho *et al.*, 2014). En reliant les résultats obtenus sur l'écologie des levures avec ces résultats, nous constatons qu'au cours de la fermentation réalisée en absence de brassage, plus d'espèces de levures sont présentes et plus d'abondance (volume des bandes). L'acétate d'éthyle semble relié à une des bandes (1) identifiée comme *Hanseniaspora opuntiae* qui présente une intensité plus élevée au cours de la fermentation effectuée en absence de brassage (Figure 65.b) (chapitre II. Résultats et Discussions). La faible abondance de cette espèce sur les fèves fermentées avec brassage est peut être expliquée par la pénétration de l'air au moment du brassage en créant des conditions moins favorables au développement des levures qui réalisent la fermentation en anaérobiose. Des histogrammes sont représentés afin de mieux visualiser et montrer la relation éventuelle entre l'acétate d'éthyle et l'intensité de *H. opuntiae* qui a été relevée du logiciel ImageQuant et qui représente le rapport « volume de la bande / surface de la bande » (Figure 65.c). Cependant, la surface du pic et l'intensité de la bande présentent la même tendance. Les autres levures détectées par DGGE ont probablement un impact dans la production des esters.

La forte volatilité des esters peut également expliquer leur disparition au cours de la fermentation qui correspond à une augmentation de la température.

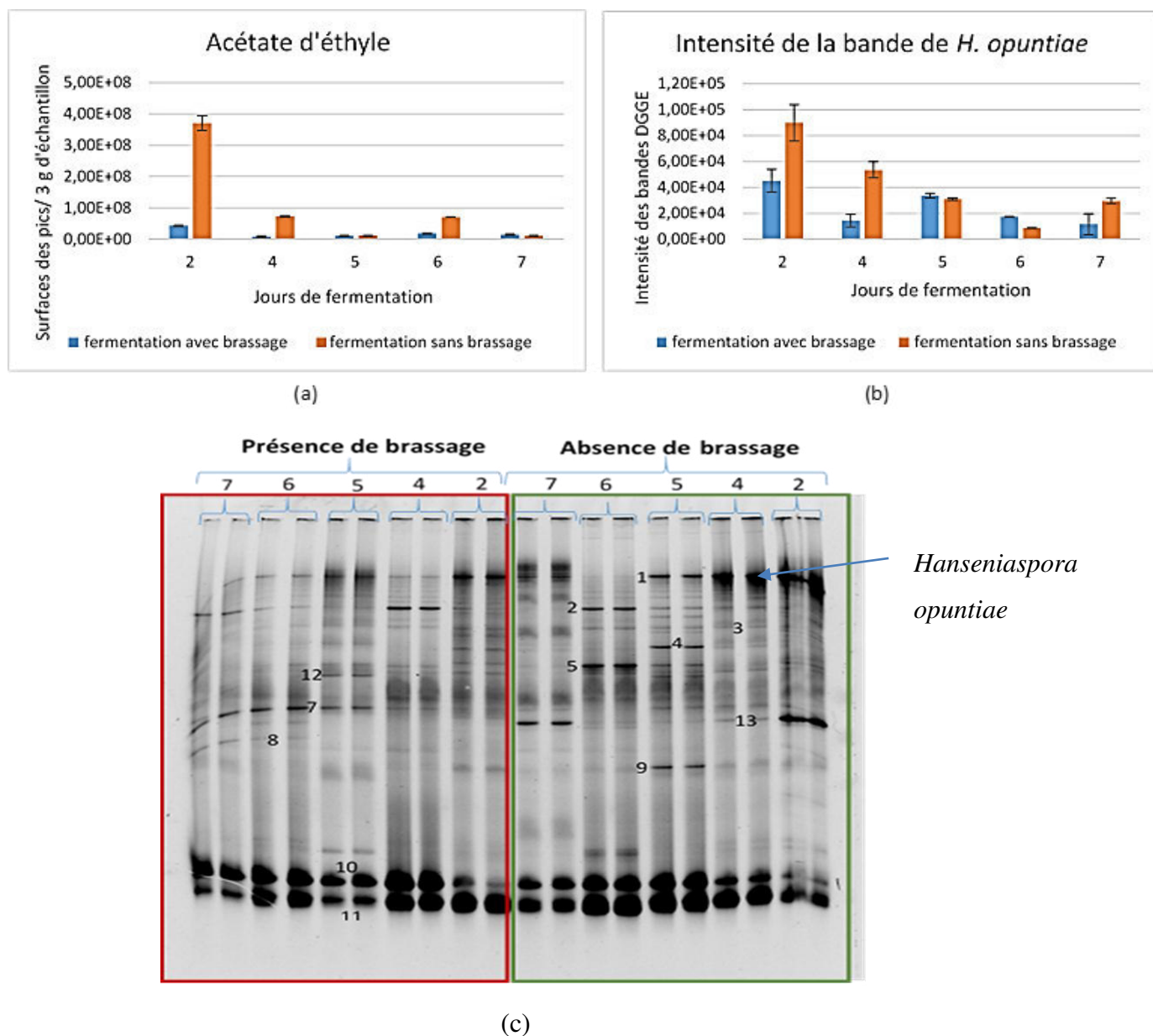


Figure 65 : Histogrammes représentant la du pic d'acétate d'éthyle et l'intensité de la bande de *H. opuntiae* détectés sur les fèves fermentées avec et sans brassage provenant du délai de stockage 8 jours avant écabossage (a et b). Profils DGGE d'ADNr 26S des levures au cours de la fermentation avec et sans brassage des fèves provenant des cabosses stockées 8 jours (c). Durée de fermentation : 2, 4, 5, 6 et 7 jours. (Identification des bandes dans le tableau 18, page 126)

III.1.5. Effet du brassage sur les acides obtenus durant la fermentation du cacao

Trois acides à chaîne carbonée courte sont détectés sur les fèves de cacao, dont l'acide acétique, qui est largement dominant par rapport aux deux autres acides, qui sont l'acide isobutyrique et l'acide isovalérique. La surface des pics d'acide acétique et d'acide isobutyrique est significativement différente ($p < 0,05$) entre la fermentation avec brassage et la fermentation

sans brassage avec une plus grande importance au niveau de la fermentation sans brassage (Figure 66.a et b). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acide acétique est très volatil et s'évapore avec l'augmentation de la chaleur au cours du brassage (Camu *et al.*, 2008). Guehi *et al.* (2010) ont expliqué la faible acidité des fèves fermentées avec brassage par la grande aération qui permet la disparition du mucilage, ce qui diminue la source des nutriments, la croissance et l'intervention des AAB (Barel, 1997 ; Camu *et al.*, 2007). Sur les profils DGGE précédemment étudiés, nous avons détecté plus de bandes d'*Acetobacter sp* (H, I, J, W) sur les fèves fermentées avec brassage pour les deux délais d'écabossage (2 et 8 jours) (Figure 67). En effet, on s'attendait à avoir plus d'acide acétique dans le cas du brassage, mais les résultats ont montré le contraire, plus d'acide acétique en absence de brassage. On suppose donc que les souches d'*Acetobacter sp* produisent peu ou pas d'acide acétique. Par contre les deux bandes (X, Y) identifiées comme *A. pasteurianus* sont dominantes dans le cas de fermentation sans brassage (Figure 67) (chapitre II. Résultats et Discussions). En reliant la présence et l'intensité des bandes d'AAB à la quantité d'acide acétique, nous constatons que les bandes d'*A. pasteurianus* (X et Y) sont les plus impliquées dans la production d'acide acétique (Figure 66.c, d, e et f). Ce dernier est moins important sur les fèves fermentées avec brassage où une diminution de l'abondance d'*A. pasteurianus* est observée. Cela est peut-être dû à la diminution des nutriments par dégradation de la pulpe lors de l'aération (Barel, 1997 ; Camu *et al.*, 2007). La disparition des espèces *A. pasteurianus* (X et Y) dans le cas du stockage des cabosses durant 8 jours, est peut-être dûe au phénomène de compétition entre les microorganismes sur les nutriments qui diminuent au cours du stockage long.

Il y a donc deux phénomènes opposés qui conduisent à la production d'acide acétique, à savoir la nécessité pour les souches acétiques de disposer de fortes concentrations en oxygène qui peuvent être fournies par le brassage, et la volatilité de l'acide acétique qui le fait disparaître au cours de la fermentation. La quantité mesurée est donc la résultante de ces deux phénomènes.

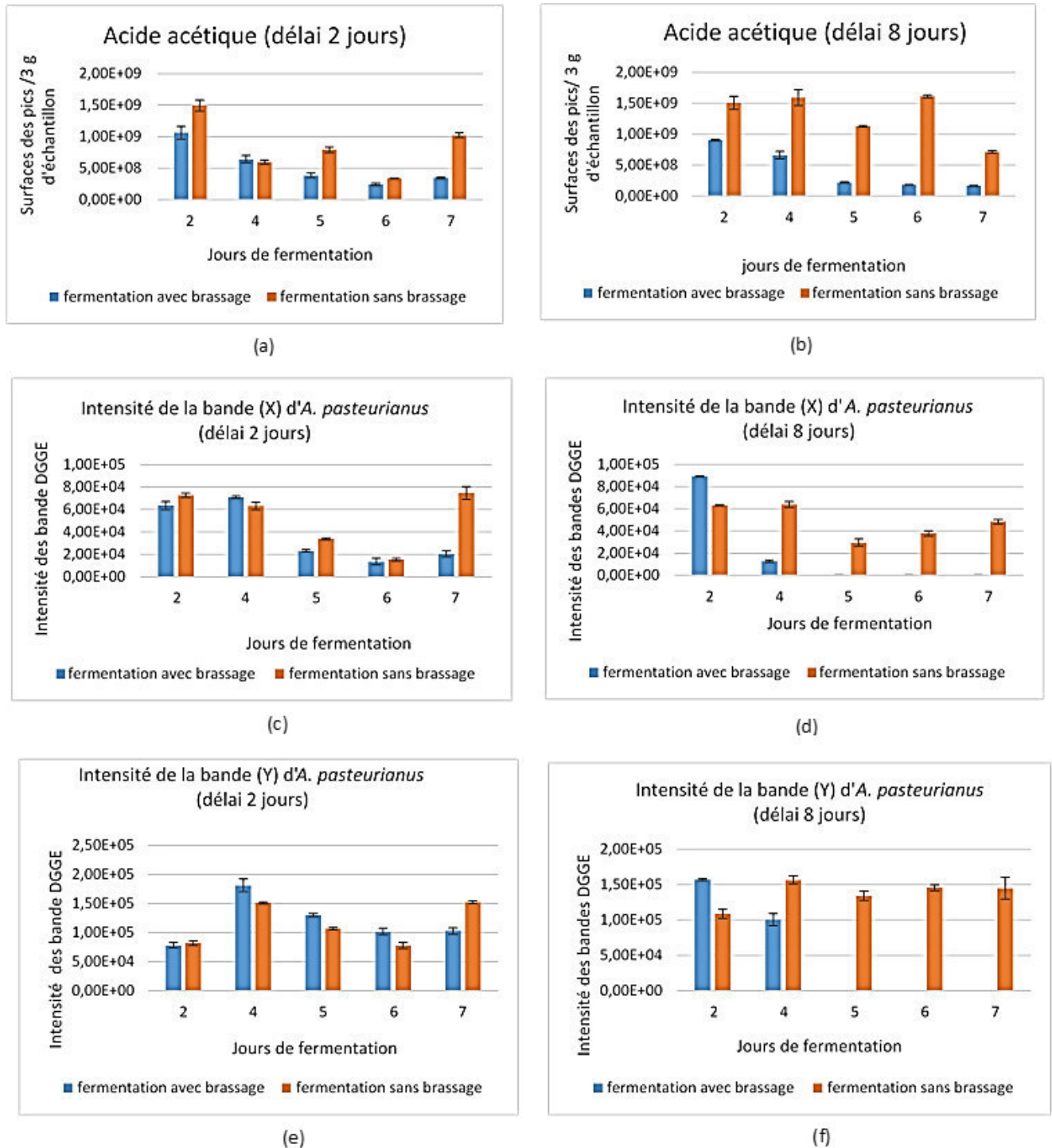


Figure 66 : Histogrammes représentant la surface des pics de l'acide acétique et l'intensité des deux bandes d'*A. pasteurianus* détectés sur les fèves fermentées avec et sans brassage provenant du délai d'écabossage de 2 jours (a, c et e) et 8 jours (b, d et f).

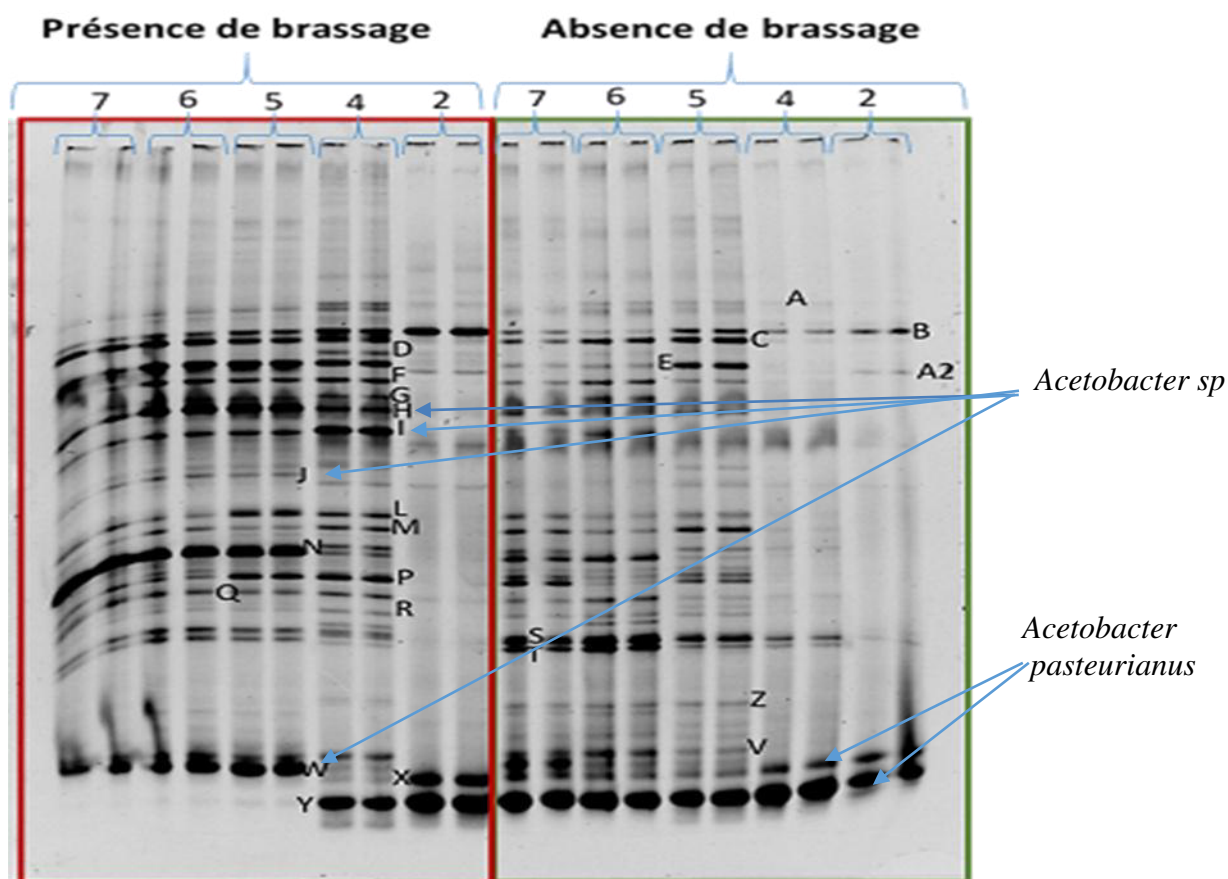


Figure 67 : Profils DGGE d'ADNr 16S des bactéries au cours de la fermentation avec et sans brassage des fèves provenant des cabosses stockées 8 jours. Identification des bandes dans le tableau 17.

III.1.6. Effet du brassage sur les pyrazines obtenues durant la fermentation du cacao

Le groupe des pyrazines est le principal groupe de composés volatils présents sur le cacao torréfié. Serra-Bonvehí (2005) a mentionné que les pyrazines représentaient 40% de l'arôme du cacao torréfié. Un seul composé appartenant à la famille des pyrazines a été détecté lors de cette étude qui est la tétraméthylpyrazine. Ramli *et al.* (2006) ont montré que la tétraméthylpyrazine représentait 90% de la concentration totale des pyrazines dans le cacao torréfié. Dans la majorité des cas, la pyrazine est originaire de la réaction de Maillard via la dégradation de Strecker (Reineccius *et al.*, 1972) et dans certains cas la pyrazine est produite par voie microbienne par le genre *Bacillus* qui a une activité pectinolytique responsable de la libération des acides aminés (Jinap *et al.*, 1994 ; Schwan and Wheals, 2004). Dans notre cas, la pyrazine est sûrement produite par voie microbienne par les espèces du genre *Bacillus* préalablement détectées par DGGE (chapitre II. Résultats et Discussions). Le diacétyl et l'acétoïne sont les précurseurs de la tétraméthylpyrazine (Hashim *et al.*, 1999).

La quantité de la tétraméthylpyrazine n'est pas significativement différente ($p > 0,05$) entre la fermentation avec et sans brassage. Ceci est sûrement lié à la présence du genre *Bacillus* au cours de toutes les fermentations réalisées. Cependant les *Bacillus* sont plus abondants (bandes intenses) dans la fermentation avec brassage.

III.2. Effet de la durée de fermentation sur la production des composés volatils

En étudiant l'effet de brassage sur la présence et l'abondance des composés volatils, nous avons observé une variation de ces derniers en fonction de la durée de fermentation.

III.2.1. Effet de la durée de fermentation sur les alcools

Parmi les alcools précédemment identifiés, deux sont dominants au cours de toutes les fermentations réalisées à savoir 2-phényléthanol et le 2,3 butanediol. Ces deux composés ont été précédemment détectés sur le cacao fermenté (Rodriguez-Campos *et al.*, 2011). Ho *et al.* (2014) ont montré que l'alcool de phényléthyle est produit seulement par les levures et non pas par les bactéries.

L'abondance de l'éthanol et du 2-pentanol présente une différence significative ($p < 0,05$) entre les fèves fermentées durant des courtes durées (2 et 4 jours) et les fèves fermentées durant de longues durées (5, 6 et 7 jours). Ces composés diminuent au cours de la fermentation. L'éthanol est produit au début de la fermentation par les levures pendant la phase anaérobie qui dure en général 48 h (Barel, 1998 ; Schwan and Wheals, 2004). Cet alcool sera ensuite oxydé en acide acétique. Nos résultats sont cohérents avec les résultats précédemment décrits, car la quantité d'éthanol produite était plus importante sur toutes les fèves fermentées 2 jours (Figure 68.a). A la fin de fermentation, on remarque que l'éthanol n'est pas totalement oxydé, ceci est peut-être dû à la production de ce dernier durant toute la fermentation. De plus, les profils DGGE des levures ont montré la présence de bandes de levures bien intenses au cours de toute la fermentation, même à 7 jours (Figure 65.c). Le 2-pentanol diminue également avec l'augmentation de la durée de fermentation (Figure 68.b). Selon Serra-Bonvehí (2005), le 2-pentanol est présent naturellement sur les fèves non fermentées. Ce composé est sûrement dégradé au cours de la fermentation c'est pour cela que nous avons observé sa diminution au cours de la fermentation.

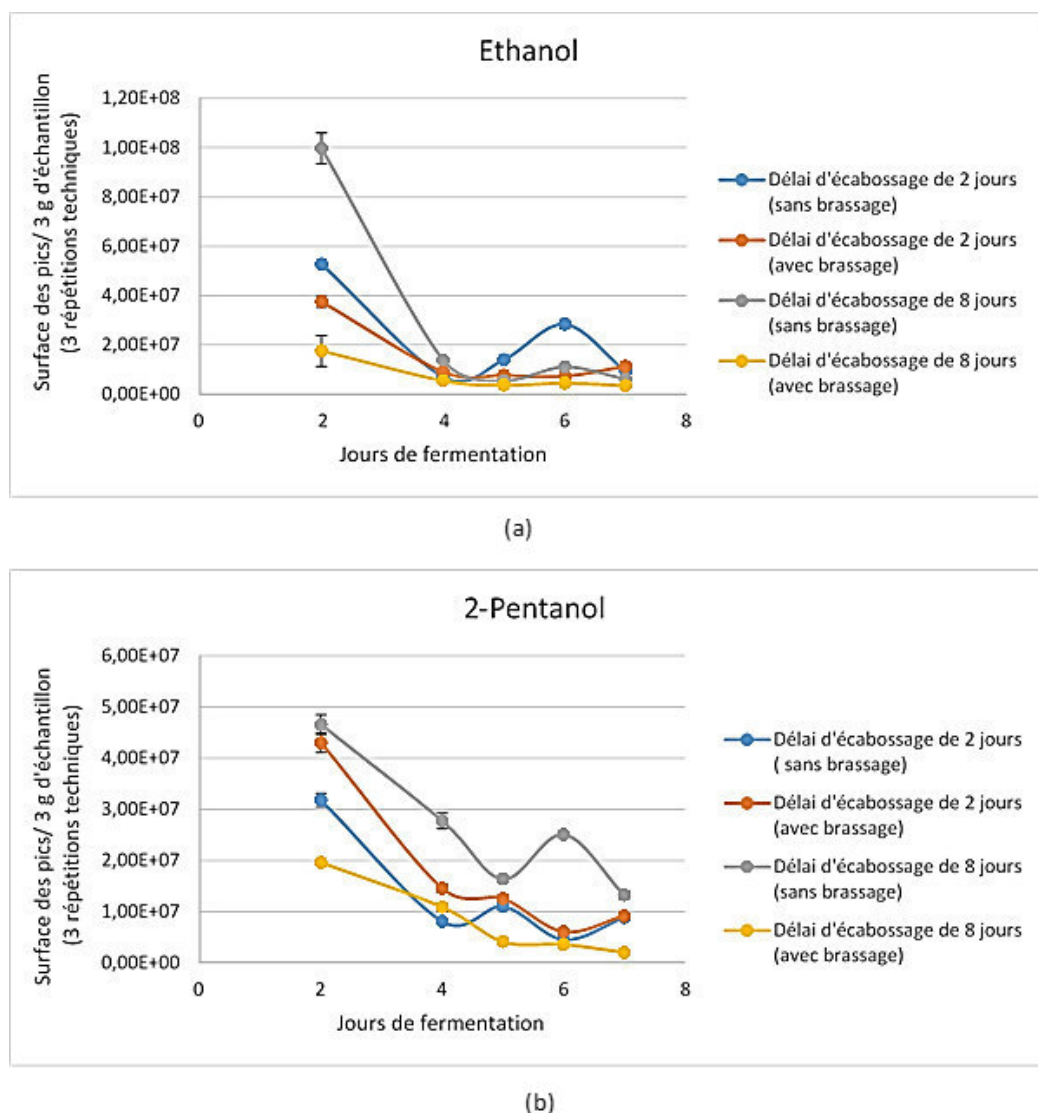


Figure 68 : Graphes représentant l'évolution de la surface des pics de l'éthanol (a) et du 2-pentanol (b) selon la durée de fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage 2 jours et 8 jours.

III.2.2. Effet de la durée de fermentation sur les aldéhydes

La quantité des aldéhydes est significativement différente ($p < 0,05$) entre la première phase (2 et 4 jours) et la deuxième phase (5, 6 et 7 jours) de fermentation. Le benzaldéhyde est le composé le plus important ou dominant par rapport aux autres composés suivi des 2 et 3- méthylbutanal précédemment identifiés dans le cacao (Serra-Bonvehí 2005 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012 ; Ho *et al.*, 2014). L'isobutanal est le moins abondant au cours de toutes les fermentations. Dans $\frac{3}{4}$ des fermentations réalisées, les aldéhydes augmentent avec la durée de fermentation comme le montrent les histogrammes qui représentent l'évolution du 2 et 3- méthylbutanal et du benzaldéhyde selon la durée de fermentation (Figure 69). Cela confirme l'étude de Rodriguez *et al.* (2012) qui ont montré l'augmentation de la concentration des

aldéhydes avec l'augmentation de la durée de fermentation. Les principaux aldéhydes qui sont le 2-méthylbutanal, le 3-méthylbutanal et le benzaldéhyde pourraient être formés à partir de précurseurs tels que la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine par des bactéries lactiques lors de la fermentation (Jinap *et al.*, 1994 ; Groot and De Bont 1998 ; 1999). L'augmentation de ces composés à la fin de la fermentation est peut être due au fait que les LAB interviennent dans la fermentation lactique au début de fermentation en consommant en premier lieu les sucres et l'acide citrique, ensuite les acides aminés pour produire les aldéhydes. Une autre explication ; est que les protéines sont dégradées pour libérer les peptides qui se dégradent en libérant les acides aminés qui sont les précurseurs d'arômes.

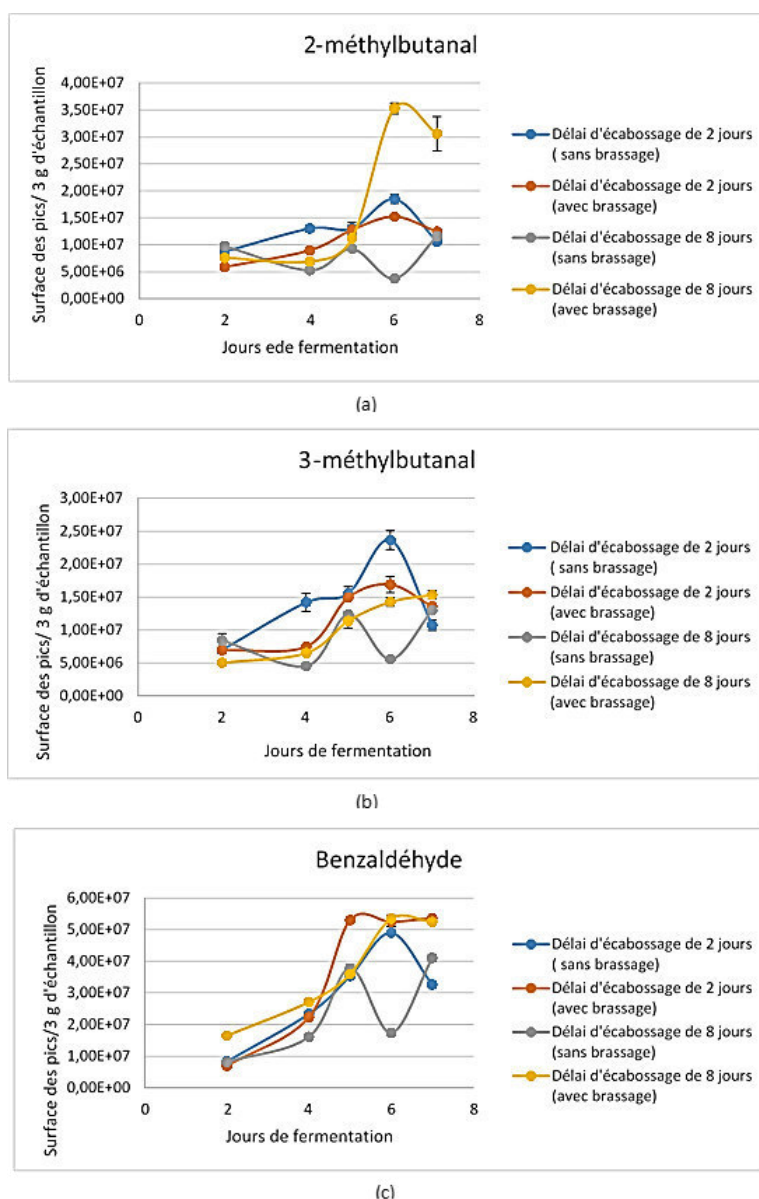


Figure 69 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de 2-méthylbutanal (a) de 3-méthylbutanal (b) et de benzaldéhyde (c) selon la durée de fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

III. 2. 3. Effet de la durée de fermentation sur les cétones

Parmi les cétones identifiées dans cette étude, l'acétoïne s'est révélée être le composé le plus important comme cela a été déjà observé au cours de la fermentation du cacao (Rodriguez-Campos *et al.*, 2011). Cependant, la surface du pic de ce dernier présente une différence significative ($p < 0,05$) entre la première phase (2 et 4 jours) et la dernière phase de fermentation (5, 6 et 7 jours). En général la quantité d'acétoïne diminue avec l'augmentation de la durée de fermentation (Figure 70.a). Ce composé est produit dans la plupart des cas par fermentation alcoolique par les levures et les bactéries à partir du pyruvate et du butanediol (Romano et Suzzi, 1993 ; 1996, Pretorius 2000). Ce composé est le précurseur de la tétraméthylpyrazine. Nous observons, dans 3/4 des fermentations réalisées que la quantité d'acétoïne évolue de la même manière que le 2,3 butanediol (Figure 70). L'acétoïne et le 2,3 butanediol sont des composés analogues et issus de la même voie de biosynthèse.

Les autres cétones comme la 2-heptanone, la 2-pentanone et l'acétophénone, la 2-nonanone sont moins dominantes, leur quantité variant légèrement à l'exception de la 2-pentanone qui diminue au cours de la fermentation. Ces molécules sont présentes naturellement sur les fèves de cacao (Ho *et al.*, 2014) et leur production n'est pas affectée par la fermentation à l'exception de la 2-pentanone qui est surement utilisée par les microorganismes au cours de la fermentation.

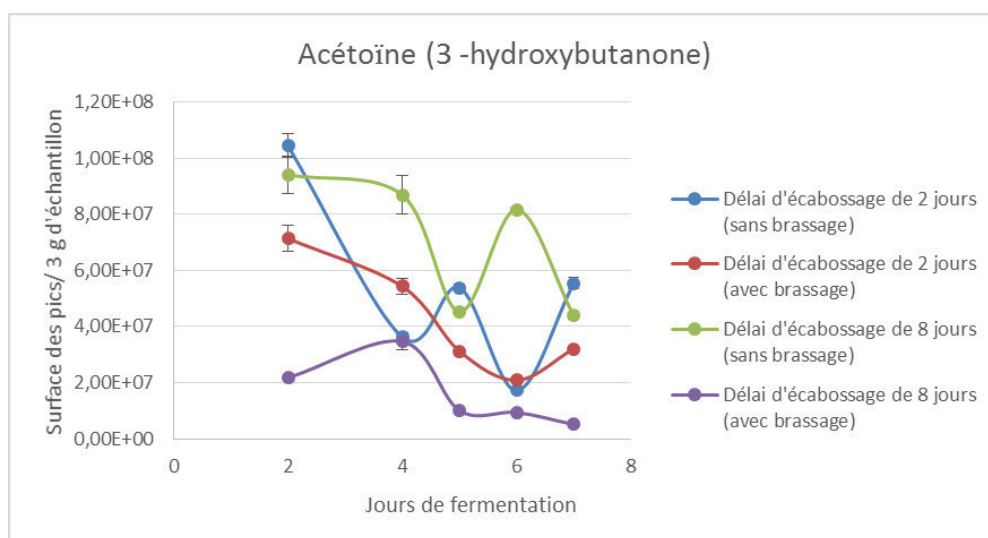


Figure 70 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de l'acétoïne au cours de la fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

III.2.4. Effet de la durée de fermentation sur les esters

Selon Rodriguez *et al.* (2012), la concentration des esters diminue avec l'augmentation de la durée de fermentation. Dans notre cas, aucune différence significative ($p>0,05$) au niveau de la quantité d'esters n'est observée selon la durée de fermentation à l'exception de l'acétate d'éthyle qui présente une différence significative entre les fèves fermentées 2 jours et les fèves fermentées pendant 4, 5, 6 et 7 jours (Figure 71). Cet ester est produit à partir de l'estérification de l'acide acétique et de l'éthanol (Pretorius, 2000). Nos résultats s'accordent avec les travaux de Rodriguez-Campos *et al.* (2011) qui ont observé un grand pic d'acétate d'éthyle au 3^{ème} jour de fermentation et qui diminue à partir du 4^{ème} jour. Ce composé semble être produit seulement au début de la fermentation. Rojas *et al.* (2003) ont montré une concentration importante d'acétate d'éthyle au début de la fermentation du vin par les levures et qui diminue après 2 jours.

Dans notre cas, l'évolution de la surface du pic d'acétate d'éthyle au 2^{ème} jour de fermentation (Figure 71) est reliée à l'évolution de la surface du pic de l'éthanol et l'acide acétique au 2^{ème} jour de fermentation. Ces observations confirment que l'acétate d'éthyle est le produit d'estérification de l'éthanol et de l'acide acétique.

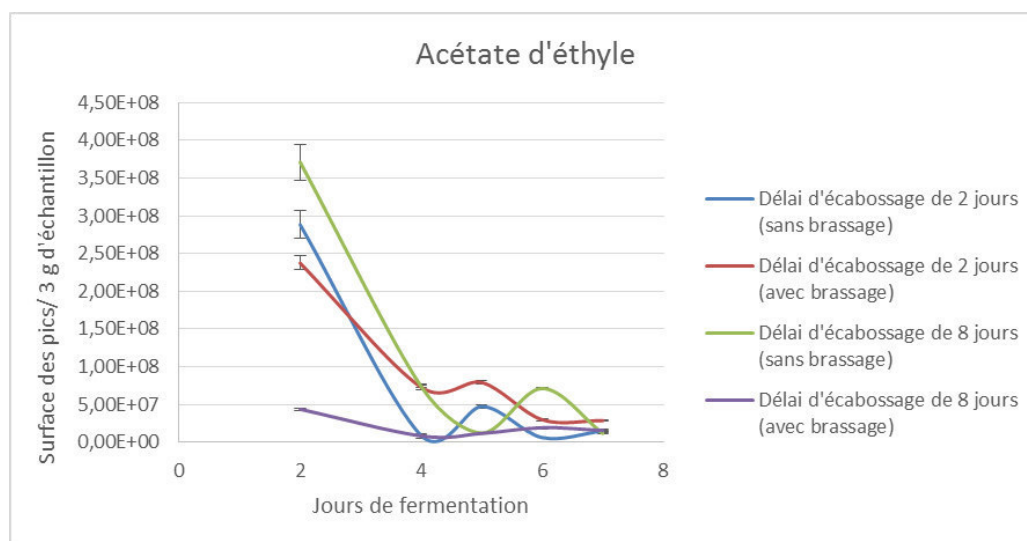
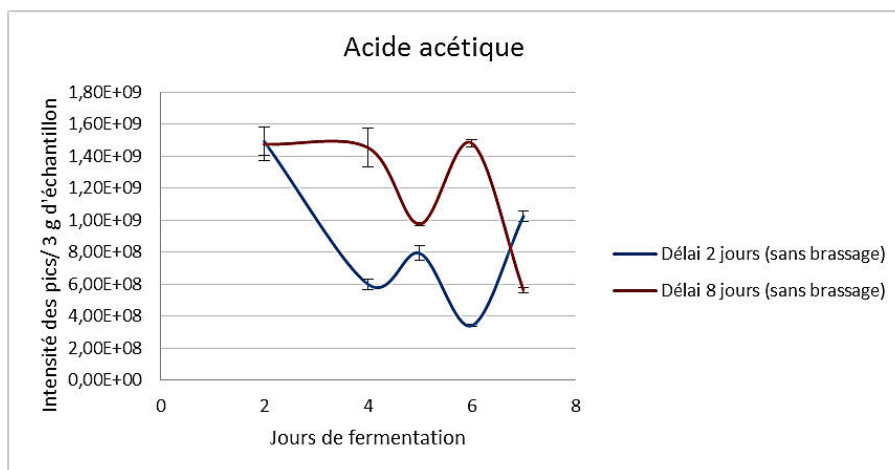


Figure 71 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de l'acétate d'éthyle selon la durée de fermentation des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

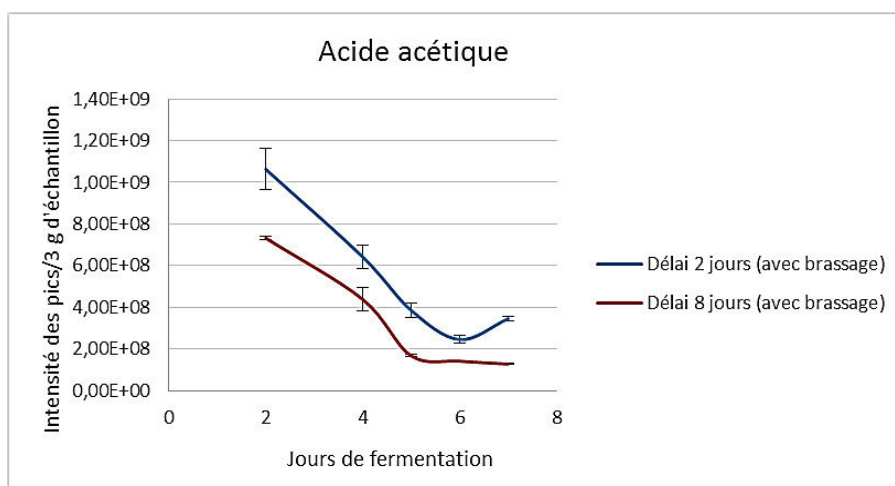
III.2.5. Effet de la durée de fermentation sur les acides

Au cours de la fermentation avec brassage des fèves provenant des deux délais d'écabossage (2 et 8 jours), le pic d'acide acétique est beaucoup plus grand à 2 jours, puis diminue au cours

des fermentations (Figure 72.a). En absence du brassage, la quantité d'acide acétique est très variable au cours de la fermentation (Figure 72.b). Des résultats similaires ont été obtenus par Rodriguez-Campos *et al.* (2011) sur les acides volatils analysés au cours de la fermentation du cacao. Ils ont montré l'augmentation de l'acide acétique au 2^{ème} jour puis sa diminution et ensuite sa ré-augmentation au 5^{ème} jour puis encore une re-diminution. Nos résultats nous ont permis d'observer que l'évolution de l'acide acétique est très irrégulière au cours de la fermentation sans brassage, et diminue régulièrement au cours de celle réalisée avec brassage.



(a)



(b)

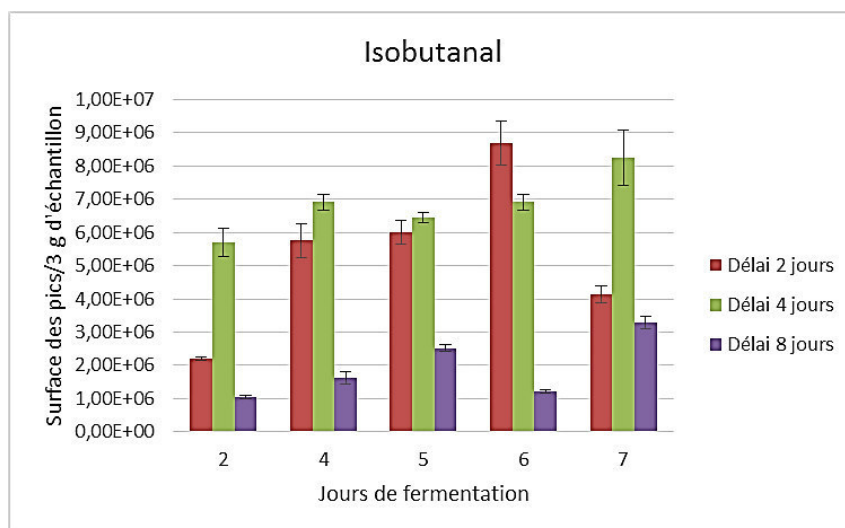
Figure 72 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics de l'acide acétique au cours de la fermentation sans brassage (a) et avec brassage (b) des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

III.3. Étude de l'effet du délai de stockage des cabosses avant écabossage sur les composés volatils avant fermentation

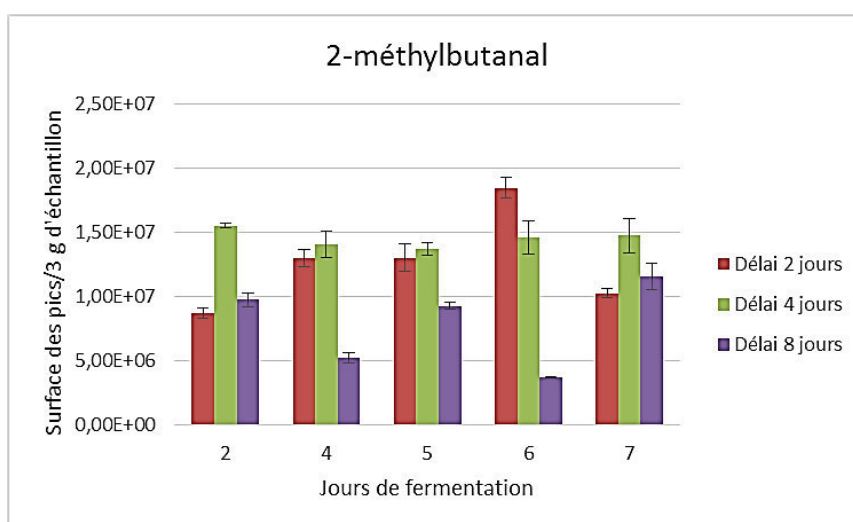
L'effet de la durée du stockage des cabosses avant écabossage a été analysé dans le cas de fermentations avec brassage des fèves issues des délais de 2 et 8 jours, et dans le cas de la fermentation sans brassage des fèves issues des délais d'écabossage de 2, 4 et 8 jours. Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que la durée du stockage a un faible impact sur l'écologie microbienne mais cependant avec un effet plus significatif sur l'écologie des levures. La détection de l'effet du délai d'écabossage est seulement notée lors de la fermentation avec brassage. Ceci peut être expliqué par l'abondance et la richesse des microorganismes qui sont plus importants au cours de cette fermentation, ce qui favorise l'activité microbienne et l'ensemble des réactions biochimiques réalisées par ces microorganismes.

➤ Cas de la fermentation sans brassage

La surface des pics de tous les composés volatils ne présente pas une différence significative ($p > 0,05$) entre les fèves issues des 3 délais d'écabossage (2, 4 et 8 jours) à l'exception des pics de deux composés appartenant à la famille des aldéhydes qui sont le 2-méthylbutanal et l'isobutanal. L'abondance de ces composés est supérieure ($p < 0,05$) pour les deux délais (2 et 4 jours) que pour le délai de 8 jours (Figure 73).



(a)

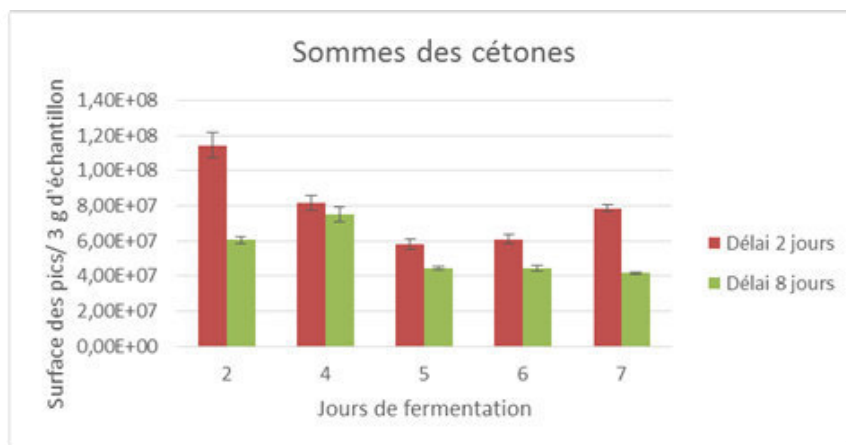


(b)

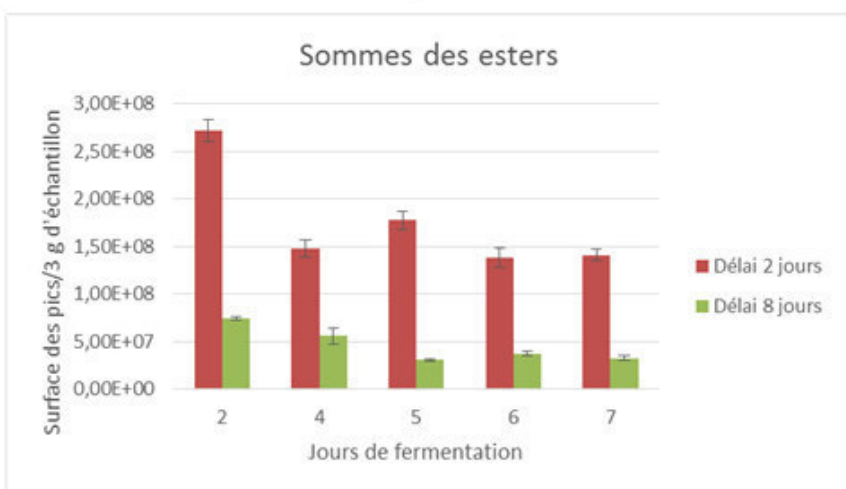
Figure 73 : Graphes représentant l'évolution de l'intensité des pics d'isobutanol et du 2-méthylbutanal au cours de la fermentation sans brassage (a) et avec brassage (b) des fèves provenant du délai d'écabossage de 2 jours et 8 jours.

➤ Cas de fermentation avec brassage

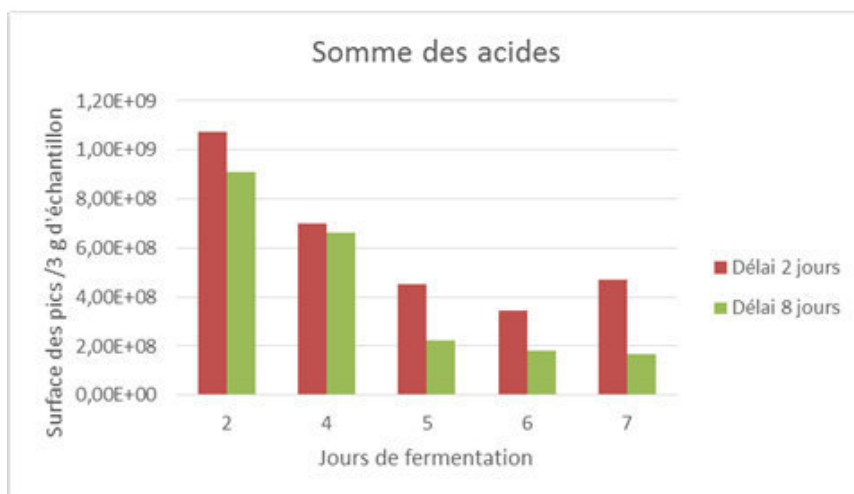
La surface des pics des familles des composés volatils : cétones, esters et des acides présente une différence significative ($p < 0,05$) entre la durée de stockage de 2 et 8 jours, avec une importance pour les cétones, les esters et les acides sur les fèves fermentées issues du délai d'écabossage de 2 jours (Figure 74.a, b et c). Le total des alcools est significativement plus élevé sur les fèves stockées plus longtemps (8 jours) avant fermentation.



(a)



(b)



(c)

Figure 74 : Histogrammes montrant la somme des surfaces des pics des cétones (a), des esters (b) et des acides (c) détectés sur les fèves de cacao fermentées avec brassage provenant des cabosses stockées 2 et 8 jours.

La réduction des surfaces de pics des composés volatils sur les fèves provenant des cabosses ayant subi un stockage plus long avant écabossage s'explique probablement par la réduction du volume de la pulpe car il a été rapporté que le stockage des cabosses a un impact sur la qualité du cacao par la réduction de plusieurs facteurs : acide acétique, sucres, protéines et sels minéraux, avec une augmentation du pH et ainsi l'amélioration de la saveur finale (Meyer *et al.*, 1989 ; Tomlins *et al.*, 1993 ; Guehi *et al.*, 2010 ; Afoakwa *et al.*, 2013 a, 2013 b). Meyer *et al.* (1989) ont observé que le stockage post-récolte des cabosses de cacao conduit à améliorer l'aération microbienne et conduit à la suppression des LAB, et à l'augmentation de la respiration des levures. Ceci peut donc expliquer l'importance des pics d'alcools sur les fèves stockées 8 jours.

La faible quantité d'acides volatils observée, dont l'acide acétique sur les fèves stockées plus longtemps, s'accorde avec les résultats de Biehl *et al.* (1989) ; Tomlins *et al.* (1993) et Jinap *et al.* (1994) qui ont observé un pH plus élevé et une quantité d'acide acétique significativement plus faible sur les fèves stockées par rapport aux fèves non stockées avant fermentation.

Un composé appartenant à la famille des phénols qui est le 2-méthoxyphénol est uniquement présent sur les fèves ayant subi un long stockage (8 jours). Il est significativement plus élevé dans le cas de fermentations avec brassage surtout aux derniers jours de fermentation (Figure 75). Ce composé a été également détecté seulement à la fin de la fermentation (6 et 8 jours) (Rodriguez *et al.*, 2012) et dans le cacao fermenté et séché (Serra-Bonvehí et Venture, 1998). Les composés phénoliques peuvent être produits pendant le séchage par exemple par la contamination par la fumée ou au cours du stockage des fèves de cacao (Jinap *et al.*, 1998; Serra-Bonvehí et Venture, 1998). Dans notre cas, on pense que la production du phénol- 2- méthoxy est plutôt liée à la durée de stockage des cabosses et non pas au séchage, vu que ce composé est seulement détecté sur les fèves provenant des cabosses stockées 8 jours alors que tous les échantillons ont été séchés au soleil durant la même durée (7 jours).

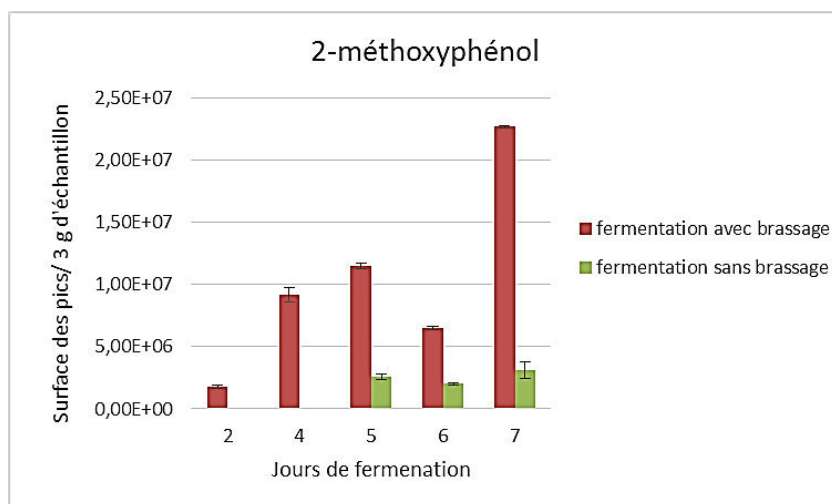


Figure 75 : Histogrammes montrant les surfaces des pics du 2-méthoxyphénol détecté sur les fèves de cacao des fermentées provenant des cabosses stocké 8 jours avant écabossage.

III.4. Application des analyses statistiques sur l'ensemble des données sur les composés volatils pour discriminer les procédés post-récolte

Pour mesurer l'effet du brassage, de la durée de fermentation et de la durée du stockage des cabosses avant écabossage sur la composition aromatique du cacao, une analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée sur l'ensemble des composés volatils détectés sur les fèves de cacao. A partir des observations précédentes, nous avons évalué l'effet des procédés post-récoltes (délai d'écabossage, durée de fermentation et brassage) sur chaque famille de composés volatils. Il a été observé que les alcools, les cétones, les esters et les acides sont majoritaires lors des fermentations réalisées en absence du brassage, alors que pour les aldéhydes sont majoritaires lors des fermentations précédées du brassage. L'ACP nous a permis de voir quels sont les composés les plus discriminants de chaque famille ou quels sont ceux qui ont le plus d'impact sur les fermentations.

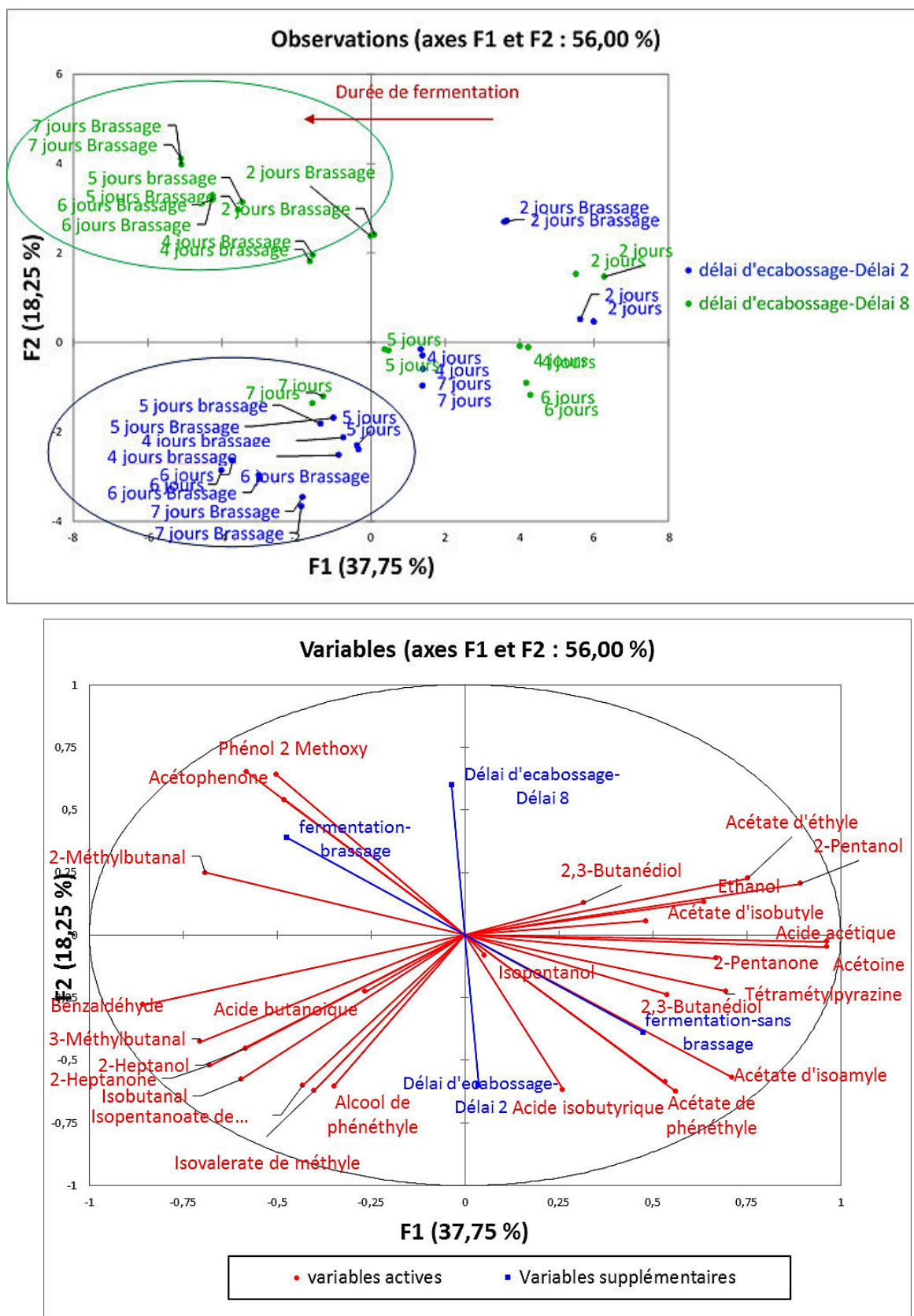


Figure 76 : Analyse en Composante principale réalisée sur les surfaces des pics des composés volatils détectés sur les fèves de cacao fermentées avec et sans brassage provenant des cabosses stockées 2 et 8 jours avant écabossage.

L'ACP a permis de séparer 4 groupes d'échantillons selon la durée de fermentation, le procédé de fermentation et le délai d'écabossage. L'Axe F1 (37,75%) regroupe les échantillons de fèves fermentées sans brassage par rapport à celles fermentées avec brassage selon les composés volatils discriminants (Figure 76). Les composés discriminants qui sont les composés significativement importants dans le cas de la fermentation sans brassage sont : l'acide acétique et l'acide isobutyrique, le 2,3 butanédiol, l'acétoïne, la 2-pentanone et la 2-nonanone, l'acétate de phényléthyle et l'acétate d'isoamyle. Dans le cas du brassage, les composés discriminants sont tous des composés identifiés comme des aldéhydes, et la plupart des composés d'ester comme l'alcool de phényléthyle, l'isopentanoate de méthyl et l'isovalérate de méthyl (Figure 76). L'axe F1 regroupe tous les échantillons ayant été fermentés pendant 2 jours et sépare les autres durées de fermentation. Les composés discriminants de la durée de fermentation de 2 jours sont l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isobutyle et l'éthanol (Figure 76). L'axe F2 (18,25%) sépare les échantillons de fèves en fonction du délai d'écabossage (Figure 76). Les variables discriminantes du délai d'écabossage de 8 jours sont le méthoxy-2-phénol et l'acétophénone. La plupart des esters et des aldéhydes sont les variables les plus discriminantes des fèves issues du délai d'écabossage de 2 jours.

Les variations observées au niveau de la composition aromatique du cacao sont surement dépendantes du procédé post-récolte appliqué. Ces variations ont été discutées dans les parties précédentes par rapport à la littérature et à l'analyse de l'écologie microbienne effectuée. Des hypothèses sont données sur les relations qui peuvent exister entre les variations au niveau de la composition d'arôme et la structure des communautés microbiennes. Nous avons appliqué l'analyse des correspondances canoniques (ACC) sur les données des composés volatils produits lors de la fermentation et les populations microbiennes dans le but d'établir des relations entre les deux.

Dans un premier temps, nous avons appliqué l'analyse statistique (ACC) globale sur toute la flore microbienne en groupant les communautés des bactéries et des levures et tous les composés volatils. L'analyse situe les microorganismes présents par rapport aux composés volatils détectés. La distribution de la majorité des variables sur le graphique montre que les composés volatils sont produits par l'ensemble des communautés microbiennes. Il a été remarqué qu'un ensemble de microorganismes est situé proche d'un composé ou de plusieurs composés volatils. Par conséquent, il est difficile voire impossible de relier un composé à une espèce donnée (Figure 77). Ce résultat peut s'expliquer par l'effet des interactions entre les microorganismes dans la production des métabolites ou par la production du même composé par plusieurs espèces microbiennes. Par ailleurs, l'ACC a séparé deux composés : l'acide

acétique et l'acétoïne par rapport aux autres composés volatils et les a situés proches de l'espèce *A. pasteurianus* (X) (Figure 77). Cela suggère que l'abondance de l'acide acétique et de l'acétoïne est peut être liée à l'abondance de cette espèce. Un autre groupe est discriminé : il comprend l'acétate d'éthyle, l'éthanol, *H. opuntiae* et une bande de levures non identifiée (bande 13), cela voudrait dire que l'abondance de ces composés est peut être liée à ces deux levures puisque ces deux composés sont généralement produits par les levures.

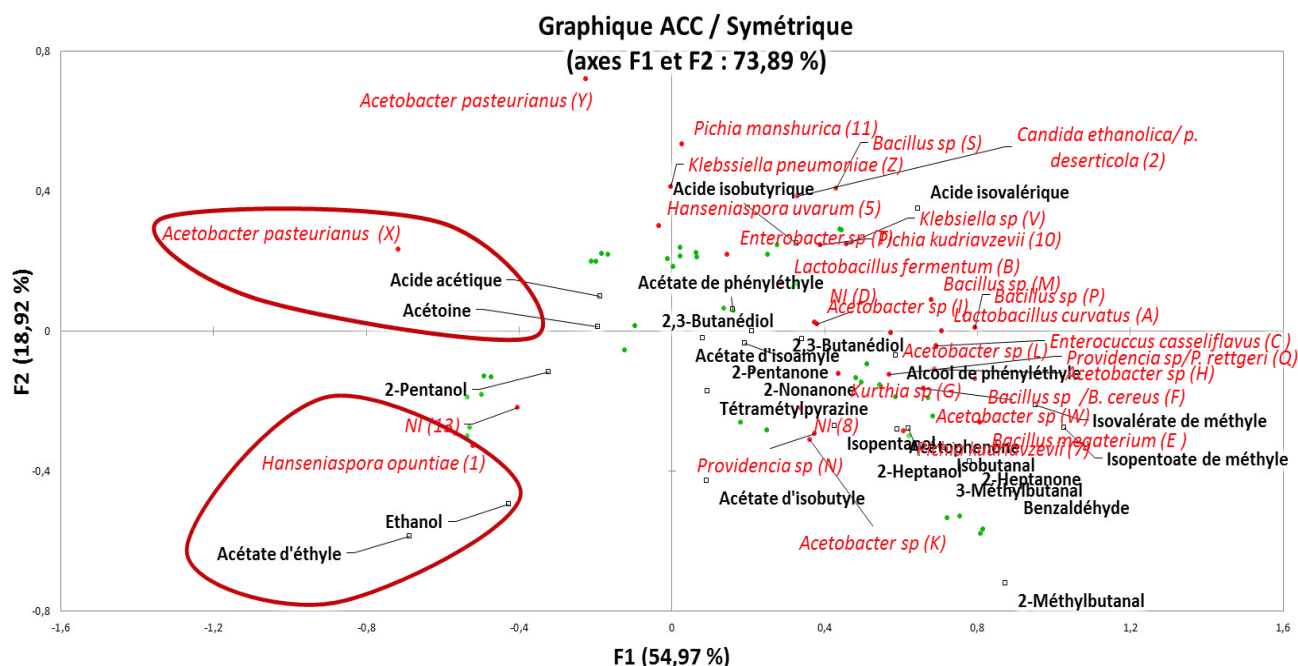


Figure 77 : Analyse des Correspondances Canoniques (ACC) réalisée sur les profils DGGE d'ADN des levures et bactéries et les composés volatils détectés sur les fèves de cacao.

Afin de mieux relier les microorganismes à la composition aromatique, nous avons effectué une analyse statistique en ciblant seulement la flore responsable de la fermentation du cacao avec les composés produits par chaque famille. L'analyse (ACC) a permis de séparer 5 composés principaux qui sont discriminants de la fermentation sans brassage car leur abondance est significativement importante sur les fèves issues de cette dernière (Figure 78). Ces composés sont l'acide acétique et l'acétoïne, le 2-pentanol, l'éthanol et l'éthyl acétate. L'acide acétique et l'acétoïne sont plutôt proches des espèces identifiées comme *A. pasteurianus* et très éloignées des autres bandes d'*Acetobacter sp* (Figure 78). Cela explique que cette espèce est plus fortement reliée à l'abondance ou l'évolution de ces composés. Le 2-pentanol, l'éthanol et l'éthyle acétate sont séparés statistiquement des autres composés et situés à proximité des deux

variables (espèces) qui sont *H. opuntiae* et une bande de levure (13) (Figure 78). Ces deux levures ont sûrement un grand impact dans la production de ces composés. Sur le graphique, nous constatons que l'acide isovalérique et l'acide isobutyrique sont plus fortement reliés à *Lactobacillus fermentum* et à la plupart des levures comme *P. kudriavzevii*. L'acide isobutyrique est généralement produit à partir des acides aminés par les LAB comme *Lactobacillus* (Nakae et Elliot, 1965). Le reste des composés est plutôt relié à l'ensemble des communautés microbiennes (Levures, AAB et LAB).

En combinant l'analyse globale de l'écologie microbienne et l'analyse des composés volatils, nous avons pu discriminer les différents procédés appliqués au cacao et établir des relations entre l'abondance des microorganismes (intensité des bandes sur les profils DGGE) et la composition en volatils.

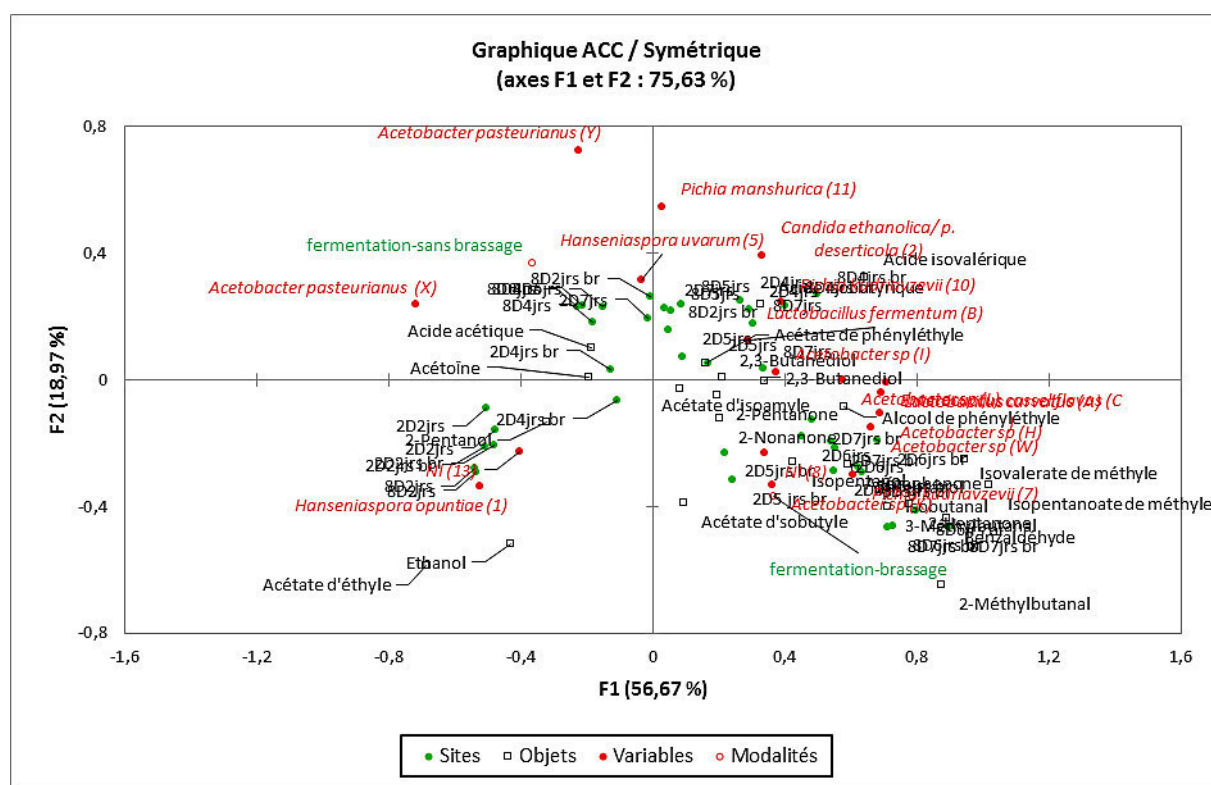


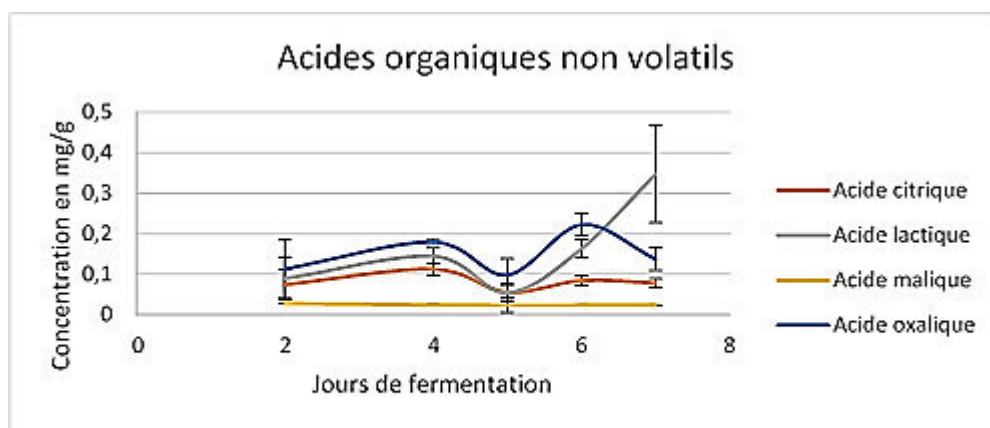
Figure 78 : Analyse des Correspondances Canoniques (ACC) réalisée sur les composés volatils des flores de fermentation (AAB, LAB et levures).

III.5. Effet des pratiques post-récolte sur les acides organiques non volatils

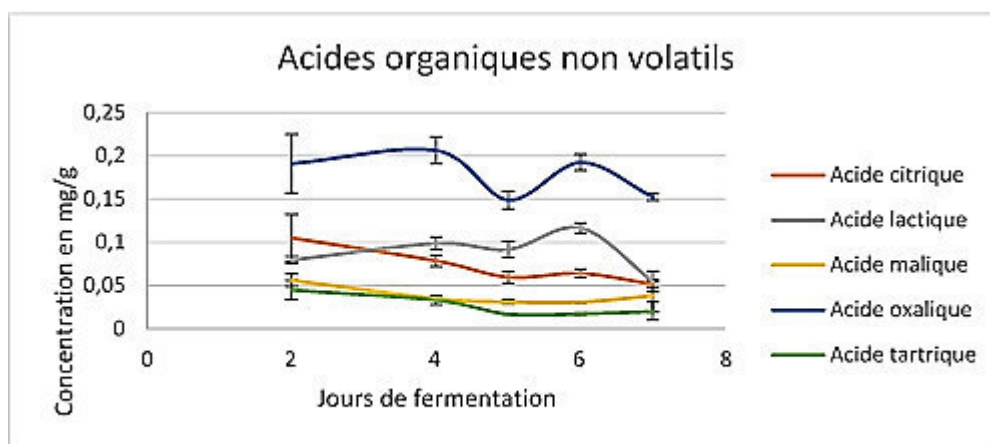
Dans la partie précédente, nous avons évalué l'acidité volatile sur les fèves de cacao fermentées et séchées. Nous avons noté l'importance significative des acides volatils sur les fèves fermentées sans brassage, spécialement l'acide acétique qui est dominant pour toutes les fermentations réalisées. Pour expliquer ceci, nous avons émis comme hypothèse que l'acide acétique est un acide très volatil qui disparaît par l'effet de brassage. Sa présence est directement liée à la disparition ou la diminution de l'abondance des espèces d'*A. pasteurianus* sur les fèves fermentées avec brassage. Nous avons aussi remarqué que l'acidité volatile diminue durant le stockage des cabosses (8 jours) et au cours de la fermentation.

Dans cette partie nous avons voulu vérifier si les acides non volatils sont également affectés par l'effet du brassage, du délai d'écabossage et de la durée de fermentation. Pour cela, les principaux acides organiques ont été dosés sur les échantillons précédents.

Dans les fèves de cacao non fermentées, on trouve naturellement des quantités de (13-14 mg/g) d'acide citrique, (7-8 mg/g) d'acide oxalique et (1-2 mg/g) d'acide malique (Ho *et al.*, 2014). Nos analyses montrent que l'acide oxalique est l'acide le plus présent au cours de toutes les fermentations (Figure 79). Cela peut s'expliquer par le fait qu'il est initialement présent sur les fèves non fermentées et n'est que très légèrement dégradé par les microorganismes. Sa quantité et celle de l'acide malique ne varient pas significativement au cours de la fermentation (Rodriguez *et al.*, 2011 ; Ho *et al.*, 2014). La quantité d'acide citrique et d'acide lactique varie significativement au cours des jours de fermentation (Figure 97). L'acide lactique augmente et l'acide citrique diminue avec la durée de fermentation, ce dernier est métabolisé en acide acétique, en dioxyde de carbone et en acide lactique (Thompson *et al.*, 2001). Nous avons remarqué une différence significative sur la quantité de la plupart des acides au niveau des fèves fermentées durant 5 jours qui se traduit par une diminution de la quantité des acides qui réaugmente ensuite au 6^{ème} jour.



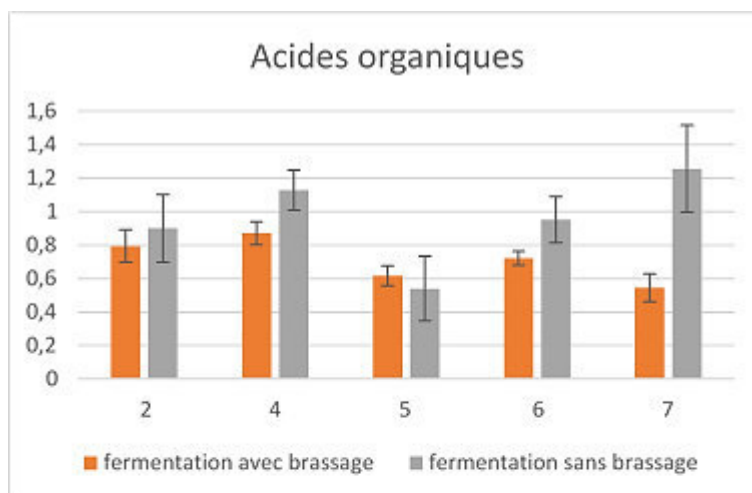
(a)



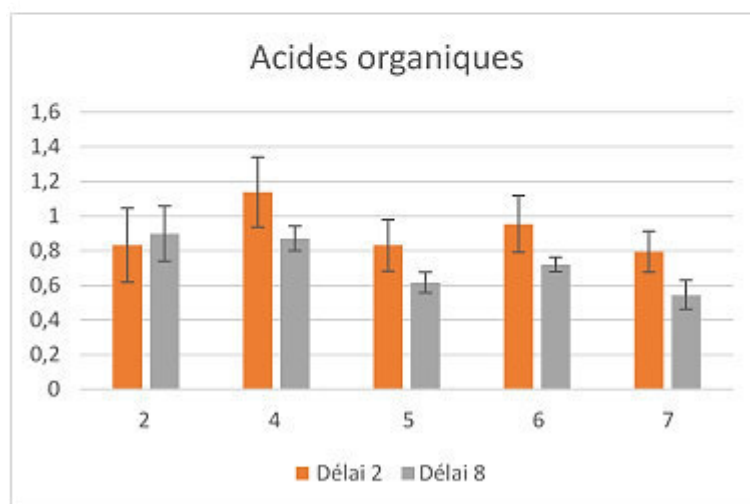
(b)

Figure 79 : Graphes montrant l'évolution de la concentration des acides organiques selon la durée de fermentation réalisée sans (a) ou avec brassage (b) sur des fèves provenant des cabosses stockées 8 jours.

Le total des acides non volatils est significativement ($p < 0,05$) plus important sur les fèves non brassées surtout à la fin de fermentation (5, 6 et 7 jours) (Figure 80.a). Cela confirme les résultats obtenus sur les acides volatils qui sont moins abondants au cours du brassage. La quantité d'acide est significativement plus importante sur les fèves provenant de cabosses stockées durant une courte durée (2 jours) (Figure 80.b). Cela s'accorde avec les résultats sur l'analyse des acides volatils.



(a)



(b)

Figure 80 : Graphes montrant l'évolution de la concentration des acides organiques non volatils présents dans les fèves selon le procédé de fermentation (a) et la durée de stockage des cabosses avant écabossage (b).

III.6. Conclusion partielle

L'étude réalisée est originale et a permis d'avoir un aperçu de l'effet du brassage sur la qualité aromatique du cacao ce qui n'a jamais été étudié jusqu'à présent. Le brassage ou l'aération au cours de la fermentation a montré un effet sur la structure des communautés microbiennes associées aux fèves de cacao. En effet les communautés bactériennes sont plus abondantes dans la fermentation avec brassage ce qui peut expliquer l'importance des aldéhydes sur les fèves brassées qui sont principalement produits par les bactéries (Ho *et al.*, 2014). La diminution de l'acide au cours du brassage est expliquée par la disparition des espèces d'*A. pasteurianus* qui

sont les plus responsables de la production d'acide acétique. L'aération permet l'évaporation des composés très volatils comme l'acide acétique. Les résultats de l'analyse des composés volatils s'accordent avec les résultats de l'analyse globale des communautés des levures et des LAB. En effet, le brassage a montré moins d'abondance des levures (selon l'intensité des bandes DGGE) et cela explique la réduction des esters et d'alcools dans le cas de la fermentation réalisée en absence de brassage vu que ces deux familles de composés sont principalement produites par les levures.

Nous avons constaté que le brassage lors de la fermentation permet une réduction des acides, des alcools et des esters et l'augmentation des aldéhydes, alors que le contraire est noté en absence de brassage, plus d'acides, d'alcools et d'esters et moins d'aldéhydes et esters. Nous suggérons donc comme étant le meilleur procédé la fermentation avec brassage. Les fèves traitées par ce procédé contiennent moins de composés indésirables comme les acides qui donnent une flaveur de rance et de beurre (Serra-Bonvehí, 2005), et d'autres composés désirables, comme les aldéhydes qui donnent une flaveur fleurie et fruitée (Serra-Bonvehí, 2005), et les esters qui produisent un arôme de miel et de fleur pour un cacao de qualité (Aculey *et al.*, 2010 ; Frauendorfer et Schieberle, 2008). Le procédé de stockage des cabosses le plus court est proposé comme le meilleur procédé car un stockage long produit des fèves contenant des composés phénoliques qui sont indésirables dans les produits de cacao et ne doivent pas être présents dans le cacao de bonne qualité (Jinap *et al.*, 1998). L'augmentation de la durée de fermentation est suggérée comme favorable à une meilleure qualité car au cours de la fermentation, une diminution des acides est observée parallèlement à une augmentation des aldéhydes.

L'analyse statistique réalisée nous a permis d'établir des relations entre l'écologie microbienne et les différents composés produits.

IV. Étude du profil aromatique des souches microbiennes isolées du cacao

Dans les chapitres précédents, la structure des populations microbiennes et la composition aromatique du cacao ont été identifiées par analyse globale. Au cours de la fermentation, les microorganismes interviennent dans l'élaboration des précurseurs d'arômes des aliments en réalisant de nombreuses réactions telles que les oxydations, les réductions, les réactions d'hydrolyse, la formation de nouvelles liaisons carbone-carbone et leur dégradation pour produire l'arôme. Plusieurs études ont été menées dans le but d'identifier les composés volatils au cours des procédés de transformation post-récolte (fermentation et séchage) et au cours du procédé de production du cacao (torréfaction et chocolat) (Serra-Bonvehí 2005 ; Ducki *et al.*, 2008 ; Frauendorfer and Schieberle, 2006 ; Afoakwa *et al.*, 2009 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2011 ; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012 ; Ho *et al.*, 2014).

De nombreux travaux ont étudié la production des esters principalement les acétates d'esters et les éthylates d'esters produits dans le vin par les levures (Plata *et al.*, 2003 ; Viana *et al.*, 2009, Rojas *et al.*, 2002, 2003). Par contre, très peu d'études ont été réalisées dans le but d'identifier l'origine des arômes du cacao fermenté et comment les microorganismes contribuent à la formation de ces arômes. Deux études récentes ont étudié la composition volatile (Ho *et al.*, 2014) et la qualité sensorielle (Crafack *et al.*, 2013) du cacao en réalisant des fermentations par des cultures mixtes de levures et de bactéries. Ces travaux ont montré que les levures ont un grand impact dans l'élaboration de l'arôme et le gout du cacao et donc du chocolat.

L'objectif de ce travail est d'identifier le profil aromatique de quelques souches isolées du cacao afin de pouvoir relier l'origine des composés précédemment détectés dans les fèves de cacao fermentées (chapitre III. résultats et discussions) aux souches présentes au cours de la fermentation. Les composés ont été identifiés au cours de micro-fermentations réalisées au laboratoire en mettant en œuvre des monocultures et des co-cultures de souches. Les profils aromatiques des souches ont été également identifiés dans des milieux de culture liquides qui simulent la pulpe de cacao et les conditions favorables au développement de chaque souche. L'intérêt de ce travail est d'initier une étude sur la compréhension de l'origine des composés volatils présents sur le cacao fermenté et les produits dérivés.

IV.1. Le choix des souches microbiennes

Les cabosses de cacao proviennent de Côte d'Ivoire, ce qui explique que nous avons travaillé sur un nombre relativement réduit de cabosses. Nous avons donc cherché à sélectionner des souches isolées du cacao qui soient les plus représentatives des fermentations traditionnelles. Le choix est basé sur la littérature, la dominance des bandes microbiennes obtenues sur les profils DGGE et la présence de ces espèces dans les deux saisons de récolte (Figure 81).

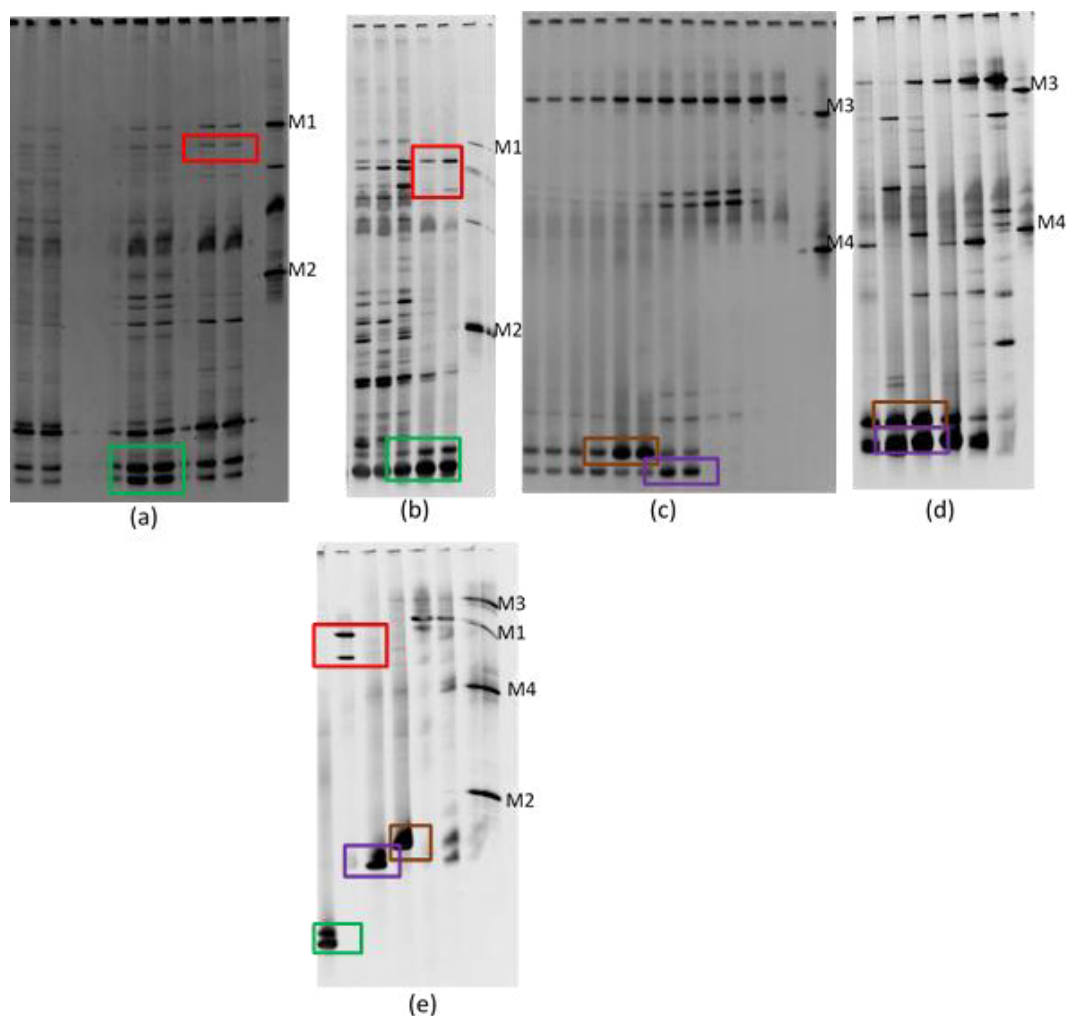


Figure 81 : Profils DGGE de l'ADN de bactéries détectées sur des fèves récoltées et fermentées en mars 2013 (a) et novembre de 2013 (b), de l'ADN de levures détectées sur des fèves récoltées et fermentées en mars 2013 (c) et novembre de 2013 (d) et de l'ADN des souches pures (e) de *L. fermentum* (----) de *A. pasteurianus* (----) de *P. kudriavzevii* (----) et de *P. manshurica* (----). M1 : ADN de *L. plantarum*, M2 : ADN de *E. coli*, M3 : ADN de *C. apicola* et M4 : *L. elongisporus*

La flore de fermentation est constituée de levures, de LAB et d'AAB. Pour cette étude nous avons choisi une LAB (*L. fermentum*) une AAB (*A. pasteurianus*) et deux levures : *P. kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) et *P. manshurica* (Tableau 22 et Figure 82 et 83) isolé sur le cacao de Côte d'Ivoire. Ces espèces sont présentes sur le cacao fermenté provenant des deux

saisons de récolte (mars et novembre 2013) et présentent sur les gels DGGE des bandes intenses et dominantes au cours de toutes les fermentations principalement sur les échantillons analysés par SPME-CG-MS (récoltés en Novembre 2013).

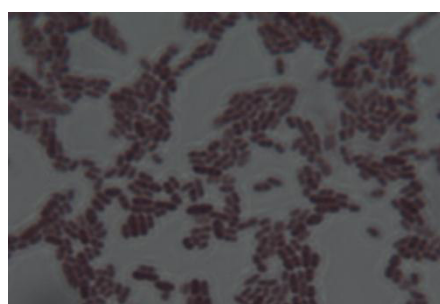
Tableau 22 : Identification des souches isolées du cacao de Côte d'Ivoire par amplification et séquençage des gènes des ARN ribosomaux.

Espèce	% identité	% query cover	E-value	N° d'accension
<i>Lactobacillus fermentum</i>	99%	100%	0-0	KM577183
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	100%	100%	0-0	HF677570
<i>Pichia kudriavzevii</i>	100%	100%	0-0	NR131315
<i>Pichia manshurica</i>	99%	100%	0-0	KP132515

Des souches de *L. fermentum* et *A. pasteurianus* sont considérées comme des starters de culture adéquats pour la fermentation du cacao (Lefeber *et al.*, 2010 ; Craack *et al.*, 2012). Ces espèces ont été rapportées comme les espèces les plus isolées au cours des fermentations du cacao partout dans le monde (Camu *et al.*, 2007 ; Neilsen *et al.*, 2007 ; Papalexandratou *et al.*, 2011 ; Illegheims *et al.*, 2012, Craack *et al.*, 2012).



(a)



(b)

Figure 82 : *L. fermentum* (a) et *A. pasteurianus* (b) colorées au Gram et observées au microscope (grossissement $\times 1000$).

Étant donné que les bandes de *P. kudriavzevii* et *P. manshurica* sont très intenses sur les gels de DGGE par rapport aux autres bandes de levures, ceci nous a motivé pour choisir ces deux espèces. Ces dernières ont déjà été isolées du cacao fermenté (Daniel *et al.*, 2009 ; Craack *et al.*, 2012) mais peu de travaux existent sur ces deux levures. Parmi ces travaux, l'étude de Dhaliwal *et al.*, (2011) qui a montré l'amélioration de la production d'éthanol à partir du jus de la canne à sucre en utilisant une souche thermotolérante de *Pichia kudriavzevii*. Saez *et al.* (2011) ont montré que *P. manshurica* est responsable de la détérioration du vin.

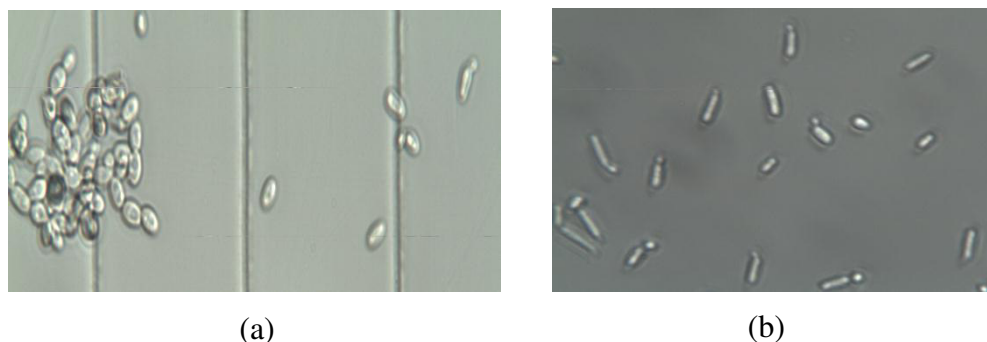


Figure 83 : Cellules de *P. manshurica* (a) et *P. kudriavzevii* (b) observées au microscope (grossissement $\times 400$, état frais).

IV.2. Étude préliminaire du profil aromatique au cours de la croissance microbienne en milieu liquide

L'objectif de cette étude préliminaire est basé sur l'identification des composés volatils produits lors de la phase de croissance dans des milieux simulant la pulpe de cacao. Nous avons utilisé 2 milieux différents adaptés à la croissance des levures, de la bactérie lactique (*L. fermentum*) et de la bactérie acétique (*A. pasteurianus*). Le PSM-LAB est un milieu qui simule la composition de la pulpe de cacao avant fermentation et les conditions favorables au développement des levures et des LAB. Le milieu PSM-AAB est un milieu qui simule la composition de la pulpe après 2 jours de fermentation au moment de l'intervention des AAB dans la fermentation du cacao. Ces conditions miment le pH de la pulpe qui augmente après la consommation de l'acide citrique par les LAB et la production d'éthanol par les levures (Lefeber *et al.*, 2010).

La suspension microbienne initiale (culture en phase de croissance) est préparée approximativement à 10^6 UFC/ mL pour les bactéries et à 10^6 cellules/ mL pour les levures. La croissance se déroule pendant 24 h dans des séries de tubes scellés. La DO est mesurée et les composés volatils sont extraits et identifiés à temps 0 et toutes les 130 min. Des dénombrements

de colonies de bactéries et de cellules de levures sont effectués à temps 0, et à quelques points au cours de la croissance et à la fin de l'analyse.

L'analyse des composés volatils a été réalisée sur les milieux de culture non inoculés afin de mesurer « le bruit de fond du milieu ». Les composés volatils produits au cours des croissances des souches en milieu liquide sont représentés dans le tableau 23.

Tableau 23 : Composés volatils produits lors de la croissance des souches dans le PSM-LAB et PSM-AAB.

Composé produit	<i>L. fermentum</i> (PSM-LAB)	<i>A. pasteurianus</i> (PSM AAB)	<i>P. manshurica</i> (PSM-LAB)	<i>P. kudriavzevii</i> (PSM-LAB)
Acide acétique	+	+		
Acide propionique			+	
Acide isovalérique			+	
Acétoïne		+		
Ethanol			+	+
Isobutanol				+
Isopentanol			+	+
2-phényléthanol			+	
Acétate d'éthyle		+		+
Acétate d'isoamyle				+

Au cours de la croissance de *L. fermentum*, un seul nouveau composé volatil (acide acétique) est détecté par rapport aux composés déjà présents dans le milieu de culture (Tableau 23). L'acide acétique augmente significativement avec la croissance de la bactérie. Nous supposons que notre souche fait partie des souches de *L. fermentum* hétérofermentaires qui produisent l'acide lactique et l'acide acétique à partir de l'acide citrique (Lefebvre *et al.*, 2010). Cette souche joue un double rôle dans la fermentation lactique (cela a été déjà testé au laboratoire, données non montrées) et la fermentation acétique. Au cours de l'étude sur les fèves de cacao, nous allons vérifier si cette LAB contribue seulement par un seul composé volatil à l'arôme du cacao ou bien avec d'autres composés.

L'acide acétique et l'acétoïne ont été identifiés au cours de la croissance d'*A. pasteurianus* (Tableau 23). Nous observons une diminution de l'éthanol déjà présent dans le milieu et une augmentation de l'acide acétique. Cela s'explique par le fait que l'acide acétique est produit par l'oxydation de l'éthanol. Les résultats obtenus confirment l'hypothèse donnée par l'analyse statistique dans le chapitre précédent (Chapitre III, Résultats et Discussions) qui nous a permis de relier la quantité d'acide acétique et l'acétoïne à cette espèce initialement identifiée par DGGE et isolée lors de cette étude. L'acétate d'éthyle a été également observé au cours de la

croissance d'*A. pasteurianus*. Cette dernière fait sûrement partie des souches d'*A. pasteurianus* productrices d'acétate d'éthyle à partir de l'estérification de l'acide acétique et de l'éthanol au cours de la fermentation acétique (Kashima *et al.*, 1998 ; 2000).

L'acétoïne est parmi les principaux métabolites sécrétés par plusieurs microorganismes, tels que les levures (Romano and Suzzi, 1993 ; 1996, Pretorius, 2000) et les bactéries (Xiao and Xu, 2007). Jusqu'à présent, les principales bactéries productrices d'acétoïne se répartissent en 4 groupes : le genre *Bacillus*, LAB, l'espèce *Paenibacillus polymyxa*, la famille des entérobactéries (Xiao et Xu, 2014). L'acétoïne est produite à partir du 2,3 butanediol et du pyruvate qui sont formés à partir du glucose ou d'autres métabolites primaires comme l'éthanol, l'acétate, ou le lactate (Xiao et Xu, 2007). L'acétoïne peut être alternativement produite par les AAB par oxydation du 2,3 butanediol (Romano *et al.*, 2002). D'après la littérature, nous supposons que l'acétoïne a été produite à partir des métabolites primaires présents dans le milieu que sont l'éthanol et l'acide acétique vu qu'aucun sucre n'est présent dans le milieu de culture (PSM-AAB).

Au cours de la croissance de la levure *P. kudriavzevii*, 5 composés volatils ont été identifiés ; 2 appartenant à la famille des esters qui sont l'acétate d'éthyle et l'acétate d'isoamyle et 3 appartenant à la famille des alcools qui sont l'éthanol, l'isopentanol et l'isobutanol (Tableau 23). Tous ces composés augmentent avec la croissance de la souche. L'éthanol présente la quantité la plus importante suivie de l'isopentanol alors que la quantité d'isobutanol est très petite par rapport aux deux autres alcools. En ce qui concerne les esters, l'acétate d'éthyle est l'ester dominant. Tous ces composés à part l'isobutanol ont été détectés précédemment dans les fèves de cacao fermentées naturellement. Ces composés sont produits par *P. kudriavzevii* mais sûrement par d'autres levures présentes. Le profil aromatique de cette souche va être étudié par la fermentation d'une monoculture de levure sur le cacao.

Les composés détectés au cours de la croissance de *P. manshurica* se répartissent en deux familles : alcools et acides (Tableau 23). Par contre la souche n'a produit aucun ester dans ce milieu (PSM-LAB, pH=3.5) Les 3 alcools produits sont l'isopentanol, l'éthanol et l'alcool de phényléthyle : l'isopentanol correspond au pic dominant. La souche a produit une faible quantité d'éthanol par rapport à *P. kudriavzevii*, et la surface du pic de cet alcool reste stable au cours de la croissance de *P. manshurica*.

Les deux acides détectés sont l'acide propionique et l'acide isovalérique. Ces derniers augmentent au cours de la croissance avec une dominance de l'acide isovalérique. Dans la

prochaine étude concernant la monoculture de levure sur le cacao, nous allons vérifier si vraiment cette levure ne produit pas d'ester ou bien si ce sont les conditions de culture qui provoquent cette absence de production.

Les résultats obtenus lors de l'étude préliminaire sur les milieux liquides nous ont permis d'avoir une idée sur les composés volatils produits par les quatre souches microbiennes. *A. pasteurianus* produit de l'acide acétique et de l'acétoïne dans le milieu PSM-AAB. *L. fermentum* produit uniquement de l'acide acétique dans le milieu PSM-LAB. Les deux levures produisent des alcools ; *P. kudriavzevii* produit des esters et *P. manshurica* produit des acides. Nous allons vérifier ces profils aromatiques dans la prochaine partie qui présente les micro-fermentations de mono et co-culture sur le cacao par des souches isolées.

IV.3. Étude du profil aromatique au cours de micro-fermentations du cacao

Des micro-fermentations de monoculture par *L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica* et également une micro-fermentation de co-culture des quatre souches ont été réalisées sur des fèves de cacao qui sont naturellement stériles (protégées par la cabosse). Les fermentations de mono et coculture nous ont permis d'identifier le profil aromatique de chaque souche à partir du cacao et de comparer les profils précédemment obtenus dans les milieux liquides simulant la pulpe de cacao. Les profils aromatiques des quatre souches nous ont aidé à relier certains composés déjà détectés dans le cacao fermenté naturellement en Côte d'Ivoire (Chapitre III, Résultats et discussions) d'où ces souches ont été isolées et également de simuler la production des composés volatils dans la fermentation naturelle du cacao.

Les composés volatils naturellement présents sur les fèves de cacao ont été analysés (Tableau 24) dans le but d'observer la dégradation de ces composés et la production d'autres composés par les microorganismes au cours de la fermentation.

Tableau 24 : Identification des composés volatils détectés sur les fèves non fermentées.

Composé volatil	Temps de rétention	Indice de Kovats calculés	Indice de Kovats (littérature)
2-Pentanone	2,607	971	973
Acétate 2-pentyle	3,938	1026	-
2-Pentanol	5,244	1141	1118
2-Heptanone	6.34	1171	1170
Acétate-2-heptyle	9,322	1254	1270
2-Heptanol	11,19	1304	1299
2-Nonanone	13,69	1374	1388
Acide acétique	15,90	1434	1449
2,4-Diacetoxypentane	19,56	1535	-
Diacétate 2,3-Butanediol	21,10	1577	-
Acétophénone	22,94	1628	1650
Alcool de phényléthyle	32.41	1889	1925

- : IK non trouvé

IV.3.1. Fermentation du cacao en monoculture de LAB

Dans cette partie, la concentration en microorganismes est exprimée en Log UFC/ g en raison de temps prolongé de la fermentation du cacao (6 jours) par rapport au temps de croissance en milieu liquide (24h) où la concentration est exprimée en UFC/ mL.

La micro-fermentation par *L. fermentum* a été réalisée pendant 6 jours. Les prélèvements ont été effectués à 1, 2, 3, 4, et 6 jours de fermentation. La concentration initiale est de 7,25 log UFC/g de fèves ; cette dernière atteint son maximum au 1^{er} jour avec 9,62 log UFC/g de fèves, puis diminue jusqu'à 8,88 log UFC/g de fèves au 6^{ème} jour (Figure 84). Des études ont montré une augmentation de la croissance des populations de LAB au 2^{ème} jour de fermentation de 4 à 7,95 log UFC/g de matière sèche (Lagunez Galvez *et al.*, 2007). D'autres études sur la fermentation du cacao ont trouvé un maximum de populations de LAB au bout de 3 jours de fermentation (Lefebvre *et al.*, 2011 ; Moreira *et al.*, 2013). Nous avons constaté que la croissance des LAB augmente plutôt dans la fermentation de monoculture en comparant avec les fermentations naturelles ou les LAB entrent en compétition avec d'autres populations microbiennes notamment les levures qui s'installent en premier lieu avant l'initiation de la fermentation lactique. Ce résultat va être confirmé par la fermentation en co-culture plus tard.

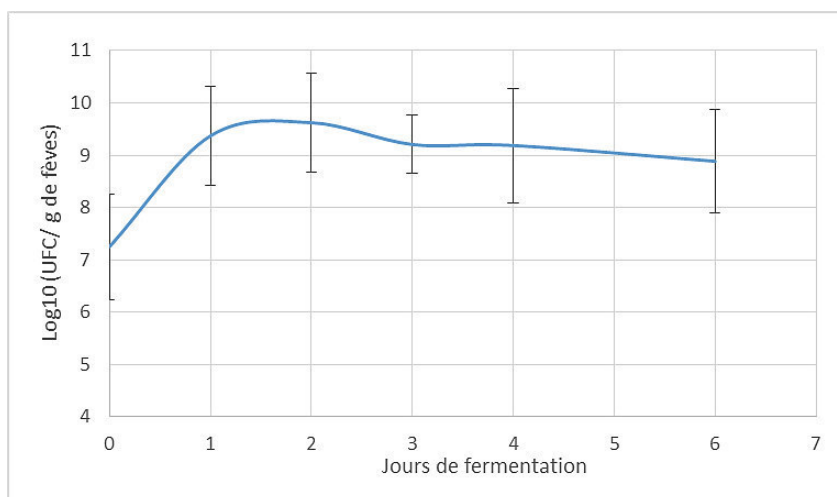


Figure 84 : Croissance de *L. fermentum* durant la fermentation en monoculture du cacao.

L. fermentum a produit plusieurs composés au cours de la fermentation du cacao alors que dans le milieu liquide (PSM-LAB pH= 4.5), cette bactérie a produit un seul composé qui est identifié comme l'acide acétique.

Les composés identifiés au cours de la monoculture de *L. fermentum* sur les fèves de cacao, appartiennent à la famille des alcools, des acides et des cétones. Cependant, aucun ester n'a été produit.

Au cours de la croissance de *L. fermentum*, nous avons observé la production d'acide isovalérique et d'acide acétique avec une dominance de ce dernier (Figure 85.a) qui a été déjà identifié au cours de la croissance dans le milieu liquide. La production d'acide isovalérique par les LAB et par d'autres microorganismes associés au fromage a également été observée à partir du catabolisme des acides aminés (Yvon and Rijnen, 2001). *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, sont capables de produire in vitro les acides méthylbutyriques dont l'acide isovalérique en présence de leucine et d' α -cetoglutarate (Helinck *et al.*, 2004).

Les alcools produits au cours de la croissance sont le 2-pentanol, l'isopentanol, le 2,3- butanediol. Le 2-pentanol représente l'alcool le plus important initialement présent dans les fèves naturelles mais il est aussi produit par les LAB (Figure 85.b). La surface du pic de 2,3- butanediol est très petite au 1^{er} jour de fermentation puis augmente à partir du 2^{ème} jour où on remarque la disparition de l'acétoïne (Figure 85. c). On suppose que l'acétoïne qui est produite par oxydation du 2,3 butanediol au début de la fermentation (Romano *et al.*, 2002) est générée pendant la fermentation par les bactéries lactiques et contribue à l'amélioration du profil organoleptique de certains aliments fermentés (Garcia-Quintáns *et al.*, 2008).

La 2-pentanone est la cétone la plus dominante sur les fèves naturelles. Elle augmente au cours de la croissance de la LAB. Les autres cétones présentes sur les fèves naturelles qui présentent de faibles concentrations (acétophénone, 2 heptanone, 2-nonanone) restent stables au cours la fermentation en monoculture (Figure 84. c). Aucun ester n'est produit au cours de la fermentation par *L. fermentum*. Les esters initialement présents sur les fèves naturelles diminuent, par exemple l'acétate 2-pentyle qui est le plus dominant sur les fèves non fermentées (Figure 85. d).

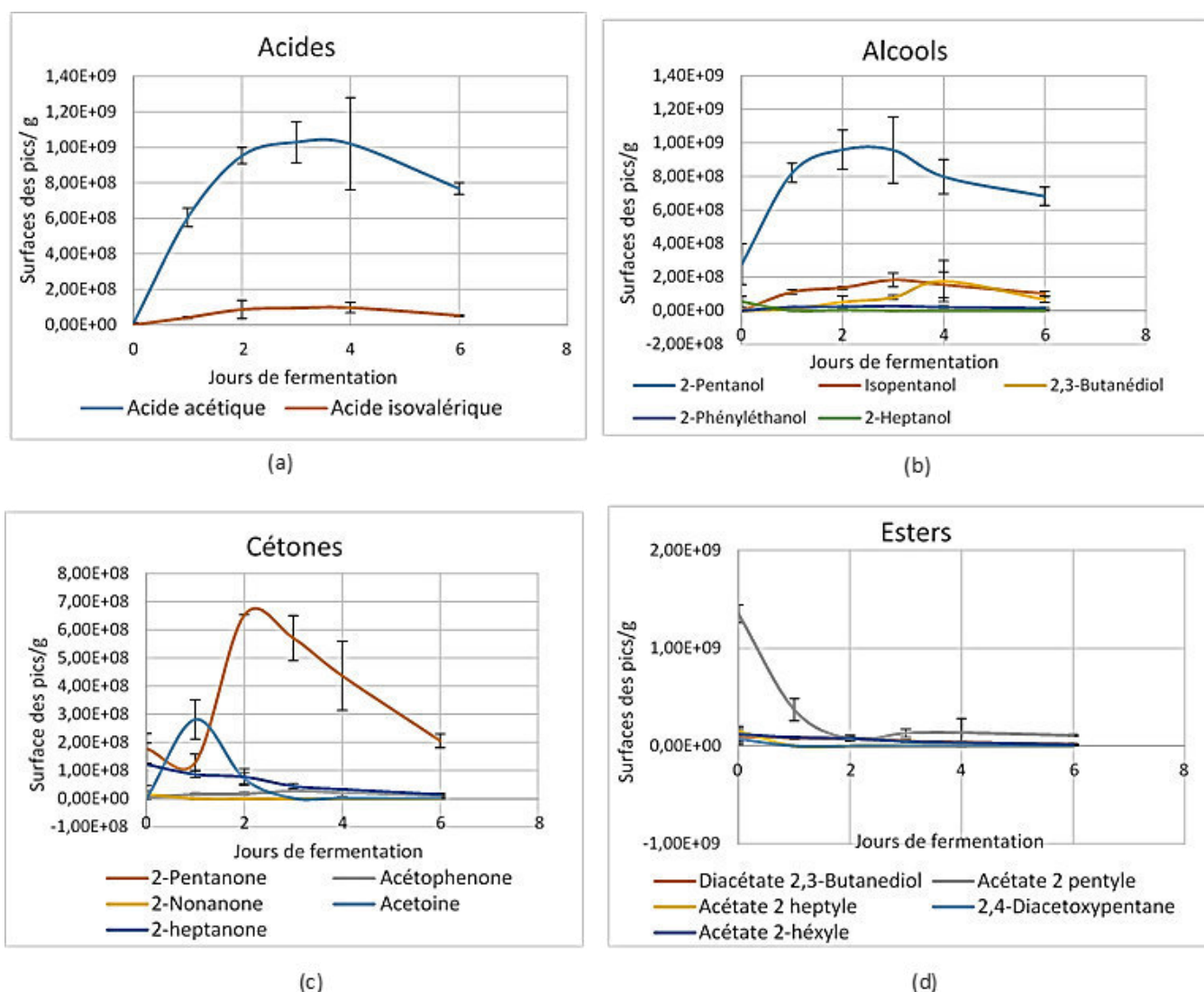


Figure 85 : Surfaces des pics d'acides (a), d'alcools (b), des cétones (c) et d'esters (d) au cours de fermentation par la monoculture de *L. fermentum*.

IV.3.2. Fermentation du cacao en monoculture d'AAB

La micro-fermentation par *A. pasteurianus* a été réalisée pendant 6 jours. Les prélèvements ont été réalisés à 1, 2, 4, 5, et 6 jours de fermentation. La concentration initiale de 5,93 UFC log/g

a augmenté légèrement pour atteindre 6,61 UFC log/g de fèves au 1^{er} jour (Figure 86). Cette souche n'est pas bien développée vu les conditions d'anaérobiose présentes dans les tubes scellés. Les AAB n'ont pas cultivé autant que les LAB qui ont augmenté de 2 log UFC/ g au cours de la fermentation.

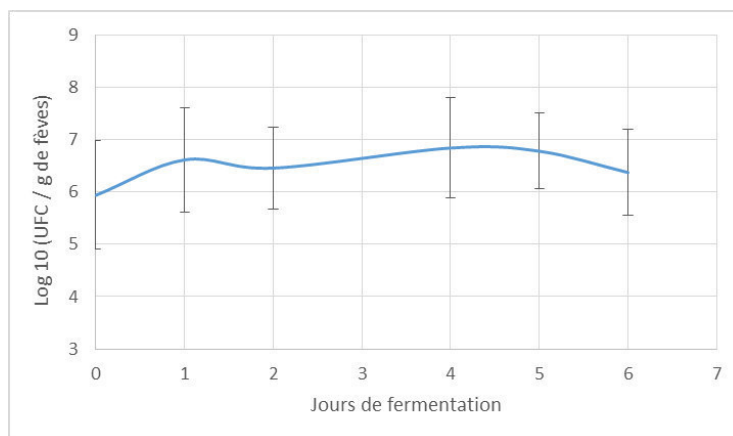


Figure 86 : Croissance d'*A. pasteurianus* durant la fermentation du cacao en monoculture

Les principaux composés volatils détectés lors de la fermentation de monoculture d'*A. pasteurianus* se répartissent en 3 familles : alcools, acides et terpènes. D'autres composés sont également détectés. Les alcools détectés sont l'isopentanol et le 2-pentanol ; ce dernier était dominant dans les fèves non fermentées et il est produit lors de la fermentation par *A. pasteurianus* (Figure 87.a). Trois acides sont détectés : l'acide isovalérique qui est le dominant et qui est un composé principal du vinaigre (Callejón *et al.*, 2009), l'acide isobutyrique et l'acide acétique qui sont moins concentrés. Une faible quantité d'acide acétique est détectée sur les fèves non fermentées et n'a pas évolué au cours de la croissance des AAB (Figure 87.b). On observe logiquement l'absence de production d'acide acétique en absence d'éthanol dans le milieu. Cela confirme que notre souche n'est pas capable de produire cet acide à partir d'autres sources de carbones mais seulement à partir de l'éthanol comme a été montré sur le milieu liquide (PSM-AAB) dans l'étude préliminaire.

Vers la fin de la fermentation aux 5 et 6^{ème} jours, nous avons remarqué que la bactérie *A. pasteurianus* produit d'autres composés comme le benzaldéhyde qui est produit à partir des acides aminés (Figure 87.c). On suppose donc que cette souche dégrade les sucres et d'autres sources de carbones en premier lieu puis dégrade les acides aminés à la fin de la fermentation. Un petit pic d'acétate d'isopropyle a été également identifié à la fin de la fermentation (Figure

87.d). Cet ester a déjà été identifié au cours de l'acétification du vin par les AAB (Pascal *et al.*, 2006 ; Callejón *et al.*, 2009).

Un terpène a été identifié comme le D- limonène qui augmente au cours de la fermentation (Figure 87.e). Les terpènes sont naturellement présents dans les plantes. Le limonène (4- isopropényl-1-méthylcyclohexane) est un monoterpène monocyclique. Il est considéré comme le composé majeur présent naturellement dans des huiles essentielles d'agrumes (De Conti *et al.*, 2001, Onken et Berger, 1999). Il est biosynthétisé par les plantes à partir de l'isopropényl-diphosphate (IPP) et le diméthylallyldiphosphate (DMAPP) qui sont des précurseurs universels pour la biosynthèse des terpènes. Les monoterpènes sont les substrats de transformations microbiennes (Mikami, 1988 ; Trudgill, 1994). La biotransformation de limonène par les bactéries, les levures, les moisissures et les plantes a été largement étudiée (Demyttenaere *et al.*, 2001 ; Duetz *et al.*, 2003 ; Rottava *et al.*, 2010 ; Yoo *et al.*, 2002). Aucun travail n'a montré la production naturelle de D-limonène par les microorganismes. On pense que ce composé soit été synthétisé pas naturellement par la matrice végétale (cacao) ou bien été produit par *A. pasteurianus*. Ceci va être confirmé au cours des fermentations des autres monocultures de levures et la fermentation en co-culture.

La 2-pentanone est la seule cétone produite lors de cette fermentation (Figure 87.f). L'acétoïne produite par *A. pasteurianus* dans le milieu liquide n'a pas été produite dans les fèves de cacao. Cela s'explique par le fait que cette souche produit l'acétoïne à partir de l'éthanol ou de l'acide acétique et non pas à partir des sucres ou d'autre sources de carbone qui constituent la pulpe de cacao.

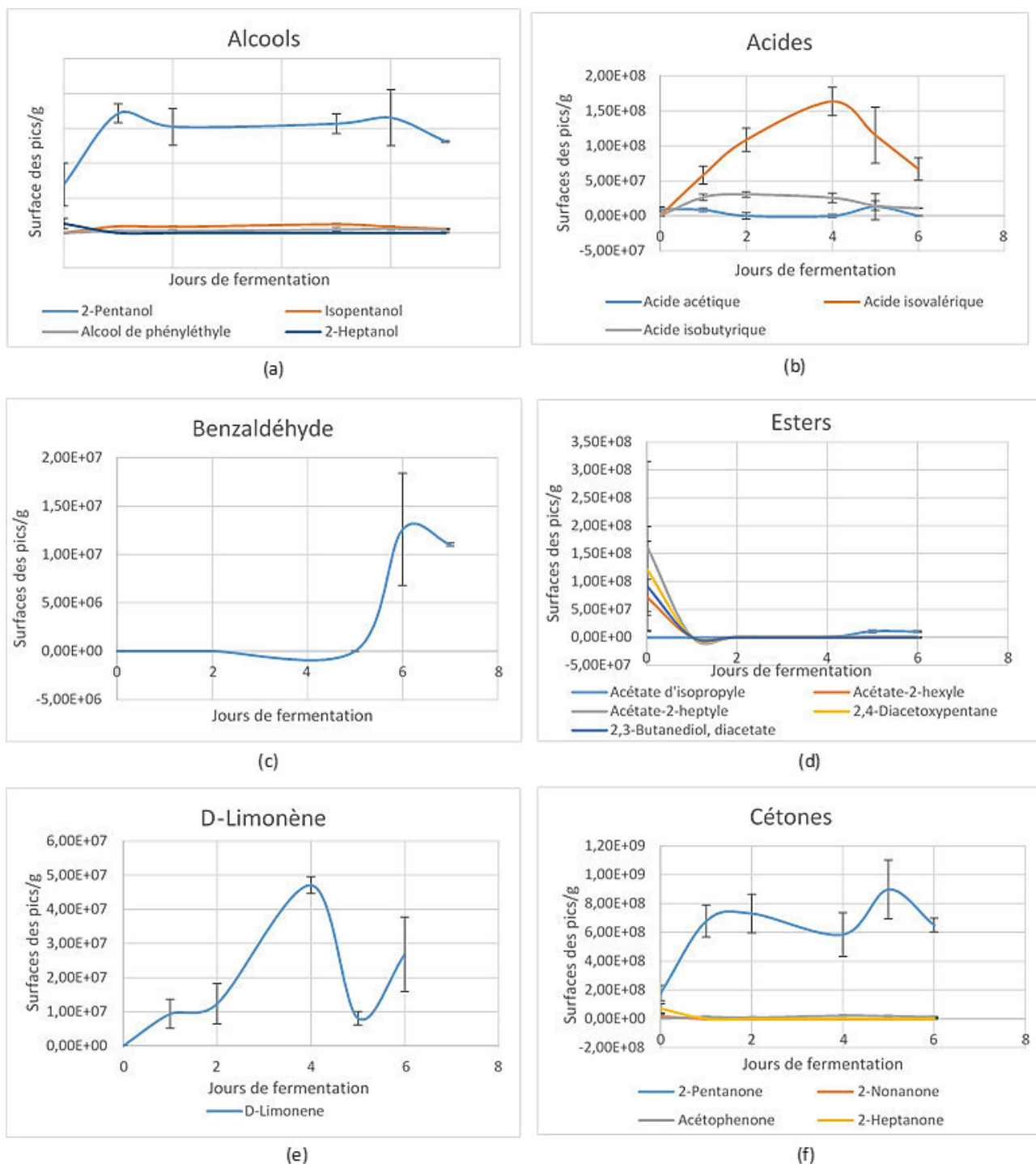


Figure 87 : Surfaces des pics d'alcools (a), d'acides (b), du benzaldéhyde (c), d'esters (d) de D-limonène (e) et de cétones (f) au cours de la fermentation en monoculture d'*A. pasteurianus*.

IV.3.3. Fermentation du cacao en monoculture de levures

a- *P. kudriavzevii*

La fermentation du cacao par la monoculture de *P. kudriavzevii* a duré 6 jours. Les prélèvements ont été effectués à 1, 2, 3, 4 et 6 jour. La concentration initiale est de 5,69 log puis augmente jusqu'à 9,18 log levures/g de fèves au bout de 2 jours. La concentration reste stable à environ 9 log levures/g jusqu'à la fin de fermentation. On remarque que la souche a bien poussé dans les conditions d'anaérobiose (tubes scellés) favorables à son développement (Figure 88). Ho *et al.* (2014) ont réalisé une fermentation de cacao avec un mélange de levures dont *P. kudriavzevii* qui a atteint un maximum de populations de 6 à 7 log UFC/g de 72 à 96 h de fermentation. Notre souche a donc mieux poussé en comparaison à la souche appartenant à la même espèce qui a été étudié par Ho *et al.* (2014) et qui était en compétition avec plusieurs levures ce qui a ralenti probablement sa croissance.

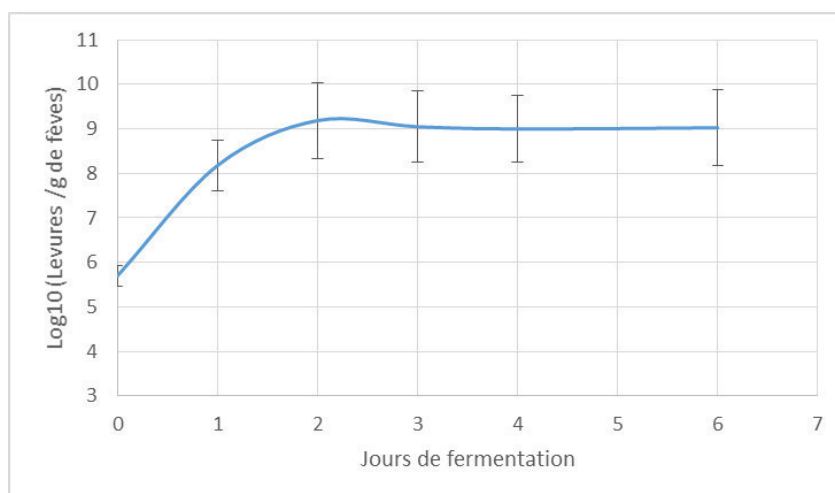


Figure 88 : Croissance de *P. kudriavzevii* durant la fermentation du cacao en monoculture

L'éthanol et l'isopentanol sont les alcools majeurs produits au cours de la fermentation. Le 2- pentanol augmente très légèrement (Figure 89.a). Ce composé a été fortement produit au cours de la fermentation par *A. pasteurianus* et *L. fermentum*. Deux acides sont détectés au cours de la croissance de la levure : l'acide isovalérique et l'acide acétique ; ce dernier présente un pic plus important (Figure 89.b). Le seul composé cétonique produit au cours de la fermentation est la 2- pentanone (Figure 89.c).

Deux acétates sont produits lors de cette fermentation, l'acétate d'isoamyle et l'acétate d'éthyle qui présente un grand pic au 1^{er} jour de fermentation et diminue ensuite au 3^{ème} jour puis devient stable jusqu'à la fin de fermentation (Figure 89.d). L'acétate d'éthyle provient de l'estérification

de l'acide acétique et de l'éthanol qui étaient en quantités importantes au 1^{er} et 2^{ème} jour de fermentation, donc la diminution de l'acétate d'éthyle est peut être expliqué par la diminution de l'éthanol et de l'acide acétique.

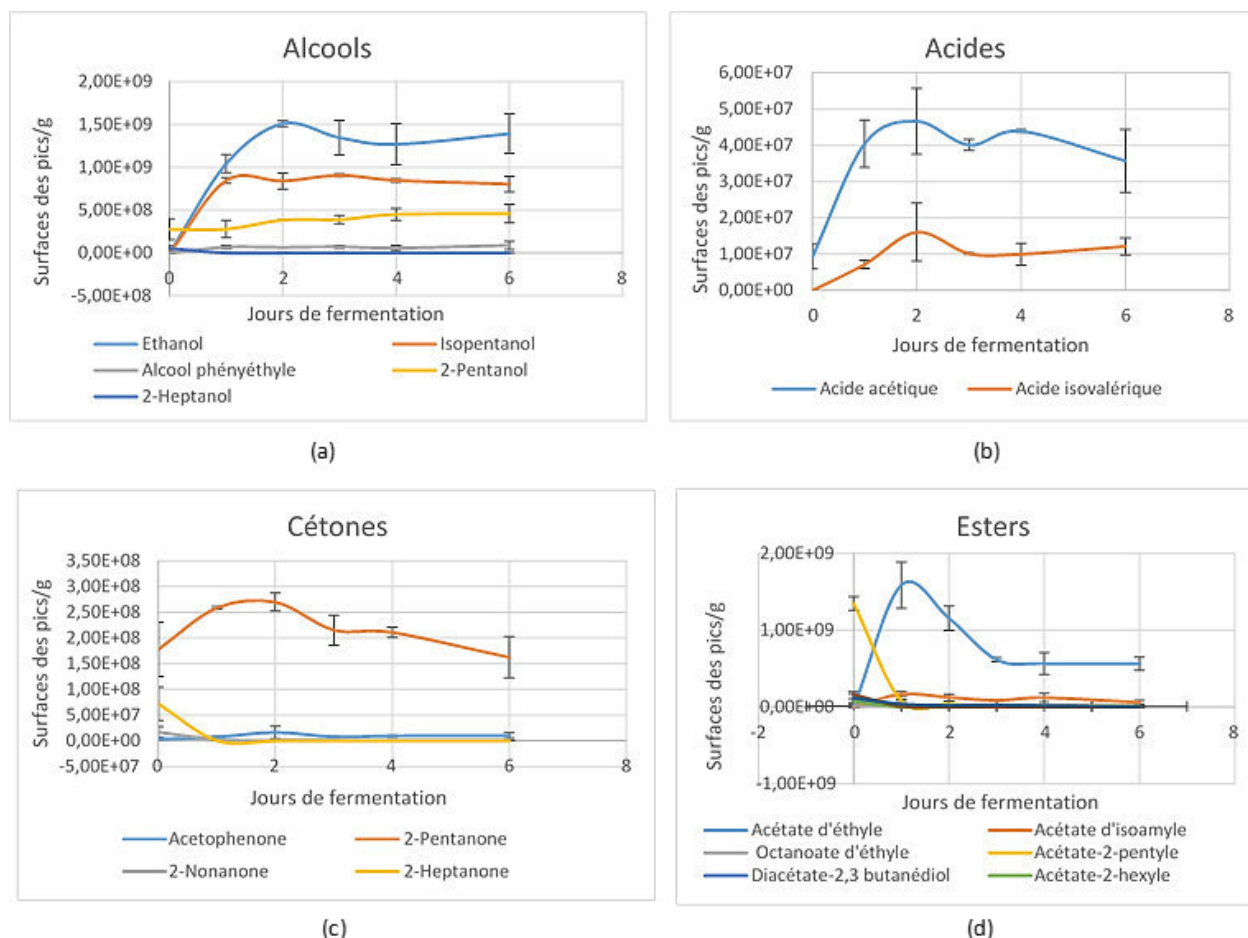


Figure 89 : Surface des pics d'alcools (a), d'acides (b) d'acétone (c) et d'esters (d) au cours de la fermentation de monoculture de *P. kudriavzevii*.

b- *P. manshurica*

La fermentation du cacao par la monoculture de *P. manshurica* a duré 7 jours. Des prélèvements ont été effectués à 1, 2, 3, 4 et 7 jours. La concentration initiale était de 7,20 log puis a augmenté jusqu'à 9,08 log levures/g de fèves après 2 jours. Au 7^{ème} jour, la croissance diminue légèrement à 8,68 log (Figure 90). En comparant avec la monoculture de *P. kudriavzevii*, nous obtenons une courbe de croissance similaire mais avec une vitesse supérieure pour *P. kudriavzevii* qui augmente de 3,49 log par rapport à *P. manshurica* qui n'augmente que de 1,88 log levures/g sur 48 h.

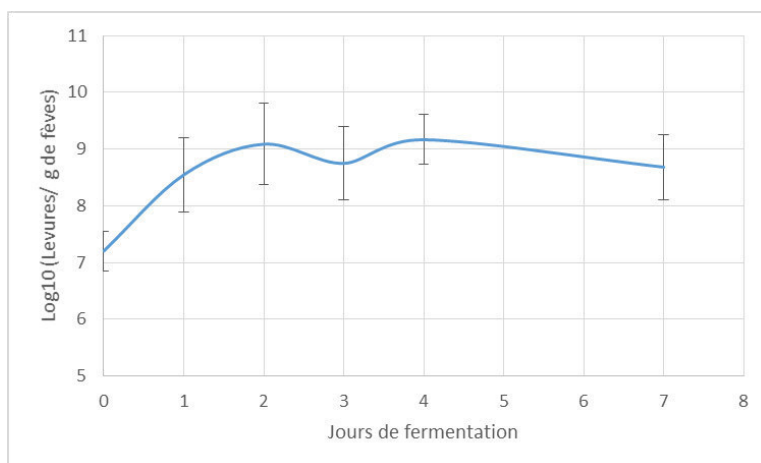


Figure 90 : Croissance de *P. manshurica* durant la fermentation du cacao en monoculture.

P. manshurica produit au cours de la fermentation de l'éthanol et de l'isobutanol comme *P. kudriavzevii*. Par contre elle produit beaucoup plus de 2-pentanol par rapport à *P. kudriavzevii*. Elle produit également un autre alcool qui est le 1-hexanol (Figure 91.a). Cette levure produit les mêmes acides que *P. kudriavzevii* c'est-à-dire l'acide acétique et l'acide isovalérique. L'acide acétique n'augmente pas avec la croissance de *P. manshurica* car il est seulement produit à partir du 3^{ème} jour de fermentation (Figure 91.b).

Cette levure produit une seule cétone qui est la 2-pentanone qui est produite également par *P. kudriavzevii* (Figure 91.d). On remarque que *P. manshurica* produit de l'acétate d'isoamyle et du benzoate d'isoamyle au cours de sa croissance mais pas d'acétate d'éthyle qui un composé principalement produit par les levures (Figure 91.c). Ho *et al.* (2014) ont également observé l'absence d'acétate d'éthyle au cours de la fermentation réalisée par un mélange de souches de levures. La capacité de production de l'ester par les levures varie selon les espèces et également avec les conditions de croissance. Selon Peynaud (1956), *Pichia* et *Hansenula* produisent de grandes quantités d'acétate d'éthyle, tandis que *Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Kloeckera* génèrent de petites quantités de cet ester. En outre, dans des conditions anaérobies, *Hansenula* et *Candida* peuvent produire jusqu'à 100 fois plus d'acétate d'éthyle en présence d'éthanol qu'en son absence (Peynaud, 1956).

Nous confirmons cette production d'esters en monoculture sur fèves de cacao. Cela n'a pas été observé sur le milieu de culture liquide.

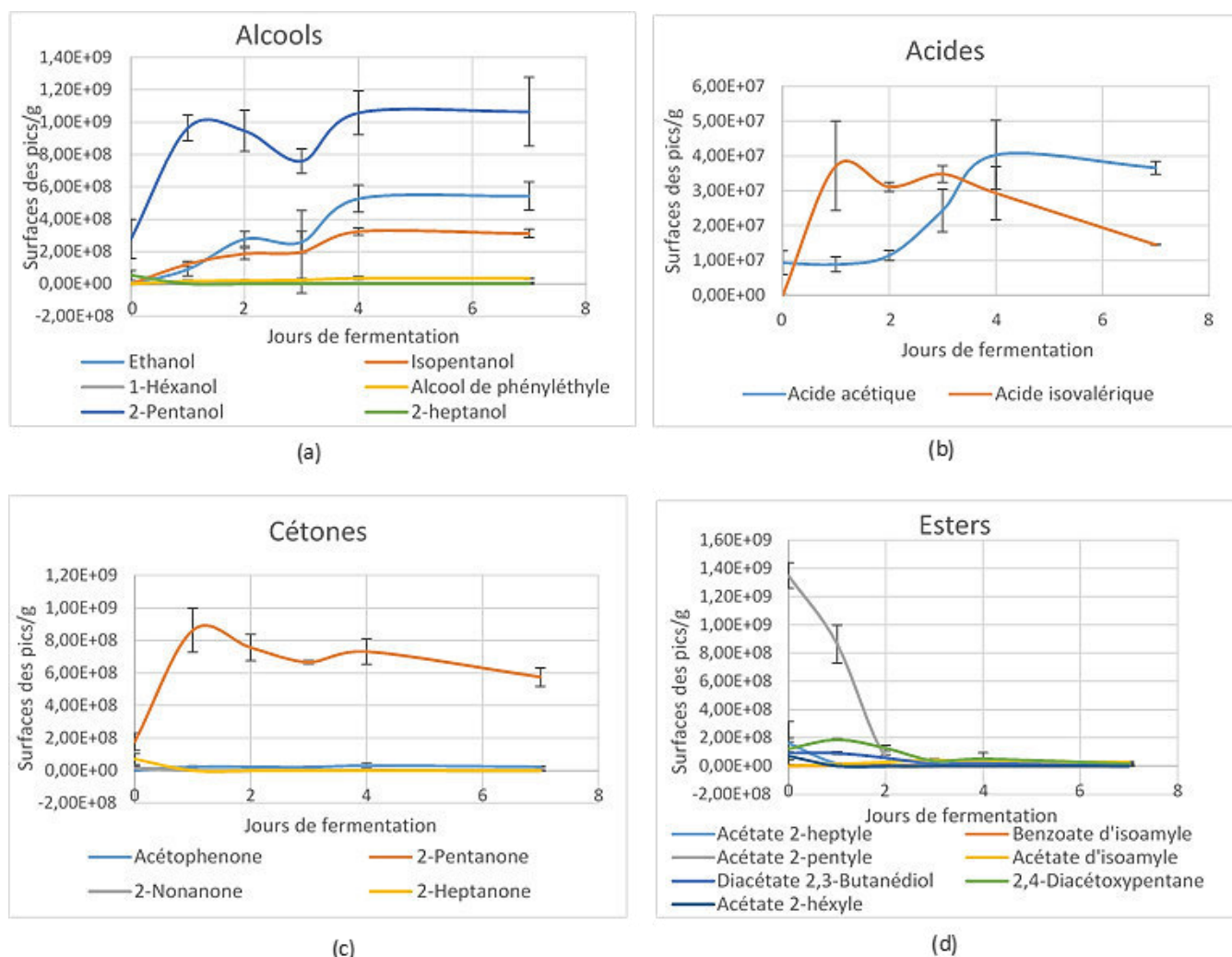


Figure 91 : Surfaces des pics des alcools (a), des acides (b), de cétones (c), et esters (d) détectés au cours de la fermentation en monoculture de *P. manshurica*.

IV.3.4. Fermentation du cacao en co-cultures de LAB, AAB et levures

Une fermentation en co-culture a été réalisée avec le mélange des quatre souches. La fermentation a duré 6 jours. La concentration initiale a été déterminée par rapport à la charge microbienne moyenne détectée au début de fermentation de cacao qui varie entre 5 et 7 log UFC/ g (Nielsen *et al.*, 2007 ; Papalexandratou *et al.*, 2013). Dans notre étude nous avonsensemencé simultanément les fèves de cacao stériles à 6,38 log UFC de *P. kudriavzevii* /g, à 6,47 log UFC de *P. manshurica*, à 7,19 log UFC de *L. fermentum* et 6,37 log UFC d'*A. pasteurianus* par gramme de fèves de cacao.

Au cours des premières 24 h de fermentation toutes les populations augmentent, *L. fermentum* augmente de 1,15 Log UFC, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica* augmentent toutes les deux de 1,15 log UFC. Après 24 h ces populations diminuent, tandis que *A. pasteurianus*

augmente jusqu'à 48 h pour atteindre 2,40 log UFC puis commence à diminuer mais reste toujours la population dominante au cours de la fermentation suivie par *L. fermentum* (Figure 92). Malgré les conditions d'anaérobiose dans les tubes fermées, *A. pasteurianus* a poussé. Nos résultats s'accordent avec ceux obtenus par Lagunes Galvez *et al.* (2007) et Papalexandratou *et al.* (2013) qui ont montré la dominance des LAB et des AAB au cours de la fermentation par rapport aux levures qui diminuent après 24 h.

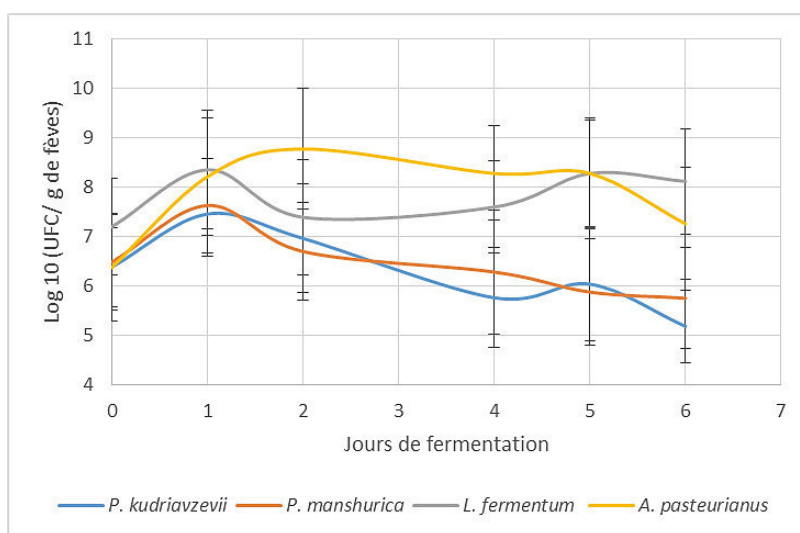


Figure 92 : Fermentation de co-culture de *L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica*.

Au cours de la fermentation, 4 alcools sont produits à savoir : l'éthanol, l'isopentanol qui sont majoritaires, le 2,3 butanediol et l'alcool de phényléthyle. Dans les fermentations de monoculture de toutes les souches, nous avons remarqué que le 2-pentanol augmente au cours de la fermentation alors que dans le cas de la co-culture, cet alcool initialement présent dans la pulpe non fermentée est plutôt dégradé (Figure 93.a). L'éthanol augmente au 1^{er} jour de fermentation puis diminue légèrement après 2 jours. Cet alcool est uniquement produit par les levures comme cela a été déjà observé dans les fermentations de monoculture. L'isopentanol est un alcool produit par les quatre souches mais principalement par les levures, c'est pour cela que nous observons une diminution de cet alcool avec la diminution de la croissance des deux levures. L'alcool de phényléthyle et le 2,3 butanediol sont des alcools minoritaires. Le 2,3 butanediol est uniquement produit par *L. fermentum* comme cela a été déjà observé sur la monoculture de cette bactérie. L'évolution de l'éthanol est liée logiquement à la l'évolution de l'acide acétique parallèlement à l'acétate d'éthyle et non pas à la croissance des levures car il est converti en acétate d'éthyle.

Au cours de la co-culture réalisée, le principal acide détecté est l'acide acétique qui est produit par les quatre souches mais principalement par l'AAB suivie par la LAB. Cet acide diminue avec l'augmentation de l'acétate d'éthyle. L'acide isovalérique est détecté uniquement au 1^{er} jour, ce dernier est produit par toutes les souches à l'exception de *P. manshurica*. L'acide isobutyrique augmente au cours de la fermentation (Figure 93.b) ; Ce dernier est uniquement produit par *A. pasteurianus*.

Parmi les esters produits dans les fermentations de monoculture de levures, nous en avons détecté deux dans la co-culture qui sont l'acétate d'isoamyle et l'acétate d'éthyle (Figure 93.c). Ce dernier est produit par *P. kudriavzevii* au début de fermentation comme cela a été montré dans la monoculture. Par contre il est également produit par *A. pasteurianus* en présence d'éthanol dans le milieu liquide. Nous supposons que l'augmentation de cet ester au cours de la fermentation est due à sa production par *A. pasteurianus* (en milieu PSM-AAB) vu que cette souche reste dominante tandis que les levures diminuent au cours de la fermentation. Nous avons remarqué d'autres nouveaux esters qui n'ont pas été détectés au cours des fermentations de monoculture qui sont l'acétate d'isobutyrate, l'isovalérate d'éthyle et le butanoate de butyle (Figure 93.c). Il a été observé que l'apparition de l'isovalérate d'éthyle est directement liée à la disparition de l'acide isovalérique. Ceci est peut-être dû à l'estérification de ce dernier.

Lors de la co-culture, aucune des cétones n'a été détectée malgré que l'acétoïne soit produite principalement par *L. fermentum* et par *A. pasteurianus* lors des fermentations en milieu liquide (Figure 93.d). Toutes les autres cétones déjà présentes sur les fèves non fermentées ont été dégradées dont la 2-pentanone qui est produite par toutes les souches au cours des monocultures.

Le D-limonène produit par *A. pasteurianus* est également détecté en plus grande concentration à la fin de la fermentation (Figure 93.e).

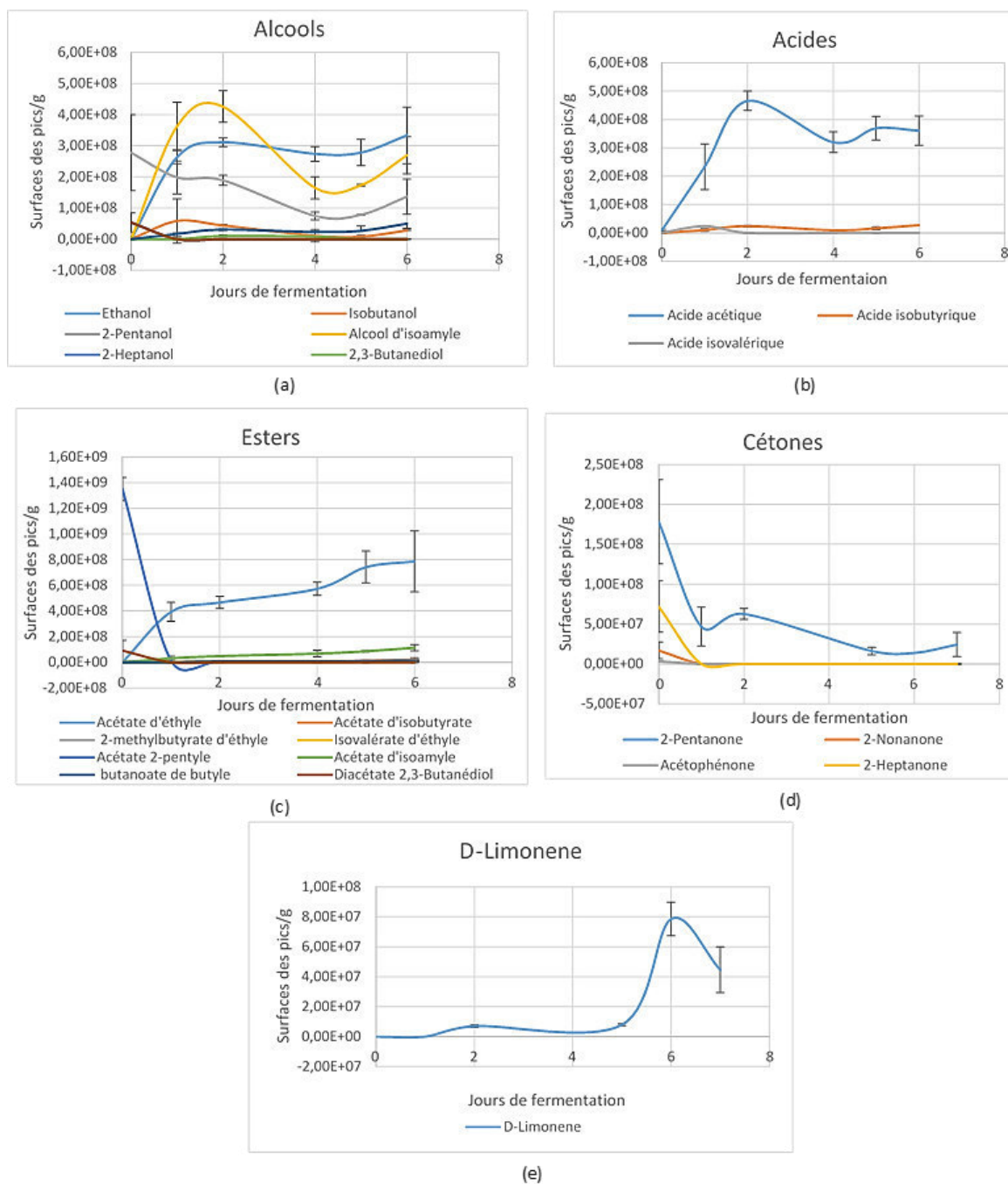


Figure 93 : Surfaces des pics des alcools (a), des acides (b), des cétones (c), des esters (d) et le D-Limonène (e) détectés au cours de la fermentation de co-culture de *L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica*.

Le tableau 25 présente les indices de Kovats (IK) des composés volatils identifiées et produits par les souches microbiennes au cours de la croissance en milieu liquide et des micro-fermentations.

Tableau 25 : Identification des composés volatils détectés au cours de la croissance en milieu liquide et au cours des micro-fermentations.

Composés volatils	Temps de rétention	IK calculés	IK de la littérature
Acétate d'éthyle	1,83	890	907
Ethanol	2,24	920	929
Acétate d'isobutyrate	2,93	952	-
Isovalérate d'éthyle	3,79	995	-
Isobutanol	4,61	1103	1099
Acétate d'isoamyle	5,08	1136	1117
D-Limonene	6,59	1178	1178
Isopentanol	7,29	1197	-
Butanoate de butyle	7,52	1203	-
Acétoïne	9,71	1264	1272
Octanoate d'éthyle	15,63	1426	1436
Acide acétique	15,97	1436	1449
Acide isobutyrique	21,5	1588	1588
Acide isovalérique	24,45	1669	1665
Acétate d'isopropyle	28,73	1787	-
Alcool phényléthyle	32,41	1889	1925

*IK : Indice de Kovats

- : IK non trouvé

A partir des résultats obtenus, nous avons pu identifier le profil aromatique de chaque souche et connaître les molécules produites par toutes les souches (levures et bactéries). Ce sont les 3 alcools (isopentanol, alcool de phényléthyle et le 2-pentanol), une cétone (2-pentanone) et 2 acides (acide acétique et acide isovalérique). Cette étude nous a permis également d'étudier l'impact des familles de microorganismes dans l'élaboration des précurseurs aromatiques, par exemple les esters et l'éthanol qui sont uniquement produits par les levures à l'exception de quelques esters comme l'acétate d'éthyle et l'acétate d'isopropyle produits par *A. pasteurianus*. L'acétoïne et le benzaldéhyde sont uniquement produits par les bactéries. La quantité d'acides est plus importante dans le cas de fermentation par les bactéries par rapport aux levures. Nos résultats s'accordent avec ceux de Ho *et al.* (2014) qui ont montré que les levures ont plus d'impact dans la production des esters et d'alcools et que les taux de cétones et d'aldéhydes sont similaires dans la fermentation par les bactéries ou par les levures. Crafacck *et al.* (2013) ont également montré que la fermentation réalisée en ajoutant des starters de culture de levures aromatiques produit un cacao de bonne qualité sensorielle avec un arôme doux et fruité.

IV.4. Conclusion partielle

Ces résultats nous ont permis de relier les composés volatils précédemment identifiés dans le cacao fermenté aux microorganismes producteurs et d'affirmer ou infirmer les hypothèses données sur les relations arômes-microbes obtenues dans le chapitre précédent en utilisant les analyses statistiques. En utilisant seulement quatre souches microbiennes, nous avons pu obtenir un certain nombre de composés volatils détectés sur les fèves fermentées naturellement et à partir desquelles les souches ont été isolées. La tétraméthylpyrazine est uniquement synthétisée par *Bacillus* c'est pour cela qu'elle n'a pas été détectée lors de cette étude. Les aldéhydes peuvent provenir d'autres bactéries AAB et LAB détectées par DGGE mais pas des levures puisqu'aucun aldéhyde n'a été identifié chez les levures. L'acétate d'isobutyl est sûrement produit par d'autres levures ; l'analyse statistique (ACC) réalisée dans le chapitre précédent nous a situé cet ester proche de *H. opuntiae* avec l'éthyle acétate et l'éthanol. Il est donc possible que cette souche ait plus d'impact dans la production de ces derniers : cela reste à confirmer. L'ACC a classé l'acétoïne et l'acide acétique proches de l'espèce *A. pasteurianus*, ce qui suggère que cette souche est la plus impliquée dans leur production. Lors de cette étude, nous avons confirmé que cette souche produit bien les deux composés à partir de l'éthanol. Il a été déterminé que les quatre souches identifiées (*A. pasteurianus*, *L. fermentum*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica*) produisent des composés volatils communs. Cela explique donc les difficultés de relier les composés volatils à une seule espèce microbienne (détecté par DGGE) en utilisant l'ACC (Chapitre III, Résultats et discussions).

Les fermentations de cacao en milieu solide avec les monocultures nous ont permis d'identifier davantage de molécules aromatiques et d'obtenir un profil aromatique plus complet par rapport aux analyses réalisées en milieu liquide. *A. pasteurianus* a produit l'acétoïne et l'acide acétique en milieu liquide (PSM-AAB) en présence d'éthanol mais en absence de ce dernier sur la simulation faite avec le cacao, l'acétoïne et l'acide acétique n'ont pas été détectés. La croissance des levures dans le milieu liquide simulant la pulpe de cacao a également permis d'identifier des composés qui n'ont pas été détectés dans la fermentation de monoculture sur le cacao, comme l'acétate d'isoamyle et isobutanol produits par *P. kudriavzevii* et l'acide propionique produit par *P. manshurica*.

A l'issue de cette étude, nous avons mis en évidence que de nombreux points auraient mérités d'être soumis à l'investigation comme le métabolisme de chaque souche dans chaque milieu (liquide et cacao) afin de comprendre les réactions biochimiques et les précurseurs de chaque

composé volatil produit au cours de la croissance et la fermentation par les souches. Il serait également intéressant d'aborder les interactions entre les microorganismes dans l'élaboration des composés aromatiques en tenant compte que certains composés sont présents seulement dans la co-culture et n'ont pas été identifiés dans la monoculture de chaque souche.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Ce travail a consisté à explorer les liens entre les communautés microbiennes des produits transformés (café et cacao) et les itinéraires techniques. Ceci afin de créer une méthode analytique de discrimination des traitements post-récolte du café et du cacao en utilisant un outil moléculaire (PCR-DGGE) mais aussi de discriminer l'origine géographique de différentes espèces de café par le même outil.

- *Café*

Nos travaux ont permis d'identifier les communautés microbiennes spécifiques à chaque étape des procédés du café. Les bactéries lactiques sont les plus spécifiques et discriminantes pour les cafés traités par voie humide, alors que le genre *Pseudomonas* représente la communauté marquante de la voie sèche. Ce genre *Pseudomonas* est présent sur les cerises fraîches du café car il a été détecté uniquement sur le café coque et disparaissait après décorticage. Cette étude a montré que les communautés microbiennes varient après le décorticage et non après l'étape de déparchage pour la voie humide, ce qui est dû à l'épaisseur de l'enveloppe qui protège le grain. Les deux espèces de café Robusta et Arabica présentent une composition chimique différente, ce qui fait que les flores microbiennes associées à ces deux cafés présentent une variation qui touche principalement la flore fongique. La structure de ces communautés microbiennes varie selon l'origine géographique qui montre un effet plus important que l'effet de l'espèce de café et moins important que l'effet des traitements post-récolte. L'étude comparative des cafés provenant de deux pays différents a permis de regrouper les cafés en fonction du mode traitement en premier abord puis en fonction de l'origine géographique, ce qui semble montrer que l'activité humaine est le principal facteur affectant la composition du microbiote. Les cafés traités par le procédé incluant une étape de fermentation avec ou sans eau, ou encore par la civette présentent plus de similarité que si on les compare au procédé sans fermentation. La PCR-DGGE est donc un outil efficace qui permet de discriminer et de mesurer l'effet des paramètres importants (le procédé, l'étape du procédé, l'espèce du café et l'origine géographique) sur les communautés microbiennes.

- *Cacao*

En ce qui concerne le cacao, la PCR-DGGE nous a permis de mesurer les paramètres influençant la structure des communautés microbiennes tout au long des procédés post-récolte.

Pour améliorer la saveur du cacao, beaucoup d'agriculteurs suggèrent le stockage des cabosses avant la fermentation. Ce travail a révélé un faible effet de la durée du stockage avant fermentation sur les bactéries ; par contre, le nombre d'espèces de levures, particulièrement *P. manshurica*, augmente avec la durée du stockage avant fermentation.

Les procédés post-récolte du cacao ont fait l'objet d'une étude approfondie de l'écabossage jusqu'au séchage des fèves, et l'effet de chaque étape sur la flore microbienne a été mesuré. Les communautés varient tout au long du procédé principalement au cours de la fermentation. Le séchage a également un effet sur les flores et principalement sur les populations bactériennes. La durée de fermentation a un impact important sur les changements du microbiote dans l'étape de séchage. Les espèces de *Clostridium* forment les communautés spécifiques au séchage. Ces communautés sont abondantes sur les fèves ayant subi de courtes durées de fermentation. Ces fèves sont riches en pulpe, ce qui permet aux autres communautés (*Clostridium*) présentes dans le sol, l'eau et les matières fécales des animaux de s'installer. Plus la durée de fermentation augmente, moins les communautés de *Clostridium* sont détectées au cours du séchage.

Clostridium n'a jamais été détecté sur le cacao mais sur d'autres aliments en boîte de conserve ou dans des emballages sous vide comme les viandes. La plupart des espèces bactériennes détectées lors de ce travail sont des espèces pathogènes de l'homme et des animaux (intoxications alimentaires) selon la littérature. Elles sont principalement isolées des matières fécales des animaux. Les *Clostridium* peuvent affecter le système digestif et les organes parenchymateux, et causent les myonécroses et des troubles neurologiques. Nous constatons que l'étape de séchage est une étape critique qui présente un risque pour le consommateur, il faut donc absolument améliorer les conditions de séchage en isolant les lieux de séchage et en augmentant la durée de fermentation vu que ces souches n'étaient pas détectées sur les fèves fermentées plus longtemps. Le risque de contaminer les consommateurs est peut-être faible vu que les fèves séchées seront torréfiées avant leur transformation en chocolat, ce qui détruit les micro-organismes, mais il faudra s'assurer que ces souches ne produisent pas de spores thermorésistantes ou des toxines, dans ce cas il faudrait augmenter le barème de la torréfaction. Egalement, la détection de ces espèces au niveau moléculaire, n'implique pas forcément qu'elles soient métaboliquement actives ou viables dans l'échantillon analysé. Pour s'assurer de la viabilité de ces espèces il faudra les isoler sur boîte de pétri.

Une étude sur l'effet de la variation des paramètres des procédés de fermentation et de l'aération au cours de la fermentation a été menée. La méthode de fermentation utilisée a montré une influence sur les communautés de *Clostridium* qui persistait jusqu'à la fin du procédé du cacao

issu des caisses en plastique, ce qui explique que la fermentation par cette technique fournit un cacao mal fermenté, avec des fèves de mauvaise qualité (Guehi *et al.*, 2010).

L'aération lors de la fermentation a un impact sur les communautés microbiennes. L'absence de brassage favorise la présence et l'abondance des levures ainsi que l'abondance des bactéries aérobies et thermophiles.

Les différents traitements post-récoltes du cacao ont également été discriminés par analyse globale des composés volatils par SPME-GC-MS. En effet, l'impact du stockage des cabosses, de la durée de fermentation et du brassage sur la qualité aromatique du cacao a été mesuré. L'analyse globale de l'écologie microbienne et la composition en composés volatils ont été combinées afin de pouvoir trouver des relations entre les micro-organismes et la production des précurseurs aromatiques. Il a été constaté que le brassage permet de réduire les teneurs en acides, les alcools et d'augmenter les teneurs en aldéhydes et les esters. La durée de stockage des fruits avant écabossage a également montré un effet sur la composition des volatils principalement sur la fermentation réalisée avec brassage. Néanmoins, une durée de stockage trop longue présentait des teneurs plus faibles en aldéhydes, cétones, esters et acides, ce qui s'accorde avec les travaux précédents qui ont montré que le stockage réduit la quantité des précurseurs d'arômes, comme les carbohydrates, les protéines, les acides gras. La fermentation avec un brassage de longue durée combinée à une courte durée de stockage avant fermentation est considérée comme le meilleur procédé qui permet d'obtenir des fèves contenant moins de composés indésirables comme les acides (saveur de beurre rance), et plus de composés désirables comme les esters (arôme de miel et de fleur) et les aldéhydes (flaveur fleurie et fruitée).

Une analyse statistique nous a permis de combiner les résultats des deux analyses effectuées (PCR-DGGE et SPME-GC-MS) et d'obtenir des relations entre les espèces détectées et les composés volatils présents. L'analyse statistique a permis d'expliquer la production ou l'abondance de l'acide acétique et de l'acétoïne par la forte présence de l'espèce *A. pasteurianus* et a également relié l'éthanol et l'acétate d'éthyle à *H. opuntiae*. Les autres composés aromatiques présents n'ont pas été reliés à la présence des autres espèces microbiennes. Cet outil nous a donné une idée sur la production de ces molécules et nous a conduits à chercher leur origine. Pour cela quatre souches représentatives isolées du cacao *L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. manshurica* et *P. kudriavzevii* ont été testées pures ou en mélange. Le profil aromatique des souches a été étudié sur milieu liquide simulant la pulpe de cacao et sur des fèves entourées de pulpe de cacao. Cette étude nous a permis de mesurer l'influence des familles de microorganismes dans l'élaboration des précurseurs aromatiques, par exemple les

esters et l'éthanol qui sont uniquement produits par les levures à l'exception de quelques esters comme l'acétate d'éthyle et l'acétate d'isopropyle produits par *A. pasteurianus*. Les aldéhydes et quelques cétones sont uniquement produits par les bactéries. Les acides sont produits par les deux types de microorganismes mais plus souvent par les bactéries que par les levures. Nos résultats ont montré que les levures ont plus d'impact sur la production d'esters et d'alcools dans le cacao et donc plus d'impact dans l'élaboration de la saveur du chocolat.

Nous avons observé que les quatre souches permettent d'obtenir la quasi-totalité des composés volatils détectés sur les fèves fermentées naturellement. Cela nous permet d'envisager l'utilisation de ces souches comme starters de culture pour la fermentation du cacao. Il reste cependant à montrer comment les utiliser, soit pures en succession de culture, soit en mélange initial.

Notre travail représente une des toutes premières études qui relie la présence de souches microbiennes à leur profil aromatique et au final au profil aromatique du cacao industriel.

Perspectives

A l'issue de ce travail, des perspectives de recherches ont été dégagées :

➤ Cacao :

- Avoir une idée précise sur les proportions d'espèces en réalisant des comptages microbiens.
- Poursuivre l'étude de la dynamique des populations microbiennes des procédés post-récolte sur l'étape de stockage des fèves traitées (fermentées et séchées) avant l'expédition.
- Étudier le métabolisme des souches microbiennes isolées (*L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* et *P. manshurica*) et les proposer comme des starters de culture.
- Isoler d'autres souches du cacao et étudier leur potentiel aromatique.

➤ Cacao et café :

- Améliorer la procédure d'identification des espèces qui présentent des co-migrations sur les gels DGGE en ciblant d'autres gènes microbiens.
- Faire une étude longitudinale sur 3 années de récolte minimum de café et de cacao afin de confirmer la pertinence des marqueurs microbiens pour chaque procédé de traitement appliqué.

- Étudier l'effet des différentes techniques de séchage et comparer le séchage artificiel par rapport au séchage naturel.

Liste des travaux

Cette thèse s'est concrétisée par la réalisation de deux publications, un chapitre de livre, trois communications écrites et une communication orale.

➤ Publications

- ✓ **Hamdouche, Y.**, Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., & Meile, J. C. (2015). Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117-122.
- ✓ **Hamdouche, Y.**, Nganou D. N., Meile, J.C., Durand, N., Teyssier, C., Montet, D. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses, (soumise à Food Research International).

➤ Chapitre

- ✓ Acetic Acid Bacteria: prospective applications in biotechnology. Teyssier, C., & **Hamdouche, Y.** In Microorganisms and Fermentation of Traditional Food Fermentations. Editors: Didier MONTET and Ramesh C. RAY (2015). Food Biology series, Science Publishers/CRC Press. Volume 2. En cours d'édition.

➤ Communications orales et écrites

- ✓ Assessing microbial diversity changes during cocoa beans fermentation and sun drying. **Hamdouche, Y.**, Kedjebo, K. B. D., Durand, N., Meile, J. C., Guehi, T., Montet, D. Congrès RAFA, 5 au 8 Novembre 2013 à Prague.
- ✓ Discrimination of Coffee geographical origin (*Coffea arabica*) from different regions of Cameroon analysis of their microbial ecology. **Hamdouche, Y.**, Nganou, D. N., Meile, J. C., Durand, N., Montet, D. Rencontre Qualiméditerranée, le 13 et 14 novembre 2013 à Montpellier.
- ✓ Discrimination of post-harvest processing, geographical origin, coffee species by analysis of microbial communities. **Hamdouche, Y.**, Meile, J.C., Nganou, D. N.,

Durand, N., Teyssier, C., Berthiot, L., Montet, D., Congrès Cocoa, Coffee & Tea, le 22 au 24 juin 2015 à Aveiro, Portugal (communications orale et écrite).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G. and Cabanes, F. J. (1994). Ochratoxin-a Production by Strains of *Aspergillus niger* Var *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7), 2650-2652.
- Aculey, P. C., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompierre, M., Takrama, J., Nørgaard, L & Nielsen, D. S. (2010). Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science*, 75(6), 300-307.
- Adams, A., & De Kimpe, N. (2007). Formation of pyrazines and 2-acetyl-1-pyrroline by *Bacillus cereus*. *Food Chemistry*, 101(3), 1230-1238.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical Reviews in Food Fcience and Nutrition*, 48(9), 840-857.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2009). Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. *Food Chemistry*, 113(1), 208-215.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2013a). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1097-1105.
- Alauzet, C., Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Gouby, A., Chiron, R., Rabaud, C., & Marchandin, H. (2010). *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 3935-3942.
- Ali, A. M. (1996). Effect of co-fractionation technique in the preparation of palm oil and sal fat based cocoa butter equivalent. *International Journal of Food sciences and Nutrition*, 47(1), 15-22.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169.
- Amoye, S. (2006). Cocoa sourcing, world economics and supply. *The Manufacturing Confectioner*, 86(1), 81-85.
- Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough,

demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5464-5473.

Anderson, K. A., & Smith, B. W. (2002). Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 2068-2075.

Anthony, F., Combes, M. C., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2002). The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 894-900.

Arcuri, E. F., El Sheikha, A. F., Rychlik, T., Piro-Métayer, I., & Montet, D. (2013). Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR–DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control*, 30(1), 1-6.

Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), 87-99.

Astoreca, A. L., Magnoli, C. E. and Dalcero, A. M. (2010). Ecophysiology of *Aspergillus* Section *Nigri* Species Potential Ochratoxin A Producers. *Toxins*, 2(11), 2593-2605.

Avallone, S., Brillouet, J. M., Guyot, B., Olguin, E., & Guiraud, J. P. (2002). Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 191-198.

Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J. M., Olguin, E., & Guiraud, J. P. (2001). Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42(4), 252-256.

Awua, P. K. (2002). Cocoa Processing and Chocolate Manufacture in Ghana. David Jamieson and Associates Press Inc., Essex, UK.

Bahl, H., Andersch, W., Braun, K., & Gottschalk, G. (1982). Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14(1), 17-20.

Bankoff, L., Ouattara, G. H., Karou, T. G., Guehi, S. T., Nemlin, J. G., & Diopoh, J. K. (2014). Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *Agronomie Africaine*, 25(2), 159-170.

Barel, M. (1997). Fermentation of cocoa: the way of its estimation and control. *Revue des Industries Alimentaires et Agricoles*, 14, 211-214.

Barel, M. (2008). Café: de la cerise à la tasse. Ed. *Techniques de l'Ingénieur. Agroalimentaire*.

Barel, M. (2013). Qualité du cacao. L'impact du traitement post-récolte. Edition Quae. Versailles, France.

- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 85(3), 293-300.
- Beckett, S. T. (2000). *The Science of Chocolate*. Royal Society of Chemistry Paperbacks.
- Beckett, S.T. (1999). *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. Oxford, Blackwell Science, 3rd edition, pp. 153–181.
- Belli, N., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marin, S. (2004). Incubation time and wateractivity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38(1), 72-77.
- Berbert, P. R. F. (1979). Contribuicao para o conhecimento dos acucares componentes da amendoa e do mel de cacau. *Review Theobroma*, 9, 55-61.
- Bertolini, M., Bevilacqua, M., & Massini, R. (2006). FMECA approach to product traceability in the food industry. *Food Control*, 17(2), 137-145.
- Bevilacqua, M., Bucci, R., Magrì, A. D., Magrì, A. L., & Marini, F. (2012). Tracing the origin of extra virgin olive oils by infrared spectroscopy and chemometrics: A case study. *Analytica Chimica Acta*, 717, 39-51.
- Bhumiratana, N., Adhikari, K., & Chambers, E. (2011). Evolution of sensory aroma attributes from coffee beans to brewed coffee. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2185-2192.
- Biehl, B., & Voigt, J. (1996). Biochemistry of chocolate flavour precursors. In *International Cocoa Conference, Salvador de Bahia, Brazil*.
- Biehl, B., Meyer, B., Crone, G., Pollmann, L., & Said, M. B. (1989). Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 48(2), 189-208.
- Biehl, B., Meyer, B., Said, M. B., & Samarakoddy, R. J. (1990). Bean spreading: a method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51(1), 35-45.
- Bigot, C., Meile, J. C., Kapitan, A., & Montet, D. (2015). Discriminating organic and conventional foods by analysis of their microbial ecology: An application on fruits. *Food Control*, 48, 123-129.
- Blanc, M., Pittet, R., Munoz-Box, R., Viani, R. (1998). Behavior of Ochratoxin A during green coffee roasting and soluble soluble coffee manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 673-75.

- Bonaparte, A., Alikhani, Z., Madramootoo, C. A., & Raghavan, V. (1998). Some quality characteristics of solar-dried cocoa beans in St Lucia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(4), 553-558.
- Bonilla-Hermosa, V. A., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. *Bioresource Technology*, 166, 142-150.
- Bonnarme, P., Amarita, F., Chambellon, E., Semon, E., Spinnler, H. E., & Yvon, M. (2004). Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS microbiology letters*, 236(1), 85-90.
- Bouet, C. (1977). Bettié et Akiékrou: Etude comparée de deux terroirs en zone forestière ivoirienne (No. 13). IRD Edition, Paris.
- Branger, A., Richer, M. M., Roustel, S. (2007). Alimentation, sécurité et contrôle microbiologique. Editions : Martine Poillot, Dijon.
- Braudeau, J. (1969). Le cacaoyer. Editions : Maisonneuve et Larose. Paris.
- Bucheli, P., & Taniwaki, M. H. (2002). Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives & Contaminants*, 19(7), 655-665.
- Calderbank, J., & Hammond, J. R. M. (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52, 84-90
- Callejón, R. M., Tesfaye, W., Torija, M. J., Mas, A., Troncoso, A. M., & Morales, M. L. (2009). Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. *Food Chemistry*, 113(4), 1252-1259.
- Cambrai, A., Marcic, C., Morville, S., Sae Houer, P., Bindler, F., & Marchioni, E. (2010). Differentiation of chocolates according to the cocoa's geographical origin using chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1478-1483.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809-1824.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278-288.

- Chanakya, H. N., & De Alwis, A. A. P. (2004). Environmental issues and management in primary coffee processing. *Process safety and environmental protection*, 82(4), 291-300.
- Chang, S. S. (1989). Food flavors. In Marsili, R. (Ed.). *Flavor, fragrance and odor analysis*. Marcel Dekker, Inc, New York, USA.
- Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E. and Spotti, E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorimetric method. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 575-581.
- Clapperton, J. F. (1994). A review of research to identify the origins of cocoa flavour characteristics. *Cocoa Growers Bull*, 48, 7-16.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2002). An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 12(5), 407-411.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2000). Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction–temperature gradient gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2), 126-129.
- Codex Alimentarius Commission (1999). Codex Alimentarius. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.
- Cogan, T. M., O'Dowd, M., & Mellerick, D. (1981). Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 1-8.
- Coltro, L., Mourad, A., Oliveira, P., Baddini, J., & Kletecke, R. (2006). Environmental Profile of Brazilian Green Coffee (6 pp). *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 11(1), 16-21.
- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., & Palmer, L. M. (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nature Biotechnology*, 3(9), 817-820.
- Cook, L. R. (1982). Chocolate production and use. (1982). E. H. Meursing (Rev.). Harcourt Brace Javanovich, Inc. New York, pp. 185-187.
- Counet, C., & Collin, S. (2003). Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6816-6822.

- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., & Collin, S. (2004). Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6243-6249.
- Cozzolino, D. (2014). An overview of the use of infrared spectroscopy and chemometrics in authenticity and traceability of cereals. *Food Research International*, 60, 262-265.
- Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S & Nielsen, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103-116.
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. and Schorr-Galindo S. (2009). Study of phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1),14-23.
- Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9(5), 774-783.
- Davies, C. G. A., & Labuza, T. P. (2000). The Maillard reaction application to confectionery products, University of Minnesota, pp. 35–66.
- De Castro, R. D., & Marraccini, P. (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 175-199.
- De Conti, R., Rodrigues, J. A. R., & Moran, P. J. (2001). Biocatálise: avanços recentes. *Quim. Nova*, 24(5), 672-675.
- De Long, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5685-5689.
- de Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., de Almeida, E. G., da Silva Coelho, I., & Schwan, R. F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 121-133.
- de Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Lara, J. M. R. A., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60-66.

- De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., & Camu, N. (2010). The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: novel applications*, 301-325.
- Demyttenaere, J. C., Van Belleghem, K., & De Kimpe, N. (2001). Biotransformation of (R)-(+)-and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*, 57(2), 199-208.
- Despréaux, D. (1998). In : Pontillon J. (ed.). *Cacao et chocolat. Production, utilisation, caractéristiques*. Paris : Technique et documentation Lavoisier, pp.43-93. (Collection sciences et techniques agro-alimentaires).
- Dhaliwal, S. S., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K., Nanda, D., Kumar, D., & Uppal, S. K. (2011). Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. *Bioresource Technology*, 102(10), 5968-5975.
- Dias, D. R., Schwan, R. F., & Lima, L. C. O. (2003). Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(3), 342-350.
- Dimick, P. S., & Hoskin, J. C. (1999). The chemistry of flavour development in chocolate. Industrial chocolate manufacture and use Beckett ST, editor. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 137-51.
- Djedjro, C. A., Assidjo, N. E., & Yao, B. (2008). Effet des dispositifs de séchage à l'air libre sur la qualité des fèves de cacao bord champ. *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologie*, 11, 45-48.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Mirleau, F. L., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S & Roussos, S. (2011). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17(6), 267-272.
- Doyle, M. P., Beuchat L. R., Montville T. J. (2001). 2nd Eds. Cocoa and coffee. *Food Microbiology*, pp: 720–733.
- Ducki, S., Miralles-Garcia, J., Zumbé, A., Tornero, A., & Storey, D. M. (2008). Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 74(5), 1166-1174.
- Duetz, W. A., Bouwmeester, H., Van Beilen, J. B., & Witholt, B. (2003). Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(4), 269-277.
- Durand, N. (2012). Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes. Thèse, Université de Montpellier II.

- Edwards, R. A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D. M & Rohwer, F. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, 7(1), 57.
- El Sheikha, A. F. (2010). Determination of the geographical origin of fruits by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: an application to Shea tree fruits. *Journal of Life Sciences*, 4(6), 9-15.
- El Sheikha, A. F., & Montet, D. (2011). Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungi communities by PCR-DGGE: an application to Physalis fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits*, 66(02), 79-89.
- El Sheikha, A. F., Bouvet, J. M., & Montet, D. (2011). Biological bar code for determining the geographical origin of fruits using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: an application to Shea tree fruits. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 3(1), 40-47.
- El Sheikha, E., Farag, A., Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D. D., Loiseau, G., & Montet, D. (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt. *Yeast*, 26(10), 567-573.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 297-314.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., & Coppola, S. (2001). The potential of a polyphasic PCR-DGGE Approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4), 610-617.
- European Commission, EU Regulation, No. 178/2002 of the European Parliament and the Council of 28 January 2002. Official Journal of the European Communities.
- Evangelista, S. R., Silva, C. F., da Cruz Miguel, M. G. P., de Souza Cordeiro, C., Pinheiro, A. C. M., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61, 183-195.
- Feng, J., Fu, Z., Wang, Z., Xu, M., & Zhang, X. (2013). Development and evaluation on a RFID-based traceability system for cattle/beef quality safety in China. *Food Control*, 31(2), 314-325.

- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4117-4120.
- Frauendorfer, F., & Schieberle, P. (2006). Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5521-5529.
- Frauendorfer, F., & Schieberle, P. (2008). Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (21), 10244-10251.
- Freitas, A. C., & Mosca, A. I. (1999). Coffee geographic origin—an aid to coffee differentiation. *Food Research International*, 32(8), 565-573.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., & van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1), 1-15.
- Gimeno, A. (2000). Micotoxinas, introduction. XVII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura. <http://www.engormix.com>.
- Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J. P., & Schorr-Galindo, S. (2007). Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3), 289-296.
- Granvogl, M., Bugar, S., & Schieberle, P. (2006). Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems: new insights into pathways of the Strecker reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1730-1739.
- Groot, M. N. N., & de Bont, J. A. (1998). Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3009-3013.
- Groot, M. N. N., & de Bont, J. A. (1999). Involvement of manganese in conversion of phenylalanine to benzaldehyde by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5590-5593.
- Guehi, S. T., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D. K., & Zahouli, G. I. B. (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(3), 163-171.

- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., & Meile, J. C. (2015). Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117-122.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- Head, I. M., Saunders, J. R., & Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35(1), 1-21.
- Healy, F. G., Ray, R. M., Aldrich, H. C., Wilkie, A. C., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 667-674.
- Heenan, C. N., Shaw, K. J., Pitt, J. I. (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*, 1, 67 – 72.
- Heilman, W., Rehfeldt A. G., & Rotzoll, F. (1999), Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *European Food Research Technology*, 209(3-4), 297-300.
- Hesham, A. E. L., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, J., Lv, W., & Yang, M. (2006). Isolation and identification of a yeast strain capable of degrading four and five ring aromatic hydrocarbons. *Annals of Microbiology*, 56(2), 109-112.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., & De Vos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, 26(3), 247-259.
- Hicks, P. A. (2001). Postharvest processing and quality assurance for speciality/organic coffee products. *The first Asian regional round-table on sustainable, organic and speciality coffee production, processing and marketing*, 26-28.
- Hii, C. L., Law, C. L., Cloke, M., & Suzannah, S. (2009). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering*, 102(2), 153-161.
- Ho, V., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72-87.
- Hobbs, J. E. (1996). A transaction cost analysis of quality, traceability and animal welfare issues in UK beef retailing. *British Food Journal*, 98(6), 16-26.

- Holloway, P., & Subden, R. E. (1991). Volatile metabolites produced in a Riesling must by wild yeast isolates. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(1), 57-59.
- Holm, C. S., Aston, J. W., & Douglas, K. (1993). The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(1), 65-71.
- Hong, I. H., Dang, J. F., Tsai, Y. H., Liu, C. S., Lee, W. T., Wang, M. L., & Chen, P. C. (2011). An RFID application in the food supply chain: A case study of convenience stores in Taiwan. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 119-126.
- Hurst, W. J., & Martin, R. A. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially contaminated cocoa beans using automated sample clean-up. *Journal of Chromatography A*, 810(1), 89-94.
- Ibekwe, A. M., Papiernik, S. K., Gan, J., Yates, S. R., Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2001). Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3245-3257.
- ICCO: International cocoa organization. (2014). The world cocoa economy, current status, challenges and prospects. (http://unctad.org/meetings/en/Presentation/SUC_MEM2014_09042014_ICCO.pdf)
- ICO Annual Review. (2014). International coffee organization. (www.ico.org)
- Jacquet, M., Vincent, J. C., Halm, J., Lotode, R. (1980). Le séchage artificiel des fèves de cacao. *Cafe Cacao Thé*, 24, 43-56
- Janse, I., Bok, J., & Zwart, G. (2004). A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 57(2), 279-281.
- Janssens, L., De Pooter, H. L., Schamp, N. M., & Vandamme, E. J. (1992). Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, 27(4), 195-215.
- Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2003). Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 285-295.
- Jinap, S., Rosli, W. W., Russly, A. R., & Nordin, L. M. (1998). Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 441-448.
- Jinap, S., Thien, J., & Yap, T. N. (1994). Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(1), 67-75.

- Joosten, H. M. L. J., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., & Bucheli, P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1), 39-44.
- Jorgensen, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 15(5), 550–554.
- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., & Wormald, P. J. (2006). An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 65(1), 38-48.
- Kashima, Y., Iijima, M., Nakano, T., Tayama, K., Koizumi, Y., Udaka, S., & Yanagida, F. (2000). Role of intracellular esterases in the production of esters by *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(1), 81-83.
- Kashima, Y., Iijima, M., Okamoto, A., Koizumi, Y., Udaka, S., & Yanagida, F. (1998). Purification and characterization of intracellular esterases related to ethylacetate formation in *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(6), 584-588.
- Kattenberg, H. R., Kemmink, A. (1993). The Ñavor of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. In: Food Flavors, Ingredients and Composition, Ed Charalambous G. Elsevier Science, Netherlands, pp 1-22.
- Kaur, U., Oberoi, H. S., Bhargav, V. K., Sharma-Shivappa, R., & Dhaliwal, S. S. (2012). Ethanol production from alkali-and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 219-226.
- Kédjébo, K. B. D., Guehi, T. S., Brou, D. K., Durand, N., Aguilar, P., Fontana-Tachon, A., Montet, M. (2015). Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin A in cocoa beans sourced from Côte d'Ivoire. Soumit dans "World Mycotoxin Journal ».
- Kempler, G. M. (1983). Production of flavor compounds by microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 29, 29-51.
- Kennedy, A. J. (1995). Cacao *Theobroma cacao* (Sterculiaceae). In: Longman (eds), London. *Evolution of Crops*. pp: 472-475.
- Khot, P. D., Ko, D. L., & Fredricks, D. N. (2009). Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1559-1565.
- Klein, N., Maillard, M. B., Thierry, A., & Lortal, S. (2001). Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 404-411.

- Kosuge, T., Zenda, H., Tsuji, K., Yamamoto, T., & Narita, H. (1971). Studies on Flavor Components of Foodstuffs: Part I Distribution of Tetramethylpyrazine in Fermented Foodstuffs. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(5), 693-696.
- Kouakou, B. J., Irie, B. Z., Dick, E., Nemlin, G., & Bomisso, L. E. (2013). Caractérisation des techniques de séchage du cacao dans les principales zones de production en Côte d'Ivoire et détermination de leur influence sur la qualité des fèves commercialisées. *Journal of Applied Biosciences*, 64(1), 4797-4812.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W. I. E. T. S. E., Prosser, J. I., Embley, T. M., & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1489-1497.
- Kresnowati, M. P., Suryani, L., & Affifah, M. (2013). Improvement of Cocoa beans fermentation by LAB starter addition. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(4), 274-278.
- Krysiak, W. (2006). Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 449-453.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331-371.
- Lagunes-Gálvez, S. (2002). Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao. DEA. Ecole Doctorale Science et Procédé et Biologiques et Industriels. Université de Montpellier II.
- Lagunes-Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124-130.
- Lainé, K. (2001). Survey of farming practices on farms in Côte d'Ivoire e Field study. *Development*, 1, 1-28.
- Lambard, C. (2003). « Le café de la terre à la tasse ». Centre de Caféologie. Bordeaux (France).
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. *Journal South African Society for Enology & Viticulture*, 21, 97-129.
- Larroche, C., Besson, I., & Gros, J. B. (1999). High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochemistry*, 34(6), 667-674.

- Le Nguyen, D. D. (2008). Détermination de l'origine géographique des poissons par l'obtention de l'empreinte génétique de leur communauté bactérienne par PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Thèse, Montpellier II.
- Le Nguyen, D. D., Gemrot, E., Loiseau, G., & Montet, D. (2008). Determination of citrus fruit origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: an application to clementine from Morocco and Spain. *Fruits*, 63(02), 75-84.
- Le Nguyen, D. D., Ngoc, H. H., Dijoux, D., Loiseau, G., & Montet, D. (2008). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on Pangasius fish from Viet Nam. *Food Control*, 19(5), 454-460.
- Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Vives-Rego, J., Muyzer, G., ... & Stackebrandt, E. (1999). Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology*, 19(3), 255-267.
- Lee, S., Villa, K., & Patino, H. (1995). Yeast strain development for enhanced production of desirable alcohols/esters in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53(4), 153-156.
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28(3), 457-464.
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708-7716.
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30(2), 379-392.
- Leite, A. M. O., Mayo, B., Rachid, C. T. C. C., Peixoto, R. S., Silva, J. T., Paschoalin, V. M. F., & Delgado, S. (2012). Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*, 31(2), 215-221.
- Lerman, L. S., Fischer, S. G., Hurley, I., Silverstein, K., & Lumelsky, N. (1984). Sequence-determined DNA separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13(1), 399-423.
- Li, M., Zhou, M., Adamowicz, E., & Basarab, J. A. (2012). Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis. *Veterinary Microbiology*, 155(1), 72-80.

- Liendo, R., Padilla, F. C., & Quintana, A. (1997). Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L. *Food Research International*, 30(9), 727-731.
- Liu, Y., Zhang, S., Yong, Y. C., Ji, Z., Ma, X., Xu, Z., & Chen, S. (2011a). Efficient production of acetoin by the newly isolated *Bacillus licheniformis* strain MEL09. *Process Biochemistry*, 46(1), 390-394.
- Liu, Z., Qin, J., Gao, C., Hua, D., Ma, C., Li, L., ... & Xu, P. (2011b). Production of (2S, 3S)-2, 3-butanediol and (3S)-acetoin from glucose using resting cells of *Klebsiella pneumonia* and *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 102(22), 10741-10744.
- Lockhart, E. E. (1957). *Chemistry of coffee*. Coffee Brewing Institute. Inc. Publication n° 25, 20 pp.
- Lopez, A., & Quesnel, V. (1974). The contribution of sulphur compounds to chocolate aroma. In *Proceedings of the 1st International Congress on cocoa and chocolate research, Munich* (pp. 92-104).
- Löser, C., Urit, T., Stukert, A., & Bley, T. (2013). Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 17-23.
- Lucena-Padrós, H., Jiménez, E., Maldonado-Barragán, A., Rodríguez, J. M., & Ruiz-Barba, J. L. (2015). PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity in Spanish-style green table-olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 47-53.
- Luna, F., Crouzillat, D., Cirou, L., & Bucheli, P. (2002). Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(12), 3527-3532.
- Mahattanatawee, K., Goodner, K. L., & Baldwin, E. A. (2005). Volatile constituents and character impact compounds of selected Florida's tropical fruit. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 118, 414-418
- Mantere-Alhonen, S. (1995). *Propionibacteria* used as probiotics-A review. *Le Lait*, 75(4-5), 447-452.
- Maraval, I. (2005). Influence des conditions climatiques et fermentaires sur l'arôme du cacao. DEA Science des Aliments. Université Montpellier II.
- Masoud, W., Bjørg Cesar, L., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21(7), 549-556.
- Masoud, W., Poll, L., & Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22(14), 1133-1142.

- Matsutani, M., Nishikura, M., Saichana, N., Hatano, T., Masud-Tippayasak, U., Theergool, G & Matsushita, K. (2013). Adaptive mutation of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 enhances acetic acid fermentation ability at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 165(2), 109-119.
- Mazzafera, P. (2002). Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Scientia Agricola*, 59(4), 815-821.
- McAuliffe, L., Ellis, R. J., Lawes, J. R., Ayling, R. D., & Nicholas, R. A. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*, 54(8), 731-739.
- Meyer, B., Biehl, B., Said, M. B., & Samarakoddy, R. J. (1989). Post-harvest pod storage: A method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 48(3), 285-304.
- Michon, A. L., Jumas-Bilak, E., Imbert, A., Aleyrangues, L., Counil, F., Chiron, R., & Marchandin, H. (2012). Intragenomic and intraspecific heterogeneity of the 16S rRNA gene in seven bacterial species from the respiratory tract of cystic fibrosis patients assessed by PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis. *Pathologie Biologie*, 60(3), 30-35.
- Mikami, Y. (1988). Microbial conversion of terpenoids. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6(1), 271-320.
- Miraglia MA, De Dominicis C, Corneli BS, Cava E, Menghetti E, Miraglia E. 1995. Ochratoxin A levels in human milk and related food samples: an exposure assessment. *Nat Tox* 3:436–44.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 439–445
- Moens, F., Lefeber, T., & De Vuyst, L. (2014). Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1848-1857.
- Mohr, W. (1958). Studies on cocoa aroma with special emphasis on the conching of chocolate masses. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 60, 661-669.
- Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., & Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 675-687.
- Moore, P. B. (1998). The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular structure*, 27(1), 35-58.
- Mossu, G. 1990. Le cacaoyer : le technicien d'agriculture tropicale. Païs, Francia, Institut de Recherches de Cafe et du Cacao.

- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Guyot, B., Tondje, P.R., Fontana-Tachon, A. and Guiraud, J.P., (2008). Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology* 121(2), 234-241.
- Musters, W., Boon, K., Van der Sande, C. A., Van Heerikhuizen, H., & Planta, R. J. (1990). Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *The EMBO journal*, 9(12), 3989.
- Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Treimo, J., & Langsrud, T. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 201-210.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695-700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164(3), 165-172.
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13(9), 3131-3145.
- Nakae, T., & Elliott, J. A. (1965). Production of Volatile Fatty Acids by Some Lactic Acid Bacteria. II. Selective Formation of Volatile Fatty Acids by Degradation of Amino Acids. *Journal of Dairy Science*, 48(3), 293-299.
- Nganou, D. N., Durand, N., Tatsadjieu, N. L., Meile, J. C., El-Sheikha, A. F., Montet, D., & Mbufung, C. M. (2012). Determination of coffee origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: application to the Cameroonian coffee. *International Journal of Biosciences*, 2(5), 18-30.
- Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R & Guillot, J. (2007). Evaluation of fungal aerosols using temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 86-95.
- Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22(4), 271-284.

- Nielsen, D. S., Snitkjaer, P., & van den Berg, F. (2008). Investigating the fermentation of cocoa by correlating denaturing gradient gel electrophoresis profiles and near infrared spectra. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 133-140.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168-186.
- Nijssen, L. (1996). *Volatile compounds in food: qualitative and quantitative data*. TNO Nutrition and Food Research Institute.
- OCDE 2007: Atlas régional de l'Afrique de l'ouest (www.atlas-ouestafrique.org)
- Ongo, E., Falasconi, M., Sberveglieri, G., Antonelli, A., Montevecchi, G., Sberveglieri, V., ... & Sevilla III, F. (2012). Chemometric discrimination of Philippine civet coffee using electronic nose and gas chromatography mass spectrometry. *Procedia Engineering*, 47, 977-980.
- Onken, J., & Berger, R. G. (1999). Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, 69(2), 163-168.
- Owusu, M., Petersen, M. A., & Heimdal, H. (2012). Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(5), 446-456.
- Paarlberg, R. L. (2002). The real threat to GM crops in poor countries: consumer and policy resistance to GM foods in rich countries. *Food Policy*, 27(3), 247-250.
- Palmer, C. M. (1996). A week that shook the meat industry: the effects on the UK beef industry of the BSE crisis. *British Food Journal*, 98(11), 17-25.
- Palys, T., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1145-1156.
- Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G., & De Vuyst, L. (2011a). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28(5), 964-973.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35(2), 73-85.

- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2011b). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(7), 1326-1338.
- Pardo, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Sanchis, V. (2005a). Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. *Journal of Food Protection*, 68 (1), 133-138.
- Pardo, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2005b). Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *A. ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology*, 22(5), 383-389.
- Pascal, R. G., Glories, Y., Denis, D., & Maujean, A. 2006. Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Second edition. England: John Wiley and Sons, p. 59.
- Passos, F. M., Silva, D. O., Lopez, A., Ferrieira, C. L., & Guimaraes, W. V. (1984). Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, 49(1), 205-208.
- Paul, S. D., & Jeanne, M. H. (1981). Chemico-physical aspects of chocolate processing—a review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 14(4), 269-282.
- Peri, C. (2002). Rintracciabilità della filiera dei prodotti agroalimentari: significato, metodi e strumenti. *Rintracciabilità di filiera per una provincia trasparente Indagine sulla filiera ortofrutticola, Atti del convegno, Cuneo*, 6.
- Perini, M., Camin, F., Bontempo, L., Rossmann, A., & Piasentier, E. (2009). Multielement (H, C, N, O, S) stable isotope characteristics of lamb meat from different Italian regions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(16), 2573-2585.
- Perraud-Gaime, I. (1995). *Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café*. Thèse, Université de Montpellier II.
- Peynaud, E. (1956). Sur la formation de l'acétate d'éthyle par les levures du vin. *Industries Agricoles Alimentaires*, 73, 253-257.
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Castegnaro, M. (1999). L'ochratoxine A. In : Pfohl-Leszkowicz, A. (ed.), *Les Mycotoxines dans l'alimentation: évolution et gestion des risques*. Lavoisier, Paris, France, pp. 249-277.

- Pickenhagen, W. (1999). Flavor chemistry—the last 30 years. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. R. Teranishi, E. L. Wick, I. Hornstein (Eds.), Kluwer Academic/Plenum, NY, USA, pp. 75.
- Pittet, A., Tornare, D., Huggett, A. and Viani, R. (1996). Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (11), 3564-3569.
- Plata, C., Millan, C., Mauricio, J. C., & Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20(2), 217-224.
- Plata, M. D. C., Mauricio, J. C., Millán, C., & Ortega, J. (1998). In vitro specific activity of alcohol acetyltransferase and esterase in two flor yeast strains during biological aging of Sherry wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(4), 369-374.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.
- Queyrel, A. (2005). Ferments et probiotiques à l'école du risque. *Process*, (1212), 78-80.
- Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology advances*, 26(6), 576-590.
- Ramli, N., Hassan, O., Said, M., Samsudin, W., & Idris, N. A. (2006). Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(3), 280-298.
- Ramos A. J., Labernia N., Marín S., Sanchis V. & Magan N. (1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*, 44(11), 133-140.
- Regattieri, A., Gamberi, M., & Manzini, R. (2007). Traceability of food products: General framework and experimental evidence. *Journal of Food Engineering*, 81(2), 347-356.
- Reineccius G. 2006. Flavor chemistry and technology. Boca Raton, FL, USA: CRC Press
- Reineccius, G. A., Andersen, D. A., Kavanagh, T. E., & Keeney, P. G. (1972). Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2), 199-202.
- Rodarte, M. P., Dias, D. R., Vilela, D. M., & Schwan, R. F. (2011). Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3), 457-464.

- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., & Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1), 277-288.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250-258.
- Rojas, V., Gil, J. V., Manzanares, P., Gavara, R., Piñaga, F., & Flors, A. (2002). Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolase activities in yeast extracts. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 224-230.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), 181-188.
- Romano, A., Gandolfi, R., Nitti, P., Rollini, M., & Molinari, F. (2002). Acetic acid bacteria as enantioselective biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(6), 235-240.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 541-545.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 309.
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., & Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 118(3), 213-218.
- Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomez, A., & Weiss, J. (2007). Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control*, 18(1), 33-39.
- Roszak, D. B., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian journal of microbiology*, 30(3), 334-338.
- Rottava, I., Toniazzo, G., Cortina, P. F., Martello, E., Grando, C. E., Lerin, L. A., ... & Oestreicher, E. G. (2010). Screening of microorganisms for bioconversion of (–) β -pinene and R-(+)-limonene to α -terpineol. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1128-1131.
- Saez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. E., & Sangorrín, M. (2011). Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28 (3), 503-509.

- Said, M. B., Jayawardena, M. P. G. S., Samarakoddy, R. J., & Perera, W. T. (1990). Preconditioning of fresh cocoa beans prior to fermentation to improve quality: a commercial approach. *Planter, Kuala Lumpur*, 66(772), 332-345.
- Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29(1), 167-187.
- Sarig, Y. (2003). Traceability of food products. *International Commission of Agricultural Engineering*, 5, 1682-1130.
- Schnermann, P., & Schieberle, P. (1997). Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 867-872.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205-221.
- Schwan, R. F., Cooper, R. M., & Wheals, A. E. (1997). Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(4), 234-244.
- Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9, 83-89.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B., & Uchiyama, H. (2002). Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5142-5150.
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647-656.
- Serra-Bonvehí Bonvehí, J. (2005). Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 221(1-2), 19-29.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G+ C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 232-236.
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25(8), 951-957.

- Silva, C. F., Schwan, R. F., Dias, Ê. S., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2), 251-260.
- Silvestri, G., Santarelli, S., Aquilanti, L., Beccaceci, A., Osimani, A., Tonucci, F., & Clementi, F. (2007). Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat science*, 77(3), 413-423.
- Simoneau, C., Hannaert, P., & Anklam, E. (1999). Detection and quantification of cocoa butter equivalents in chocolate model systems: analysis of triglyceride profiles by high resolution GC. *Food Chemistry*, 65(1), 111-116.
- Skaug MA. 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for Ochratoxin A. *Food Addit Contam* 16 (2), 75–8.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., ... & Berg, G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4742-4751.
- Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591-610.
- Soriano, J. M., Rico, H., Molto, J. C., & Manes, J. (2001). Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiology*, 18(2), 159-163.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846-849.
- Staley, J. T., & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology*, 39(1), 321-346.
- Stein, J. L., Marsh, T. L., Wu, K. Y., Shizuya, H., & DeLong, E. F. (1996). Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 591-599.
- Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., ... & Pretorius, I. S. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiology*, 26(2), 204-211.
- Taylor, A. J., & Linfoth, R. S. (Eds.). (2009). *Food Flavour Technology*. John Wiley & Sons.

- Ter Braak, C. J. (1986). Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67(5), 1167-1179.
- Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Jeannot, J. L., Dusart, G & de Buochberg, M. S. (2003). Identification d'espece et épidémiologie moléculaire des bactéries du genre *Ochrobactrum*. *Pathologie Biologie*, 51(1), 5-12.
- Thirumala-Devi, K., Mayo, M.A., Reddy, G., Tangni, E.K., Larondelle, Y. and Reddy, D.V., (2001). Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives and Contaminants*, 18, (9), 830-835.
- Thompson, S.S., Miller, K.B. and Lopez, A.S. (2001) Cocoa and coffee *In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J., Eds.), 2nd ed, pp. 721–733. ASM Press, Washington D.C., USA
- Tomlins, K. I., Baker, D. M., Daplyn, P., & Adomako, D. (1993). Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. *Food Chemistry*, 46(3), 257-263.
- Torres-Moreno, M., Torrecasana, E., Salas-Salvadó, J., & Blanch, C. (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry*, 166, 125-132.
- Trudgill, P. W. (1994). Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes. *In Biochemistry of Microbial Degradation*. Springer Netherlands. pp. 33-61.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24(2), 230-233.
- Van Elzakker, A., Van Zutphen, H. (1961). Studies on cocoa flavor by means of gas chromatography. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 115, 222-227.
- Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A & Siezen, R. J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12(2), 111-121.
- Van Praag, M., Stein, H. S., & Tibbetts, M. S. (1968). Steam volatile aroma constituents of roasted cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(6), 1005-1008.
- Varga, J., Kevei, F., Rinyu, F., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, (12), 4461-4464.
- Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F., & Buyer, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5), 371-380.

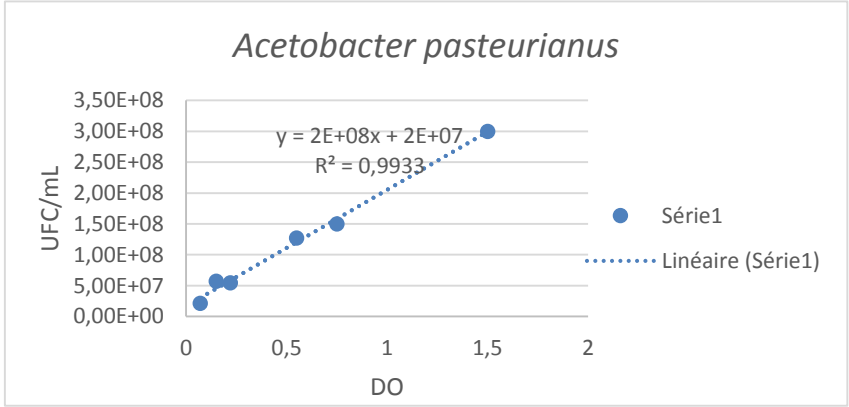
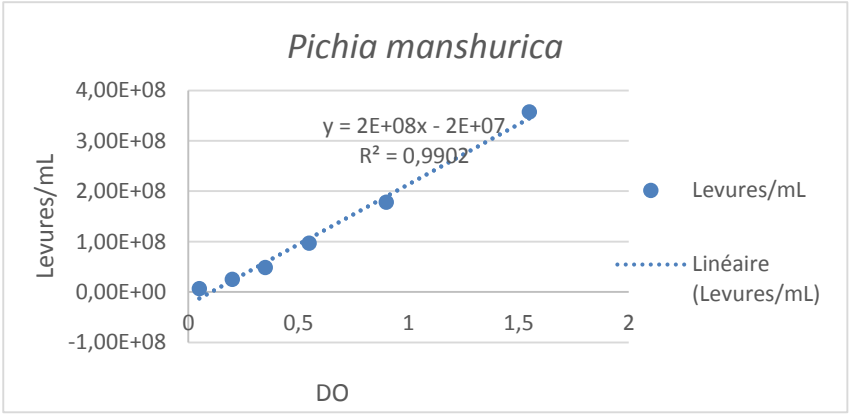
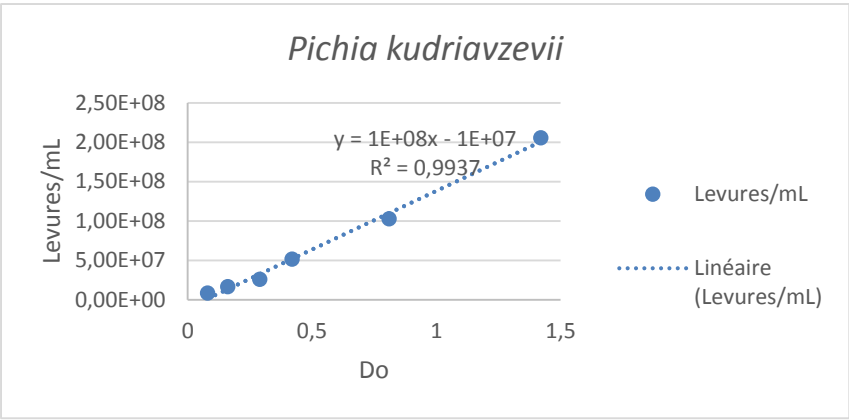
- Vega, F. E., Simpkins, A., Aime, M. C., Posada, F., Peterson, S. W., Rehner, S. A & Arnold, A. E. (2010). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3(3), 122-138.
- Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S., & Manzanares, P. (2009). Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 135(1), 68-74.
- Vilela, D. M., Pereira, G. V. D. M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128-1135.
- Voigt, J., Voigt, G., Heinrichs, H., Wrann, D., & Biehl, B. (1994). In vitro studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: the significance of endoprotease specificity. *Food Chemistry*, 51(1), 7-14.
- Wang, X., Li, D., & O'brien, C. (2009). Optimisation of traceability and operations planning: an integrated model for perishable food production. *International Journal of Production Research*, 47(11), 2865-2886.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 18, 315-322.
- WHO (World Health Organization) 1996. Evaluation of certain food additives and contaminants. 44th Report of JECFA, WHO Technical Report series 859, WHO, Geneva, Switzerland
- Wolf from, M. L., Kashimura, N., & Horton, D. (1974). Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids. Nonenzymic browning of dehydrated orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(5), 796-800.
- Wood, G.A.R. and Lass, R.A. (1985). Cocoa. 4th ed. Longman, New York.
- Wootton, A.E. (1963). The fermentation of coffee. *Kenya Coffee* (Kenya), 28: 239-249
- Xiao, Z., & Lu, J. R. (2014). Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review. *Biotechnology Advances*, 32(2), 492-503.
- Xiao, Z., & Xu, P. (2007). Acetoin metabolism in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(2), 127-140.
- Yoo, S. K., & Day, D. F. (2002). Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochemistry*, 37(7), 739-745.
- Yvon, M., & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11(4), 185-201.

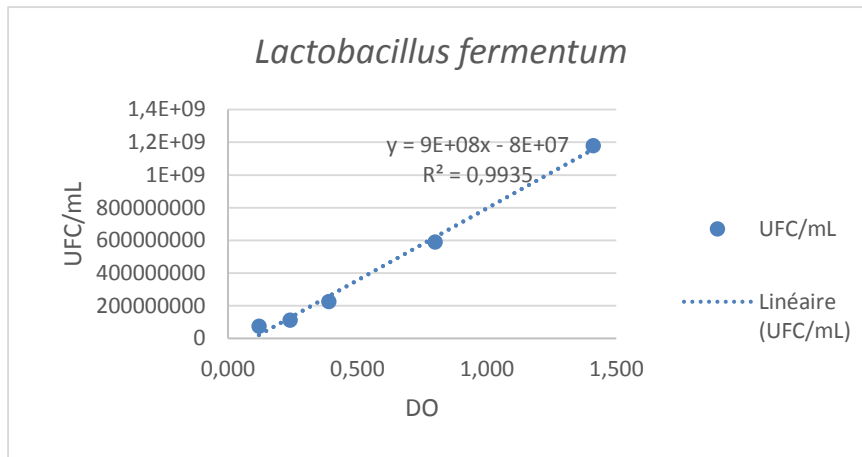
- Zahouli, G. I. B., Guehi, S. T., Fae, A. M., Ban-Koffi, L., & Nemlin, J. G. (2010). Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(4), 184-190.
- Zhao, Y., Zhang, B., Chen, G., Chen, A., Yang, S., & Ye, Z. (2014). Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability. *Food Chemistry*, 145, 300-305.
- Zigová, J., Šturdík, E., Vandák, D., & Schlosser, Š. (1999). Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Process Biochemistry*, 34(8), 835-843.

ANNEXES

Annexes

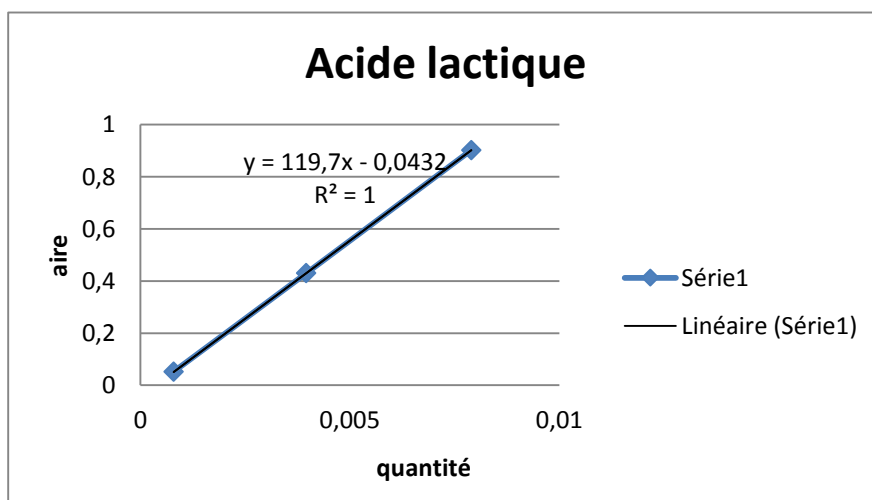
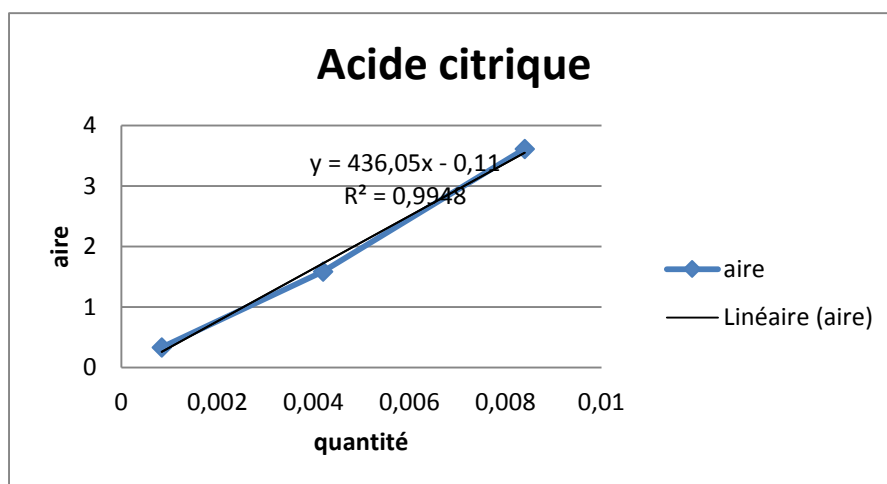
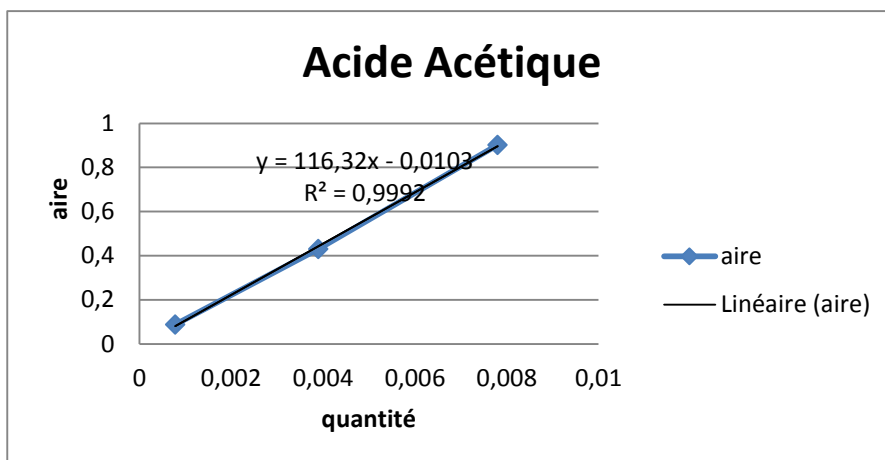
Annexe 1

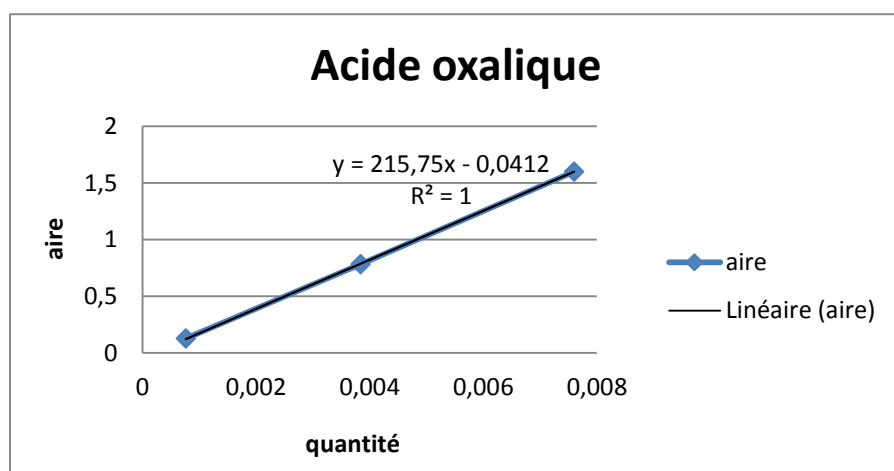
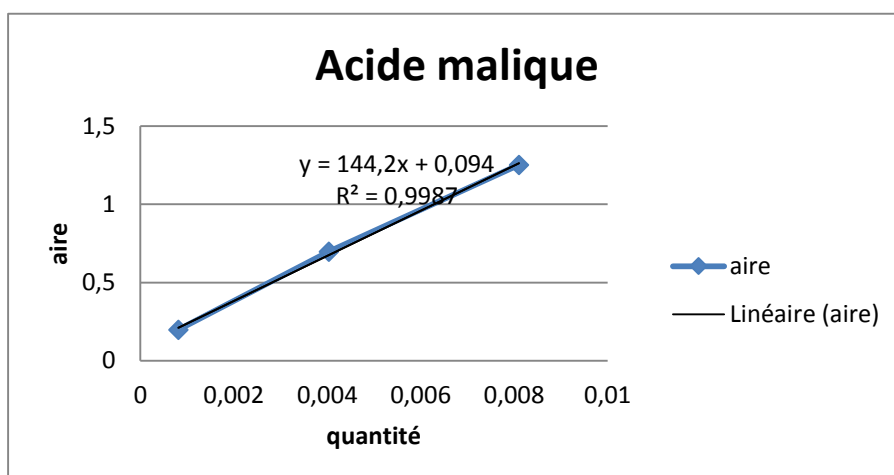




Graphe représentant les courbes de calibration des quatre souches

Annexe 2





Courbes d'étalonnage des acides organiques dosés



Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers



Yasmine Hamdouche ^{a,*}, Tagro Guehi ^b, Noel Durand ^a, Kra Brou Didier Kedjebo ^b,
Didier Montet ^a, Jean Christophe Meile ^a

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

^b Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Food Science and Technology, University of Nangui Abrogoua, Abidjan, Ivory Coast

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2013

Received in revised form

15 March 2014

Accepted 7 May 2014

Available online 2 June 2014

Keywords:

PCR-DGGE

Cocoa fermentation

Cocoa drying

Post-harvest

Bacterial

Yeast ecology

ABSTRACT

This study aimed to evaluate molecular microbial markers associated with cocoa fermentation and drying steps. The dynamics of microbial populations were analyzed during postharvest processing (fermentation and sun drying) of cocoa from Ivory Coast. The variations in bacterial and yeast communities structure were monitored by a molecular technique (PCR-DGGE) using 16S rRNA and 26S rRNA profiles. Dominant microbial species were determined by sequencing. Our results showed that treatments of cocoa generated great variations in the microbial ecology in terms of number of species detected. The bacterial ecology quickly underwent dramatical changes during the fermentation step after two days. The dominance of Enterobacteria was first observed and then accompanied by Lactic acid bacteria and at the latest stages by acetic acid bacteria. Furthermore, *Hanseniaspora opuntiae* yeast species predominated during cocoa bean fermentation and drying processes. In addition, two bacterial species were only identified during the drying step of fermented cocoa beans and are potential candidates for biological markers of this process.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Post harvest cocoa processing is a crucial aspect of cocoa production as it mostly determines the quality of cocoa beans. The key processing steps in producing the most desirably flavoured cocoa beans are fermentation, drying and roasting. Fermentation is generally carried out in a traditional practice following three processes in boxes, heaps and trays through a spontaneous four to six days fermentation process (De Vuyst, Lefeber, Papalexandratou, & Camu, 2010; Schwan & Wheals, 2004; Wood & Lass, 2001). Fermentation step begins with the growth of microorganisms which activities contribute to the degradation of the mucilaginous pulp surrounding the beans, and produces a range of metabolic end-products (alcohols, organic acids). The main phases of cocoa beans fermentation process are alcoholic fermentation by yeasts which convert the sugars from the pulp into ethanol. Lactic fermentation, which produces lactic acid from sugars, is mainly driven by lactic acid bacteria (LAB) and has to be avoided to obtain high quality cocoa. In the last phase of fermentation, acetic acid

bacteria (AAB) transform alcohol into acetic acid (Camu et al., 2007; Nielsen et al., 2007a; Schwan, Rose, & Board, 1995).

Following fermentation, the beans are either sundried or artificially dried (in regions where constant rainfall occurs), in order to reduce the moisture content from about 60% to about 7.5%. Drying must be carried out carefully to ensure that off-flavour did not develop. Drying should take place slowly. If the beans are dried too quickly some of the chemical reactions started in the fermentation process are not allowed to complete and the beans remain acidic, with a bitter flavour. However, if the drying is too slow, moulds and off flavours can develop (Fowler, Leheup, & Cordier, 1998; Thompson, Miller, & Lopez, 2001; Wood & Lass, 2001).

Microorganisms play a crucial role in the quality of cocoa during fermentation step (Nielsen et al., 2007b; Schwan et al., 1995, 1997). The influence of cocoa origin and fermentation practices in the farm on the evolution of cocoa bean fermentation processes has been investigated extensively and multiphasically (Camu et al., 2007, 2008; Garcia-Armisen et al., 2010; Lefeber, Gobert, Vrancken, Camu, & De Vuyst, 2010; Nielsen, Nielsen, & Van den Berg, 2008; Nielsen, Teniola, et al., 2007; Papalexandratou & De Vuyst, 2011; Papalexandratou, Camu, Falony, & De Vuyst, 2011; Papalexandratou, Falony, et al., 2011; Papalexandratou, Vrancken, De

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 61 57 28; fax: +33 4 67 61 44 33.

E-mail address: yasminehamdouche@gmail.com (Y. Hamdouche).

Bruyne, Vandamme, & De Vuyst, 2013). These studies helped to understand the impact of fermentation practices on the microbial succession during cocoa bean fermentations. However, little is known about the microbial communities, their dynamics and role in cocoa quality during the drying step.

In this present study, we analyzed both cocoa fermentation and drying steps in terms of microbial ecology (bacteria, yeast) in order to get an overview of the post-harvest processes and their impact on the microbial ecology of cocoa. To this end, we used the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method that provides a rapid and overall view of community structures (Ampe, Audrey, & Nadine, 2001; Ampe, Ben Omar, Moizan, Wachter, & Guyot, 1999; Ben Omar & Ampe, 2000; Cocolin, Manzano, Cantoni, & Comi, 2001; Ercolini, Moschetti, Blaiotta, & Coppola, 2001). This method was successfully employed for monitoring cocoa fermentation and to discriminate geographical origin of foods products such as fish (Le Nguyen, Ha, Dijoux, Loiseau, & Montet, 2008), fruits (El Sheikh, Bouvet, & Montet, 2011; El Sheikh et al., 2009) and coffee (Nganou Donkeng et al., 2012). In this way, we aim at define molecular markers that could be linked to cocoa quality at different steps during post-harvest processing.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Two hundred cocoa pods were harvested by traditional methods in Ivory Coast in March 2013. After opening of the pods, approximately 80 kg of beans surrounded by mucilage were fermented in a wooden box during 6 days (one batch was followed), mixed by hand at 48 and 96 h of fermentation, and then dried for 4 days. Cocoa beans samples (800 g) were collected during fermentation at 3 time intervals (2, 4 and 6 days). 6-days fermented cocoa beans were sun dried during 4 days. 200 g of cocoa beans were sampled at 3 time intervals (2, 3 and 4 days). Samples were collected with gloves and placed in sterile bags, put in a cooler box and sent immediately by plane to Montpellier (France) and analyzed immediately at Cirad laboratories. The transportation time from Ivory Coast to Cirad laboratories was about 24 h.

2.2. Total DNA extraction

DNA extraction from bacteria and yeast is based on the method of Ampe et al. (1999) and Leasing (2005). For each sample, DNA extraction was performed in duplicate. Ten grams of cocoa beans were put in Falcon tubes containing 10 mL of peptone water (Biomérieux) and mixed at room temperature for 30 min on a rotating wheel. Two millilitres of the resulting suspensions were mixed with 0.3 g of 0.5 mm diameter acid washed glass beads (Sigma–Aldrich) in Eppendorf tubes. The mixture was vortexed vigorously for 2 min in a bead beater instrument (Vortex Genie 2 SI-A256) then centrifuged at 12,000 g for 10 min. The pellet (containing microbial cells) was resuspended in 300 µL of breaking buffer [2% Triton X-100 (Prolabo); 1% sodium dodecyl sulphate (SDS, Sigma); 100 mM NaCl (Sigma); 100 mM Tris–HCl pH 8.0; 1 mM EDTA; pH 8.0 (Promega)]. Then, 100 µL TE (10 mM Tris–HCl; pH 8.0, Promega) were added. 100 µL of lysosyme solution (25 mg mL⁻¹, Eurobio) were added and incubated at room temperature for 5 min and 100 µL of proteinase K solution (20 mg mL⁻¹, Eurobio) were added and incubated at 42 °C for 20 min. Then 50 µL of 20% SDS were added and incubated at 42 °C for 10 min, 400 µL of mixed alkyl-trimethyl ammonium bromide (MATAB, Sigma) were added followed by an incubation at 65 °C for 10 min. 700 µL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1 v/v/v, Carlo Erba) were added and the tubes were centrifuged at 12,000 g for 15 min. The aqueous

layer was transferred to a new tube, and a second phenol–chloroform extraction was performed. 600 µL of Chloroform/isoamyl alcohol (24/1) was added followed by a 12,000 g centrifugation for 10 min. The aqueous phase was collected and 0.1 volume of sodium acetate (3 M, pH 5) and an equal volume of ice-cold isopropanol were added and further stored at –20 °C overnight. The next day, the tubes were centrifuged at 12,000 g for 30 min, then the supernatant was discarded, DNA pellets were washed with 500 µL 70% ethanol, after 5 min of centrifugation, the DNA pellets were air dried for 1–2 h. Finally, the DNA was re-suspended in 100 µL of molecular water and stored at –20 °C until analyses.

The quantity and purity of extracted DNA were verified by UV spectrophotometer (Biospec-Nano), and by electrophoresis through a 0.8% agarose gel in 1× TAE buffer (containing 40 mM Tris–HCl, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 1.0 mM Na₂-EDTA; Eppendorf) with a 1 Kb molecular weight ladder (Promega). After running at 100 V for 30 min, the gels were stained for 15 min in an ethidium bromide solution (50 µg mL⁻¹; Promega), rinsed for 5 min in distilled water, then observed and photographed on a UV transilluminator, using a black and white CCD camera (Scion Company) and Gel Smart 7.3 system software (Clara Vision).

2.3. PCR amplification of extracted DNA

A 160 bp fragment of The V3 variable region of bacterial 16S rDNA was amplified using gc-338f (5'-GCG CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCA TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3', Sigma) and 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3', Sigma) primers (Ampe et al., 1999; Leasing, 2005; øvreas et al., 1997). A 40-pb GC-clamp was added to the forward primer in order to ensure that the fragment of DNA will remain partially double stranded and that the region screened is in the lowest melting domain (Sheffield, Beck, Stone, & Myers, 1989). Each mixture (final volume 50 µL) contained about 100 ng of extracted DNA, all primers at 0.2 µM, deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) at 200 µM, 1.5 mM MgCl₂, 5 µL of 10× of reaction MgCl₂-free Taq buffer and 1.25 U of a-Taq polymerase (Promega). In order to increase the specificity of amplification and to reduce the formation of spurious by-products, DNA was amplified in a “touchdown” PCR as follow: 94 °C for 3 min, followed by 10 touchdown cycles of denaturation at 94 °C for 1 min annealing at 65 °C (1st cycle) to 55 °C (10th cycle) for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, then 25 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. The extension step was increased to 10 min in the last cycle.

For Yeasts DNA PCR amplification: a 250 bp fragment of D1/D2 region of the 26S rDNA gene was amplified using eukaryotic universal primers gc-NL1 (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3') and the reverse primer LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3', Sigma) (Cocolin, Bisson, & Mills, 2000; Kurtzman & Robnett, 1998). A 30-pb GC-clamp was added to the forward primer. The mixture final volume is adjusted to 50 µL, it contained about 100 ng of DNA, and all reagents as described above. The amplification started by one cycle at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 1 min, 52 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 10 min.

2.4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) analysis

PCR products were analyzed by DGGE, by using a Bio-Rad Dcode universal mutation detection system (Bio-) using the procedure described by Muyzer, De Waal, and Uitterlinden (1993) and improved by Leasing (2005). PCR amplicons were loaded into 8%

(w/v) polyacrylamide gels (acrylamide/N,N'-methylene bisacrylamide, 37.5/1, Promega) in 1× TAE buffer.

Electrophoresis experiments were performed at 60 °C using a denaturing gradient ranging from 30 to 60% (100% corresponded to 7 M urea (Promega) and 40% (v/v) formamide, Promega). The gel was electrophoresed at 20 V for 10 min and then at 80 V for 12 h.

After electrophoresis the gel was stained for 30 min in an ethidium bromide solution (50 µg mL⁻¹ in 1× TAE buffer) and rinsed for 20 min in distilled water and then photographed as described above.

2.4.1. Purification and identification of DGGE bands

Detected bands were cut from the DGGE gel with a sterile scalpel. DNA of each band was then eluted in 100 µL TE buffer at 4 °C overnight, followed by one hour at 37 °C. 100 µL of DNA eluted from each band was purified by adding 300 µL of TE, 40 µL of sodium acetate (3 M, pH 5) and 1 mL of absolute ethanol and incubated at -20 °C for 30 min, then centrifuged 12,000 g for 15 min. The supernatant was discarded, DNA pellets were washed with 500 µL 70% ethanol and after 5 min of centrifugation, the DNA pellets were air dried for 1–2 h. Finally, the DNA was re-suspended in 50 µL of molecular water and stored at 4 °C. Bacterial and yeast purified DNA were PCR-amplified using 338f and NL-1 (without GC clamp) and 518r and LS-2 primers respectively. PCR amplicons were sent for sequencing at GATC Biotech (Germany).

Sequences were compared to the GenBank database using the BLAST program (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Sequences with a percentage of identity of 97% or greater were considered to belong to the same species (Stackebrandt and Goebel, 1994; Palys, Nakamura, & Cocha, 1997).

3. Results

3.1. Analysis of bacterial communities associated to cocoa beans during wooden boxes fermentation and sun drying

DGGE profiles were generated from bacterial DNA extracted at different steps during cocoa bean fermentation and drying. Two bands were detected on fresh cocoa beans, one of them was identified as Chloroplast DNA (Q), and a second one was not identified (P) (Fig. 1). Both bands could be detected throughout the process. In all cases, these two bands were not informative. After 2 days of fermentation, we observed the presence of a high number (13) of bacterial species. Most of them belong to the Enterobacteriaceae family (9 species); *Shigella dysenteriae* (V), *Kluyvera cryocrescens* (N), *Escherichia albertii* (I), *Escherichia sp* (U), *Escherichia fergusonii* (L), *Enterobacter sp* (R), *Pantoea vagans* (T), *Tatumella terrea* (O) and *Budvicia sp* (M). *Lactobacillus plantarum* (A and M1) was present during all the fermentation process. Two bands were revealed at 2 days and identified as AAB of the *Acetobacter* gender (*Acetobacter pasteurianus* (W) and *Acetobacter sp* (X)), (Fig. 1).

After 4 days of fermentation, several bands present at 2 days were detected such as *K. cryocrescens* (N), *T. terrea* (O) and *Budvicia sp* (M). The other enterobacterial species found on 2 days fermented cocoa beans were no longer detected at 4 days of fermentation. 2 new bands corresponding to AAB species were detected (*Acetobacter cervisiae* (J) and *Acetobacter nitrogenifigens* (D)) together with the two above mentioned AAB species identified at day 2. In addition to the bacterial species detected on 4-day fermented beans, *Lactobacillus fermentum* (C), *Weeksella sp* (E), *Enterobacter cloacae* (F) and *Acetobacter lovaniensis* (H) were detected in 6-day fermented beans. All of the bands corresponding to AAB species remained detectable through the whole fermentation process.

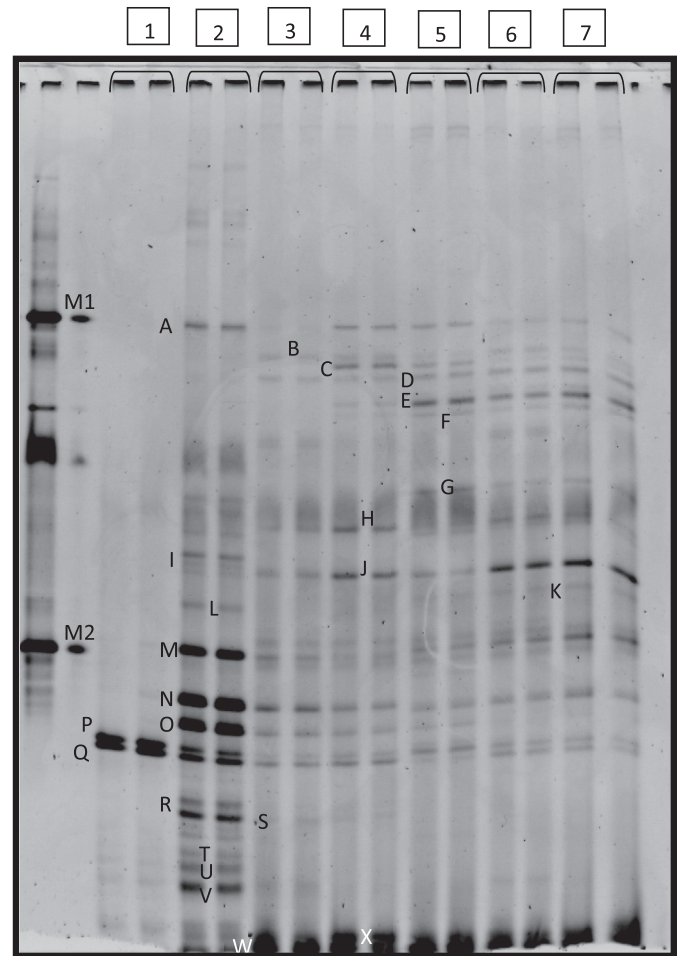


Fig. 1. Picture of DGGE gel showing the evolution of bacterial ecology structure on fresh, fermented and sun dried cocoa beans at different time intervals. 1: Fresh Cocoa beans (T_0 time of fermentation), 2: Cocoa beans fermented for 2 days, 3: Cocoa beans fermented for 4 days, 4: Cocoa beans fermented for 6 days and not dried, 5: Cocoa beans fermented for 6 days and dried for 2 days, 6: Cocoa beans fermented for 6 days and dried for 3 days, 7: Cocoa beans fermented for 6 days and dried for 4 days. M1: *Lactobacillus plantarum* DNA, and M2: *Escherichia coli* DNA are pure bacterial strain markers. Identification of DGGE bands for bacterial species (A–X) (Table 1).

During the drying step (2, 3 and 4 days), some bands that were present on (6-day) fermented cocoa beans were still detectable such as *L. plantarum* (A), *K. cryocrescens* (N) and *Weeksella sp* (E). Two bands corresponding to *A. lovaniensis* (H) and *L. fermentum* (C) were no longer detected after 2 and 3 days of drying, respectively. During the drying step, the remaining detected bands identified as AAB as well as two bands (not previously detected on fermented cocoa beans) were detected and corresponded to *Gluconobacter xylinum* (G) and *Clostridium sp* (K) species.

3.2. Analysis of yeast communities of cocoa beans during wooden boxes fermentation and sun drying

One single band was isolated on fresh cocoa beans which corresponded to *Hanseniaspora opuntiae* (A) that was the dominant species through the whole fermentation step (Fig. 2). Four bands were detected and identified as *Candida insectorum* (C), *Pichia kudriavzevii* (D), *Pichia galeiformis* (F) and *Pichia* species group 1 (E) after 2 days of fermentation. After 4 days of fermentation, the major bands (A), (C) and (D) remained detectable, and 3 bands appeared corresponding to *Candida sp* (B), yeast species group 2 (H) and *Pichia manshurica* (G).

Table 1
Identification of DGGE bands for bacterial species (A–X).

Letter	Genus/Species	Percent identity	Query cover	E value	References
A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%	100%	1e-33	HM218742
B	Not identified				
C	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99%	100%	1e-44	CP005958
D	<i>Acetobacter nitrogenifigens</i>	100%	100%	2e-22	KC763628
E	<i>Weeksella</i> sp	97%	100%	3e-47	JX628863
F	<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	100%	4e-50	HG421017
G	<i>Gluconobacter xylinum</i>	97%	100%	2e-47	NR074338
H	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	98%	100%	8e-47	HM217974
I	<i>Escherichia albertii</i>	97%	100%	2e-58	HM194885
J	<i>Acetobacter cervisiae</i>	100%	100%	3e-51	KC485819
K	<i>Clostridium</i> sp	100%	100%	4e-55	JX575132
L	<i>Escherichia fergusonii</i>	99%	100%	1e-34	JQ319655
M	<i>Budvicia</i> sp	96%	100%	1e-45	JQ080726
N	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	98%	100%	2e-42	AM933754
O	<i>Tatumella terrestra</i>	98%	100%	3e-41	JQ726629
P	Not identified				
Q	Chloroplast DNA	100%	100%	4e-60	JX912466
R	<i>Enterobacter</i> sp	100%	100%	2e-68	JX267074
S	<i>Tatumella saanichensis</i>	98%	100%	3e-41	JQ726633
T	<i>Pantoea vagans</i>	100%	100%	2e-48	HG421010
U	<i>Escherichia</i> sp	100%	100%	2e-68	HM346189
V	<i>Shigella dysenteriae</i>	100%	100%	8e-62	KC768788
W	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	100%	100%	9e-57	KC478491
	<i>Acetobacter</i> sp				KF668642
X	<i>Acetobacter</i> sp	95%	98%	3e-68	AB853266

At 6 days of fermentation, the bands identified as *Candida* sp (B) and *Pichia* species group 1 (E) were no longer detectable, while *P. manshurica* (G), *C. insectorum* (C), *P. galeiformis* (F) and *P. kudriavezii* (D), and yeast species group 2 (H) and (A) were still present. Yeast species associated to 6-day fermented cocoa beans were *H. opuntiae* (A), *C. insectorum* (C), *P. kudriavezii* (D), *P. galeiformis* (F), *P. manshurica* (G) and yeast species group 2 (H) stayed present during 3 days of sun drying. *Pichia* species group 1 (E) was not detected during the drying step. At the last drying day (4 days), only half of the number of bands found at 3 days (3 bands) were detected as *H. opuntiae* (A), *P. manshurica* (G) and yeast species group 2 (H).

4. Discussion

Analyses of the bacterial and yeast ecologies of cocoa showed that post-harvest steps of cocoa processes are associated to great variations in microbial ecology in terms of number of species that could be detected at the molecular level.

During fermentation step, bacterial ecology quickly underwent dramatical changes after two days and most of the identified bands were Enterobacterial species which may contribute to glucose conversion into lactic acid and citric acid (Grimont & Grimont, 2006). Previous study showed that Enterobacteriaceae were involved during the initial phase of cocoa beans fermentation (Garcia-Amisen et al., 2010; Papalexandratou, Camu, et al., 2011; Papalexandratou, Falony, et al., 2011; Papalexandratou et al., 2013; Papalexandratou, Vrancken, et al., 2011). *Tatumella saanichensis* could be involved in pectinolytic degradation of cocoa pulp and in citric acid assimilation (Marín-Cevada et al., 2010). Lefeber et al. (2010) found genus of *Pantoea* and *Escherichia* during the early stages of both of heap and box fermentations in Ivory Coast. *Pantoea* could be derived from environmental soil or plant material (Kageyama, Nakae, Yagi, & Sonoyama, 1992; Pujol & Kado, 2002).

Two Lactic Acid Bacterial (LAB) species such as *L. plantarum* and *L. fermentum* were detected on fermented cocoa beans with the dominance of *L. plantarum* during the whole fermentation step while *L. fermentum* was detected in the last stages. *L. plantarum* was

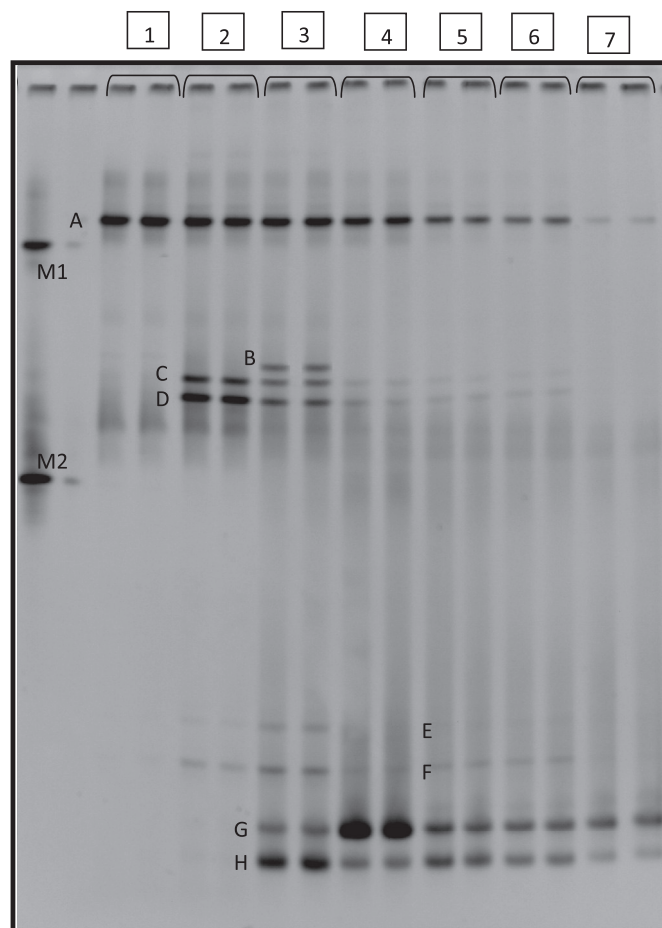


Fig. 2. Picture of DGGE gel showing the evolution of yeast ecology structure from on fresh, fermented and sun dried cocoa beans at different time intervals. 1: Fresh Cocoa beans (T_0 time of fermentation), 2: Cocoa beans fermented for 2 days, 3: Cocoa beans fermented for 4 days, 4: Cocoa beans fermented for 6 days and not dried, 5: Cocoa beans fermented for 6 days and dried for 2 days, 6: Cocoa beans fermented for 6 days and dried for 3 days, 7: Cocoa beans fermented for 6 days and dried for 4 days. M1: *Candida apicola* DNA M2: *Pichia sorbitophila* DNA are pure yeast strain markers. Identification of DGGE bands for yeast species (A–H) (Table 2).

already isolated during fermentation of Malaysian, Brazilian, Ivorian and Ghanaian cocoa beans (Camu et al., 2007; Gracia-Amisen et al., 2010; Papalexandratou, Camu, et al., 2011; Papalexandratou, Falony, et al., 2011; Papalexandratou et al., 2013; Papalexandratou, Vrancken, et al., 2011). *L. fermentum* was isolated and detected from

Table 2
Identification of DGGE bands for yeast species (A–H).

Letter	Genus/Species	Percent identity	Query cover	E value	References
A	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	100%	100%	7e-90	KC544476
B	<i>Candida</i> sp	96%	100%	1e-40	EF042050
C	<i>Candida insectorum</i>	99%	100%	2e-37	JN544058
D	<i>Pichia kudriavezii</i> strain YM25991	99%	100%	2e-47	KC494718
E	Species group of <i>Pichia</i> : <i>Pichia klyvera</i> <i>Pichia fermentans</i>	96%	100%	2e-49	JX103191 EU647835
F	<i>Pichia galeiformis</i>	100%	100%	4e-49	JX880398
G	<i>Pichia manshurica</i>	100%	96%	1e-87	JX183960
H	Species group 2: <i>Pichia sporocuriosa</i> <i>Issatchenkia hanoiensis</i>	99%	100%	1e-32	JF749216 FJ153148

cocoa beans fermentation, often as dominant species (Camu et al., 2007, 2008; Kostinek et al., 2008; Nielsen, Teniola, et al., 2007; Papalexandratou, Camu, et al., 2011). In our case, *L. fermentum* was detected until 3 days of drying.

Two Acetic acid bacteria (AAB) species were detected during the first stages of fermentation (*A. pasteurianus* and *Acetobacter* sp) whereas the other AAB species (identified as *A. lovaniensis*, *A. cervisiae*, *A. nitrogenifigens* and *G. xylinum*) were detected later in the process at 4 and 6 days and during drying. The presence of another representative of *Acetobacter* and *Gluconobacter* species were previously reported in cocoa bean fermentations (Camu et al., 2007; De Melo Pereira, Magalhães-Guedes, & Schwan, 2013; Schwan & Wheals, 2004). Nielsen, Teniola, et al. (2007) showed that succession of different AAB species took place during fermentation as *Acetobacter syzygii* and *Acetobacter pasteurianus* were the dominant AAB during the first half of all fermentation, and the later stages of fermentation were dominated by *Acetobacter tropicalis*.

In our study, we showed that AAB dominated in the last stages of fermentation and all drying stages. The dominance of this species during the last stages of fermentation and drying could be explained by their resistance to acidity and heat (Ndoye et al., 2006). These species could potentially be used as good markers of complete cocoa fermentation and drying.

G. xylinum and *Clostridium* sp were only detected during sun drying step, which might indicate that they could be present in environment (soils, materials) as *Clostridium* species generally are considered as soil contaminant (Jeong-Dong, Dae-Weon, Kyoun-Seung, Chang-Hyun, & Kook-Hee, 2004).

In the last day of cocoa beans drying the microbiota still consisted of several bacterial species, which made bacterial ecology totally different from the initial fresh cocoa beans.

During the whole cocoa post-harvest processing, including fermentation and drying, 23 bacterial species were detected among which 21 were identified. All bacterial species were found during the whole fermentation step and 18 bacterial species during the drying step. We observed 14 common species between fermentation and drying steps. Seven species (among which six Enterobacteriaceae) were only detected during fermentation step and could be potential specific markers of fermentation step (*Escherichia* sp, *E. fergusonii*, *E. albertii*, *Enterobacter* sp, *P. vagans*, *S. dysenteriae*). During sun drying, 2 species were detected which were *G. xylinum* and *Clostridium* sp and could be specific markers of the drying step.

H. opuntiae was the unique yeast species detected on fresh cocoa beans, confirming the quality of cocoa pods and the relative sterility of beans inside the pod. This species could be present at the surface of the pod as it was involved in all studied fermentation until now and was usually dominant in cocoa fermentation (Camu et al., 2007; Lefeber et al., 2010; Papalexandratou & De Vuyst, 2011; Papalexandratou, Camu, et al., 2010; Papalexandratou, Falony, et al., 2011; Papalexandratou et al., 2013; Papalexandratou, Vrancken, et al., 2011). *H. opuntiae* was dominant during the whole fermentation and drying steps followed by *P. manshurica* and yeast species group 2.

During drying step, the bands identified as *H. opuntiae*, *C. insectorum*, *P. kudriavezii* and yeast species group 2 (*Pichia sporocuriosa* and *Issatchenkia hanoiensis*) decreased in time and, at the end of drying, these three species were the only ones detected.

Most of the yeast species present on fermented cocoa beans disappeared during the drying process, and no new species could be detected. Yeast species appeared less resistant to (sun) drying than bacterial species. Dynamics of yeast communities associated to cocoa beans fermentation were more important than dynamics of yeast communities associated to cocoa beans during the drying step.

Eight yeast species were detected in the whole process, all of these species were present during the fermentation step and seven during sun drying.

One species (*Candida* sp) was only detected at a specific step during fermentation (4 days) before completion. These species could be specific marker for incomplete fermentation.

Both yeast and bacterial underwent dramatical changes during both cocoa fermentation and drying. While yeast and bacterial ecologies undergo changes during both treatments such as fermentation and sun drying, a much reduced number of yeast species was recorded at the fourth day of drying.

Acknowledgements

This work was supported by DESI grant from CIRAD France (to support PhD students) and Y. Hamdouche was supported by a PhD fellowship from HUBBARD.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.031>.

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Ampe, F., Audrey, S., & Nadine, Z. (2001). Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 45–54.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5464–5473.
- Ben Omar, N., & Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 3664–3673.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., et al. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1809–1824.
- Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., et al. (2008). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 86–98.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189, 81–87.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5113–5121.
- De Melo Pereira, G. F., Magalhães-Guedes, K. T., & Schwan, R. S. (2013). rDNA-based DGGE analysis and electron microscopic observation of cocoa beans to monitor microbial diversity and distribution during the fermentation process. *Food Research International*, 53, 482–486.
- De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., & Camu, N. (2010). The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria* (pp. 301–326). Ames, IA: Novel Applications. Wiley-Blackwell.
- El Sheikh, A. F., Bouvet, J. M., & Montet, D. (2011). Biological bar code for determining the geographical origin of fruits using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: an application to Shea tree fruits. *Crops & Food*, 3, 40–47.
- El Sheikh, A. F., Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D. D., Loiseau, G., & Montet, D. (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt. *Yeast*, 26, 567–573.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., & Coppola, S. (2001). Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology*, 42, 199–202.
- Fowler, M. S., Leheup, P., & Cordier, J. L. (1998). Cocoa, coffee and tea. In B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods* (pp. 128–147). London: Blackie Academic and Professional.

- Garcia-Armisen, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L., et al. (2010). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 2281–2292.
- Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The genus *Enterobacter*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. M. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes* (pp. 163–200). New York: Springer.
- Jeong-Dong, K., Dae-Weon, L., Kyou-Seung, L., Chang-Hyun, C., & Kook-Hee, K. (2004). Distribution and antimicrobial susceptibility of *Clostridium* species in soil contaminated with domestic livestock feces of Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 1017–1025.
- Kageyama, B., Nakae, M., Yagi, S., & Sonoyama, T. (1992). *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from fruit and soil samples. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 203–210.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 331–371.
- Leesing, R. (2005). *Identification and validation of specific markers for traceability of aquaculture fish for import/export* (PhD thesis). France: University of Montpellier 2.
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentations in vessels. *Food Microbiology*, 28, 457–464.
- Le Nguyen, D. D., Ha, H., Dijoux, D., Loiseau, G., & Montet, D. (2008). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR–DGGE: an application on *Pangasius* fish from Vietnam. *Food Control*, 19, 454–460.
- Marín-Cevada, V., Caballero-Mellado, J., Bustillos-Cristales, R., Muñoz-Rojas, J., Mascarúa-Esparza, M. A., Castañeda-Lucio, M., et al. (2010). *Tatumella* *ptyseos*, an unrevealed causative agent of pink disease in pineapple. *Journal of Phytopathology*, 158, 93–99.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 695–700.
- Nganou, D. N., Durand, N., Tatsadjieu, N. L., Meile, J. C., El Sheikh, A. F., Montet, D., et al. (2012). Determination of coffee origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR–DGGE: application to the Cameroonian coffee. *International Journal of Biosciences*, 2(5), 18–30.
- Nielsen, D. S., Nielsen, P. S., & Van den Berg, F. (2008). Investigating the fermentation of cocoa by correlating denaturing gradient gel electrophoresis profiles and near infrared spectra. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 133–140.
- Nielsen, D. S., Schillinger, U., Franz, C. A. M. P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Halzapfel, W. H., et al. (2007). *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1468–1472.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 168–186.
- Øvreas, L., Forney, L., Dae, F. L., & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3367–3373.
- Palys, T., Nakamura, L. K., & Coia, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1145–1156.
- Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G., & De Vuyst, L. (2011). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28, 964–973.
- Papalexandratou, Z., & De Vuyst, L. (2011). Assessment of the yeast species diversity of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS. Yeast Research*, 11, 564–574.
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H. M., et al. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7698–7714.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 28, 1326–1338.
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28, 1326–1338.
- Pujol, C. J., & Kado, C. I. (2002). Genetic and biochemical characterization of the pathway in *Pantoea citrea* leading to pink disease of pineapple. *Journal of Bacteriology*, 182, 2230–2237.
- Schwan, R. F., Cooper, R. M., & Wheals, A. E. (1997). Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbiology Technology*, 21, 234–244.
- Schwan, R. F., Rose, A. H., & Board, R. G. (1995). Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 79, 96–107.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221.
- Sheffield, V. C., Beck, J. S., Stone, E. M., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 86, 232–236.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846–849.
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2001). Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology fundamentals and frontiers* (pp. 649–661). Washington: ASM Press.
- Wood, G. A. R., & Lass, R. A. (2001). *Cocoa* (4th ed.). Oxford: Blackwell Science.

Manuscript Number:

Title: Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses

Article Type: SI: CoCoTea 2015 - Aveiro

Keywords: *Coffea arabica*; *Coffea canephora*; microbial; bacterial; fungal communities; PCR-DGGE; post-harvest processes

Corresponding Author: Dr. Yasmine Hamdouche, Ph.D

Corresponding Author's Institution: CIRAD UMR QUALISUD

First Author: Yasmine Hamdouche, Ph.D

Order of Authors: Yasmine Hamdouche, Ph.D; Jean Christophe Meile , Ph.D; Nadège Nganou D, Ph.D; Noël Durand, Ph.D; Corinne Teyssier , Ph.D; Didier Montet, Ph.D

Abstract: Two main types of processing are applied to coffee: the dry and wet processes. The aim of this study was to measure the impact of post-harvest processing on coffee microbial ecology and search for microbial markers of process discrimination. Coffee samples were collected in three farms in two locations of West Cameroon (Bafoussam and Dschang). Samples of *Coffea arabica* were collected along wet and dry methods and *Coffea canephora* samples were collected only during treatment using the dry method. Bacterial and fungal communities present on coffee beans were determined by using a molecular method (PCR-DGGE) generating 16S rDNA and 26S rDNA profiles for bacteria and fungi. Results showed that microbial ecology structures were different depending on three main parameters: i) the method applied, ii) the coffee species and iii) their geographical origin. Statistical analysis applied allowed to measure the impact of all parameters and showed that the method was the major parameter influencing microbial communities' structure. Microbial DNA markers that appear specific of coffee origin, species or treatment were identified such as Lactic Acid Bacteria (LAB) which were detected only during the wet process. They are specific of the fermentation step. DNA from *Wallemia* sp. was only detected in Robusta coffee beans (*Coffea canephora*). The study of microbial communities at the molecular level appears as a promising approach to discriminate between coffee processing types.

Title

Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses

Authors

Hamdouche Yasmine ^{a*}, Meile Jean Christophe^a, Nganou D. Nadège^b, Durand Noël^a, Teyssier
Corinne^c, Montet Didier ^a

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

^b Department of Food Science and Nutrition, Food Microbiology laboratory, National School
of Agro-Industrial Sciences, University Sciences, University of Ngaoundere, P. O. Box. 455
Ngaoundere, Cameroon

^c University of Montpellier, CIRAD-UMR Qualisud, TA B-95/16, 73, Jean-François Breton,
34398 Montpellier Cedex 5, France

* Corresponding Author: Hamdouche Yasmine

E-mail address: yasminehamdouche@gmail.com

Postal address: CIRAD-UMR Qualisud, TA B-95/16, 73, rue Jean-François Breton, 34398
Montpellier Cedex 5, France

Tel: (33) 4 67 61 57 28, Fax: (33) 4 67 61 44 33

Abstract

Two main types of processing are applied to coffee: the dry and wet processes. The aim of
this study was to measure the impact of post-harvest processing on coffee microbial ecology
and search for microbial markers of process discrimination. Coffee samples were collected in

three farms in two locations of West Cameroon (Bafoussam and Dschang). Samples of *Coffea arabica* were collected along wet and dry methods and *Coffea canephora* samples were collected only during treatment using the dry method. Bacterial and fungal communities present on coffee beans were determined by using a molecular method (PCR-DGGE) generating 16S rDNA and 26S rDNA profiles for bacteria and fungi. Results showed that microbial ecology structures were different depending on three main parameters: i) the method applied, ii) the coffee species and iii) their geographical origin. Statistical analysis applied allowed to measure the impact of all parameters and showed that the method was the major parameter influencing microbial communities' structure. Microbial DNA markers that appear specific of coffee origin, species or treatment were identified such as Lactic Acid Bacteria (LAB) which were detected only during the wet process. They are specific of the fermentation step. DNA from *Wallemia sp.* was only detected in Robusta coffee beans (*Coffea canephora*). The study of microbial communities at the molecular level appears as a promising approach to discriminate between coffee processing types.

Key words: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, microbial, bacterial, fungal communities, PCR-DGGE, post-harvest processes

1. Introduction

The world total coffee production was estimated at 8.4 billion tones in 2014. Africa, Asia, Oceania and South America represented respectively 11.5%, 29.2% and 46.6% of the production (ICO Annual Review 2014). Coffee production in Cameroon encountered a drop over the past thirty years. Despite of the decline of the production, the Cameroonian coffee is still exported to major destinations, for example, Robusta to Italy (more than 40% of total

Cameroon Robusta exports in 2007-2008) and Arabica to Germany (more than 70% of total Cameroon Arabica exports in 2007-2008) (ONCC-NCCB, 2009).

Coffee trees belong to the genus *Coffea* of the *Rubiaceae* family which constitutes about 80 species and several hundred varieties. The most common species of coffee and the most cultivated in the world are *Coffea arabica* and *Coffea canephora* known as Arabica and Robusta coffee respectively. Coffee beverages are mainly made from these species.

Several studies on the discrimination of coffee varieties based on differences of their chemical composition have been published. Most of them were based on the analysis of their aroma compounds (Blank *et al.*, 1991, Sanz *et al.*, 2002), by authentication and quantification of coffee products using Fourier transform infrared spectroscopy (Briandet *et al.*, 1996; Rubayiza and Meurens, 2005), by quantitative determination of their polysaccharides content (Fischer *et al.*, 2001), by analysis of their chemical composition (Martin *et al.*, 1998) or by the composition of amino acid enantiomers (Casal *et al.*, 2003).

Coffee processing must begin immediately after the fruit harvesting to prevent the pulp from fermentation and deterioration. Different post-harvest practices play an important role in preserving and enhancing the intrinsic quality of coffee. The two main types of processes applied to coffee are: i) the natural process (dry method) which is usually applied to *Robusta coffee*, and washed process (wet method) (Teixeira *et al.*, 1995) which is mostly applied to Arabica. Dry method is the oldest, simplest, and cheapest method. It produces 'natural' coffees (Clarke and Macrae, 1985; 1987). In the dry method, the harvested cherries are first sorted and then sun-dried. Drying operation is the most important stage of this process, since it affects the final quality of green coffee obtained after husking.

The wet method produces a fully washed parchment coffees (parchment devoid of mucilage) that is fermented in water. This process helps to preserve the intrinsic qualities of the bean, producing a homogeneous green coffee with very few damaged beans. Coffee treated by this

process is regarded as a high quality coffee and is sold at higher price when compared to natural coffee (Rothfos, 1980). Coffee cherry pulp and mucilage consist primarily of water (76%), proteins (10% DM), fibers (21% DM) and minerals (8% DM) (Silva *et al.*, 2000). Coffee pulp and mucilage are natural substrates for the growth of microorganisms. Bacteria, yeast and fungi have been shown to be implicated in coffee processing, notably during coffee fermentation. Microbial activities degrade the components of pulp and mucilage and induce the biochemical transformations necessary for natural fermentation (Silva *et al.*, 2000; 2008). Many microbial species have been isolated from coffee cherries during natural or dry fermentation comprising 44 genera and 64 different species, as reported by Silva *et al.* (2008).

UE regulation 178/2002 established the general requirements of food law, established the European Food Safety Authority and required the determination of traceability in processes. Previous works have implemented a traceability tool for the determination of geographical origin of fruits (El Sheikha *et al.*, 2009) and coffee (Nganou *et al.*, 2012) by microbial global analysis using Denaturing Gradient Electrophoresis (PCR-DGGE). This molecular approach was applied to study the dynamics and microbial diversity during coffee processing (Vilela *et al.*, 2010, Durand *et al.*, 2012). This rapid fingerprinting method could be employed as an analytical tool to trace the history of the exported products and to monitor the dynamics of microbiota during processing steps. To this end, we used PCR-DGGE to generate 16S rDNA and 26S rDNA profiles and determine the bacterial and fungal communities associated with *Coffea arabica* and *Coffea canephora* from two major producing locations in Cameroon (Bafoussam and Dschang) along their processing. We showed that this approach could be used to accurately measure differences in microbial ecology structures according to the type of coffee processing used. Thus, this approach could be used for traceability to discriminate between coffee from different origin and production mode.

2. Materials and methods

2.1.Sampling

Coffee samples were collected in two locations situated in west Cameroon, Bafoussam and Dschang. Meteorological information were noted in May 2014 (month of harvest). Mean temperature was 22.1°C in Bafoussam and Dschang, mean humidity was 0.0165 and 0.0162 kg/kg. The geographical coordinates of the sampling area were 5°28'0, 72''N – 10°25'0, 48''E and 5°27"N – 10°04'00"E respectively. For each location, the samples were collected from three different sites (farms), the distance between site B1 and B2 was 12 km, between site B2 and B3 was 10 km and between site B1 and B3 was 22 Km in Bafoussam. In Dschang, there was 7 km between site D1 and D2, 5 km between D2 and D3, and 12 Km between D1 and D3.

Five hundred grams of coffee samples were collected in bags of 50 kg (100 g at 5 different parts of the coffee bag). *Coffea Arabica* samples were collected after brewing at two steps during wet method (hull coffee and green coffee) and dry method (husk coffee and green coffee) but *Coffea canephora* samples were collected only during dry process (Fig.1). All samples were stored at room temperature (25°C) until analysis.

2.2.Total DNA extraction

From 10 g of coffee beans, total DNA (including microbial DNA) was extracted according to the method described previously by Hamdouche et al. (2015). The quantity and purity of extracted DNA were verified by UV spectrophotometer (Biospec-Nano), and by electrophoresis through a 0.8% agarose gel in 1x TAE buffer (containing 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 1.0 mM Na₂-EDTA; Eppendorf,) with a 1 Kb molecular weight ladder (Promega). After running at 100 V for 30 min, the gels were stained for 15 min in Gel Red solution (50 µg.mL⁻¹; Biotium), then observed and photographed on a UV

transilluminator, using a black and white CCD camera (Scion Company) and Gel Smart 7.3 system software (Clara Vision).

2.3.PCR amplification

For bacterial communities analyses: A 160 bp fragment of the V3 variable region of 16S rDNA was amplified using gc-338f (5'-GCG CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCA TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3', Sigma) and 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3', Sigma) DNA primers (Ampe *et al.*, 1999; Leasing, 2005; Øvreas *et al.*, 1997). (A 40-pb GC-clamp (Sigma) was added to the forward primer in order to ensure that the fragment of DNA will remain partially double stranded and that the region screened is in the lowest melting domain (Sheffield *et al.*, 1989)). Each mixture (final volume 50 µL) contained about 100 ng of template DNA, DNA primers at 0.2 µM, deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) at 200 µM, 1.5 mM MgCl₂, 5µL of 10x of reaction Taq buffer MgCl₂ free and 1.25 U of a-Taq polymerase (Promega). In order to increase the specificity of amplification and to reduce the formation of spurious by-products, DNA was amplified in a "touchdown" PCR as follow: first cycle at 94°C for 3 min, followed by 10 touchdown cycles of denaturation at 94°C for 1 min annealing at 65°C (1st cycle) to 55°C (10th cycle) for 1 min and extension at 72°C for 1 min, then 25 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min. The extension step was increased to 10 min in the last cycle.

For fungal communities analyses: a 250 bp fragment of D1/D2 region of the 26S rDNA gene was amplified using eukaryotic universal DNA primers gc-NL1 (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3') and LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3', Sigma) (Kurtzman & Robnett, 1998; Cocolin *et al.*, 2000). A 30-pb GC-clamp was added to the forward primer. PCR mixture

performed as previously described for bacterial DNA analyses. The amplification started by one cycle at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 10 min. PCR products were verified by conventional electrophoresis in 2% (w/v) agarose gel with TAE 1X buffer stained with Gel Red (Biotium) 0.5 µg.mL⁻¹ in TAE 1X and quantified using a standard (DNA mass ladder 100 pb, Promega). The migration ran for 30 min at 100V.

2.4.Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) analysis

PCR products were analyzed by DGGE, using a Bio-Rad Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, USA) according to the procedure described by Muyzer et al. (1993) and improved by Leasing (2005). Thirty five µL of each PCR amplicon were loaded into 8% (w/v) polyacrylamide gels (acrylamide/N,N'- methylene bisacrylamide, 37.5/1, Promega) in 1X TAE.

Electrophoresis experiment was performed at 60°C using a denaturing gradient ranging from 30 to 60% (100% corresponded to 7 M urea and 40% (v/v) formamide, Promega). The migration carried out at 20 V for 10 min and then at 80 V for 12 h. Then the gel was stained for 30 min with Gel Red solution and then photographed as described above.

2.5.Purification and identification of DGGE bands

Detected bands were cut from the DGGE gel with a sterile scalpel. DNA of each band was then eluted in 100 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl; pH 8.0, Promega) at 4°C overnight. DNA was precipitated by adding 1/10 volume of sodium acetate (3M, pH 5), 0.5 µL of glycogen (Molecular Grade, Roche), and 1 volume of isopropanol and incubated at -20°C for 30 min, then centrifuged at 12000 g for 15 min. The supernatant was discarded, DNA pellets were washed with 500 µL 70% ethanol and after 5 min of centrifugation, the DNA pellets were air

dried for 1 to 2 h. Finally, the DNA was re-suspended in 50 µL of molecular water and stored at 4°C. Bacterial and fungal purified DNA were amplified using 338f and NL-1 (without GC clamp) and 518r and LS-2 primers respectively. PCR amplicons were sent for sequencing at GATC Biotech (Germany).

Raw sequences data were edited using Sequence Scanner (or Bioedit) software and compared to the GenBank database using the BLAST program (Altschul *et al.*, 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Sequences having a percentage of identity of 97% or greater were considered to belong to the same species (Stackebrandt and Goebel, 1994; Palys *et al.*, 1997).

2.6. Image and statistical analysis

The DGGE gels were analyzed using Image Quant TL software v. 2003 (Amersham Biosciences, USA). In each lane, banding patterns were standardized with two bacterial reference patterns (*Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* DNAs) for bacteria and two fungal reference patterns of yeasts (*Lodderomyces elongisporus* and *Candida apicola* DNAs). The band relative positions were compared with standard patterns.

In DGGE analysis, the generated banding pattern is considered as an image of all the major microbial populations. An individual band refers to a unique 'sequence type' or phytotype (Van Hannen *et al.*, 1999; Muyzer *et al.*, 1995). This was confirmed by Kowalchuk *et al.* (1997) who showed that co-migrating bands generally corresponded to identical sequences. The DGGE fingerprinting was manually scored by presence and absence of co-migrating bands, independently of their intensity. Pair wise community similarities were quantified using Dice similarity coefficient (S_D): $S_D = 2 N_c / N_a + N_b$ (Heyndrickx *et al.*, 1996) where N_a represented the number of bands detected in sample A, N_b represented the number of bands in

sample B, and N_c represented the number of bands common to both samples. The similarity index was expressed within a range of 0 (completely dissimilar) to 100 (perfect similarity). Ascending Hierarchical Classification (AHC) was performed using the similarity matrix to group samples according to their similarity index by using Xlstat (version 2014). Principal Component Analysis (PCA) was applied using Statistica (version 7) software (StatSoft, USA).

3. Results

3.1. Variations in the structure of microbial communities according to geographical origin of Cameroonian coffee

Coffee samples from a total of six farms (3 in Bafoussam and 3 in Dschang regions) were investigated for the structure of microbial communities. Bacterial and fungal DGGE profiles are presented in (Fig.2) and (Fig.3). DGGE profiles obtained from bacterial and fungal DNA of 3 sites of each region were similar (seen the same bands DNA revealed at the same position) whichever the process, process steps and coffee species used. For example bacterial DGGE profiles for Arabica green coffee (**AV**) were very similar for the site **B1**, **B2** and **B3** in Bafoussam and site **D1**, **D2** and **D3** in Dschang (Fig.2). We observed a similar number of bands (14 and 13 bands respectively in Bafoussam and Dschang) that were situated at the same position on the DGGE gel for the three sites profiles. Some variations in DGGE profiles were observed for the 3 sites as the presence of one DNA bacterial band (*G*) in Arabica dry coffee solely in site **B2** (Fig.2a). Three distinct bacterial DNA bands were detected associated to Arabica green coffee (**ANV**) in D3, among them one DNA band (*R*) was identified as belonging to the *Enterobacteriaceae* family (Fig.2b). For fungal communities, for each sample type (**AC**, **AP**, **AV**, **ANV**, **RC** and **RV**), all bands DNA observed were common between sites of the same location (Fig.3.a and b).

DGGE profiles obtained from the bacterial DNA of the three sites in each region were very similar (Fig. 2) or identical in the case of the fungal profiles whichever the method, the step of the process and the species of coffee used (Fig. 3).

3.2. Microbial ecology variations according to the post-harvest process

Our hypothesis was that microbial ecology (i.e. DGGE profiles of microbial DNA) associated to coffee samples varied mainly according to the post-harvest treatment used. To test this hypothesis, we assessed the structure of microbial populations associated to dry and wet methods for every coffee species (Arabica and Robusta).

3.2.1. Variations in the structure of bacterial populations

Bacterial rDNA DGGE profiles were compared according to the Arabica wet and dry method. For the wet method, 7 main specific bacterial DNA bands were found (*A, B, D, E, T, F, U*) identified by sequencing as *Weissella* sp, *Lactobacillus* sp, *Leuconostoc mesenteroides*, *Ralstonia* sp *Acidovorax* sp, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* respectively, no identification was obtained for one band (*U*). DGGE profiles varied between the two steps: before hulling (**AP**) and after hulling (**AV**) (Fig.2). In all sites, in hull coffee the apparition of two bands identified as *Lactococcus lactis* (*F*) and *Lactobacillus* sp (*B*) (Fig.2a) were observed. For the dry process, two DNA bands that appeared specific to the dry process were observed and identified as *Chryseobacterium* (*V*) and *Citrobacter* sp (*W*). DGGE profile showed little variations during the dry process, before and after husking. Therefore we concluded that the impact of husking seemed to be weak on bacterial populations associated to coffee (Fig.2b).

239

240 3.2.2. Variations in the structure of fungal populations

241 Fungal rDNA DGGE profiles of coffee samples varied depending of the process used, nine
242 fungal DNA bands were detected only in dry process (*K, M, N, P, S, L, J* and *O, D*). Bands
243 (*L*), (*J*) and (*D*) were identified respectively as *Sordariomycetes sp*, *Meyerozyma caribbica*
244 or *M. guilliermondii* and *Cladosporium sphaerospermum*. Six others DNA bands were
245 present only in samples produced by wet method (*B, V, W, X, Y* and *R*) (Fig.3). Band (*X*)
246 was identified as *Penicillium* and (*Y*) belonging to *Saccharomycetes* class. The intensity of
247 some common DNA bands between samples changed depending upon the process applied.
248 For example band (*F*) (not identified) which was intense during dry process and weak
249 during wet process whereas the opposite was observed for band (*C*) (identified as
250 *Hanseniaspora uvarum*).

251 Variations in fungal communities were observed at different steps of the process. Several
252 fungal DNA bands disappeared during the wet processes such as bands (*B, H, a, b*) (Fig. 3)
253 the last one was identified as *Aspergillus* which was present in hull coffee (**AP**) and
254 disappeared in green coffee (**AV**). Band (*Q*) which was present in husk coffee (**AC**),
255 disappeared in green coffee (**ANV**) while bands (*Y, Z*) appeared in green coffee.

256

257 3.3. Microbial ecology variations according to Coffee species (Arabica and Robusta)

258 The microbial communities associated with Arabica and Robusta coffee samples were
259 analyzed on same process (dry process).

260 Bacterial DNA bands that were found both associated to Arabica and Robusta coffee were
261 observed especially at the bottom of the gel (*L, M, N, K*) that belong to the

Enterobacteriaceae family. For example, DNA band (L) was identified as *Pantoea ananatis*. Bacterial DNA bands specific to Robusta coffee species were detected such as (S, C, H, I), the last one was identified as *Microbacterium sp.* (Fig.2).

DGGE profiles of fungal DNA associated to Robusta and Arabica coffees exhibited some differences. A remarkable DNA band situated on the top of the gel and identified as *Wallemia* (A) was revealed solely in coffee Robusta together with five others bands (Z, E, I, S,T) (Fig.3).

Statistical analyses used were Principal Component Analysis (PCA) and Ascending Hierarchical Classification (AHC). PCA was applied on the DGGE gels obtained from coffee for each location separately, it was used to compare bacterial and yeast communities profiles (DGGE) during the post-harvest process of coffee beans in Cameroon (Fig. 4 and 5). About 55 to 65% of the variability of the sample from the two locations (Bafoussam and Dschang) could be described using this method and three distinct groups could be discriminated: the first group contained only coffee samples produced by the wet method from the three sites, a second group included only coffee samples also from three sites but obtained by dry method, and in the last group, samples of Robusta coffee from the three sites were regrouped.

AHC was applied by combining DGGE profiles of the two locations (Bafoussam and Dschang) in order to measure all of parameters (treatment, geographical origin and coffee species). The dendograms obtained from DGGE gel of bacterial and fungal ecology structures (Fig. 6) showed two main clusters with low similarity percentage at 50%, (Fig. 6.a) and 48% (Fig. 6.b) respectively, The first cluster included the samples of coffee obtained by dry method while the second cluster comprised the coffee obtained by wet method (Fig. 6).

For fungal communities, the cluster grouping the coffee from dry process was divided into two classes at 67% similarity according to the geographical origin (region) (Fig 6.b).

At approximately 70-73% similarity, two secondary clusters were formed between Arabica and Robusta samples obtained by dry method. When processing steps were compared, 83% similarity were observed (Fig 6.b). A high similarity level was observed (more than 95%) between microbial profiles in the three sites of the same region (Fig 6.a. and b). These results showed that the microbial ecology structure varied mainly with treatment type, then with geographical origin and finally to coffee species used, and the highest level of similarity between community's structures were observed for coffee treated in different farms located in the same region.

Cluster analysis of coffee samples using bacterial communities' data allowed us to raise similar conclusions (Fig. 6.a).

4. Discussion

This approach allowed us firstly to discriminate coffee beans depending to the treatment, to the origin and to the species, and secondly to measure the effect of the main parameter on microbial ecology.

Interestingly LAB (*Weissella*, *Lactobacillus*, and *Leuconostoc mesenteroides*) were detected solely in the wet process coffee (independently upon the location). Their presence could be linked to the fermentation step that is specific to the wet process. However, bacteria play an important role in the degradation of substrates to end products such as lactic acid bacteria (LAB) which are responsible of lactic acid fermentation (Sven & Walter, 1990). *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*, were previously isolated from coffee fermentation (Avallone *et al.*, 2001). Therefore, LAB DNA can be used as potential molecular markers associated to wet coffee processes.

Ralstonia and/or *Acidovorax* bacteria were detected in coffee obtained by wet process. This genus had not been detected or isolated previously from coffee. One of them *Ralstonia solanacearum* (Smith) is responsible for some fruits, vegetables and plants diseases (Yabuuchi *et al.*, 1995) and is an important soil borne bacterial plant pathogen (Hayward, 1991). Their important plant hosts were tomato, potato, eggplant, pepper, tobacco, banana, chili, and peanut (French and Sequeira, 1970). In Ethiopia *R. solanacearum* is an important disease of potato and tomato (Yaynu, 1989) and its importance is increasing from time to time. Bacterial fruit blotch, caused by the Gram-negative bacterium *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*, is one of the most harmful diseases in the production of cucurbits, including watermelon and melon (Schaad *et al.*, 1978, Willems *et al.*, 1992, Wall and Santos, 1988 and Latin and Hopkins, 1995).

Chryseobacterium genus was detected only in dry process in husk coffee and green coffee in the two locations and these DNA markers appeared to be specific to this process. *Chryseobacterium* was previously isolated from husk coffee composting (Fekadu Shemekite *et al.*, 2013). *Chryseobacterium* species are known for their importance in the degradation of complex biopolymers in composting processes (Al Khadi *et al.*, 2004). *Sordariomycetes* sp was also detected in dry process and it is a part of fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia and Hawai (Vega *et al.*, 2010).

Lactococcus lactis and *Lactobacillus fermentum* were detected only in coffee samples from Bafoussam. In this location during the wet process we observed more LAB species (in terms of number and relative abundance) than in Dschang, while we detected more bands of fungal DNA. The change in biodiversity of coffee could be linked to the action of LAB which could exhibit antifungal properties (De Muynck *et al.*, 2004, Gerez *et al.*, 2009, Magnusson *et al.*, 2003, Rouse *et al.*, 2008, Schillinger and Villarreal, 2010, Valerio *et al.*, 2009 and Voulgari *et al.*, 2010). Lactic acid bacteria play an important role in lactic

fermentation but they have also an antimicrobial effect which is related to the production of organic acids. Cizeikiene *et al.* (2013) showed the fungicidal and fungistatic activities of organics acids and enterotoxins produced by LAB against fungi and yeast species. All these information can explain the difference in biodiversity between the two regions of coffee production.

Despite the high number of DNA markers shared and a high similarity of DGGE profiles for the two locations (Bafoussam and Dschang), we noticed some specific DNA bands to each of the two regions. This was confirmed by Nganou *et al.* (2012) which study established a link between microbial ecology and the geographical origin of coffee.

Statistical analysis (PCA) showed that microbial ecology of coffee in Bafoussam and Dschang changed depending on the process applied and coffee species used. The band identified as *Wallemia* was discriminant to Robusta coffee and could be used as molecular marker of this species. This fungal genus was already isolated from Robusta coffee cherries from Thailand; the name of the isolate was *Wallemia sebi* (Bucheli *et al.*, 1998).

From AHC results, we conclude that the microbial ecology structure varied depending firstly to type of post-harvest processing, then to geographical origin and finally to coffee species used. Moreover, processes steps can influence the structure of microbial communities found on coffee samples.

5. Conclusion

The global analysis of microbial communities by a molecular method can be used as an efficient tool to discriminate coffee postharvest processes, coffee species and to monitor the dynamics of coffee microbial communities during process stages.

359 **References**

- 360 • Al Khadi, S.F., Myers, K.M., Rasooly, A., Chizhikov, V. (2004). Genotyping of *Clostridium*
 361 *perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. *Molecular and*
 362 *Cellular Probes*, 18, 359–367.
- 363 • Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J.
 364 (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search
 365 programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- 366 • Ampe, F., Omar, N.B., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J.P. (1999). Polyphasic study of the
 367 spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough,
 368 demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional
 369 fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5464-5473.
- 370 • Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J. M., Olguin, E., & Guiraud, J. P. (2001). Microbiological
 371 and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42, 252-256.
- 372 • Blank, I., Sen, A., Grosch, W. (1992). Aroma impact compounds of Arabica and Robusta
 373 coffee. Qualitative and quantitative measurements. (Ed.), Proceedings of the 14th ASIC
 374 Colloque, *Association Scientifique Internationale du Café*, Paris, pp. 117–129.
- 375 • Briandet, R., Kemsley, E. K., and Wilson, R. H. (1996). Discrimination
 376 of *Arabica* and *Robusta* in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and
 377 Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 170-174.
- 378 • Bucheli, P., Meyer, I., Pittet, A., Vuataz, G., and Viani, R. (1998). Industrial Storage of
 379 Green Robusta Coffee under Tropical Conditions and Its Impact on Raw Material Quality
 380 and Ochratoxin A Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4507-4511.
- 381 • Casal, S., Alves, M. R., Mendes, E., Oliveira M. B. P. P. and Ferreira, M. A. (2003).
 382 Discrimination between Arabica and Robusta Coffee Species on the Basis of Their Amino
 383 Acid Enantiomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6495–6501.

- 384 • Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., and Bartkiene, E. (2013).Antimicrobial

385 activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from

386 food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539-545.
- 387 • Clarke, R.J., & Macrae, R. (1985). Coffee Chemistry. (1st ed.). London: *Elsevier Applied*

388 *Science Publishers*.
- 389 • Clarke, R.J., & Macrae, R. (1987). Coffee Technology. (2nd ed.). London: *Elsevier Applied*

390 *Science Publishers*.
- 391 • Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in

392 wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189, 81-87.
- 393 • De Muynck, C., Leroy, A.I.J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., Vandamme, E.J.

394 (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal

395 metabolites. *Microbiological Research*, 159, 339–346.
- 396 • Durand, N. (2012). Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post

397 récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes. PhD dissertation.

398 Université Montpellier II, France.
- 399 • Durand, N., El Sheikha, A. F., Suarez-Quiros, M. L., Oscar, G. R., Nganou, N. D., Fontana-

400 Tachon, A., & Montet, D. (2013). Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and

401 biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. *Food*

402 *Control*, 34, 466-471.
- 403 • El Sheikha , A.F., Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D.D., Loiseau, G., & Montet, D.

404 (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities

405 by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from egypt. *Yeast*, 26, 567-573.
- 406 • Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., and Redgwell, R. J. (2001). Polysaccharides of green

407 Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research*, 330(1), 93-101.
- 408 • Frank, H.A., Lum, N.A., & Dela Cruz, A.S., (1965). Bacteria responsible for mucilage layer

409 decomposition in Kona coffee cherries. *Applied Microbiology*, 13, 201-207.

- 410 • French, R., and Sequeira, L. (1970). Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and
411 South America: a comparative study. *Phytopathology*, 60, 506–512.
- 412 • Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., Meile, J. C. (2015).
413 Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the
414 identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117-122.
- 415 • Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas*
416 *solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 65–87
- 417 • Hedman, P., Ringertz, O., Lindröm, M., & Olsson, K. (1993). The Origin of *Staphylococcus*
418 *saprophyticus* from Cattle and Pigs. Scand. *The Journal of Infectious Diseases*, 25, 55-60.
- 419 • Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., & De Vos, P. (1996).
420 Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in
421 bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, 26, 247-259.
- 422 • ICO Annual Review 2014: The international coffee organization.
- 423 • Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., de Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., & Woldendorp,
424 J.W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class
425 *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and
426 sequencing of PCR amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental*
427 *Microbiology*, 63, 1489-1497.
- 428 • Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous
429 yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie*
430 *Van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
- 431 • Latin, R.X., Hopkins, D.L. (1995). Bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Dis*, 8, 761–
432 765.
- 433 • Leasing, R. (2005). Identification and validation of specific markers for traceability of
434 aquaculture fish for import/export. PhD dissertation. University of Montpellier II, France.

- 435 • Li, X., Zhang, H., Wu, M., Zhang, Y., & Zhang, C. (2008). Effect of methamidophos on soil
436 gungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. *Journal of*
437 *Environmental Sciences*, 20, 619-625.
- 438 • Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer J. (2003). Broad and complex
439 antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*
440 *Letters*, 219, 129–135.
- 441 • Martín, M. J., Pablos, F., González, A.G. (1998) Discrimination between arabica and robusta
442 green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta*, 46(6), 1259–1264.
- 443 • Muyzer, G., De Waal, E.C., & Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial
444 populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-
445 amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- 446 • Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O., & Jannasch, H.W. (1995). Phylogenetic relationships of
447 *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent sample by
448 denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragment. *Archives of Microbiology*,
449 164, 165-172.
- 450 • Nganou, D. N., Durand, N., Tatsadjieu, N. L., Meile, J. C, El Sheikha , A.F., Montet, D.,
451 & Mbufung, C. M. (2012). Determination of coffee origin by using 28S rDNA fingerprinting
452 of fungal communities by PCR-DGGE: Application to the Cameroonian coffee. *International*
453 *Journal of Biosciences*, 2(5), 18-30.
- 454 • ONCC-NCCB, 2009. Cameroon coffee sector development strategy 2014-2015. Office
455 National du Cacao et du Café.
- 456 • Øvreas, L., Forney, L. Dae, F. L., & Torsvik, V. (1997). Distribution of Bacterioplankton in
457 Meromictic Lake Sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of
458 PCR-Amplified Gene Fragment Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental*
459 *Microbiology*, 63, 3367-3373.

- 460 • Palys, T., Nakamura, L. K., & Cocha, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological
461 diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of*
462 *Systematic Bacteriology*, 47, 1145-1156.
- 463 • Rothfos, B. (1980). Coffee Production. (2nd ed.). Germany: Gordian-Max-Rieck Hambury.
- 464 • Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., Sinderen, D. (2008). Lactic acid bacteria with potential to
465 eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915–923
- 466 • Roussos, S., Aquiahuatl, M. D., Trejohernandez, M. D., Perraud, I. G., Favela, E.,
467 Ramakrishna, M., Raimbault, M. & Viniegragonzalez, G. (1995). Biotechnological
468 Management of Coffee Pulp - Isolation, Screening Characterization, Selection of Caffeine
469 Degrading Fungi and Natural Microflora Present in Coffee Pulp and Husk. *Applied*
470 *Microbiology and Biotechnology*, 42, 756-762.
- 471 • Rubayiza, A. B., and Meurens, M. (2005). Chemical Discrimination of Arabica and Robusta
472 Coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food*
473 *Chemistry*, 53(12), 4654-4659.
- 474 • Sanz, C., Maeztu, L., Zapelena, M. J., Bello, J., and Cid, C. (2002). Profiles of volatile
475 compounds and sensory analysis of three blends of coffee: influence of different proportions
476 of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar. *Journal of the Science of*
477 *Food and Agriculture*, 82(2), 840-847.
- 478 • Schaad, N. W., Sowell, G., Goth, R. W., Colwell, R. R., and Webb, R. E. (1987).
479 *International journal of systematic bacteriology*, 28, 117–225.
- 480 • Sheffield, V. C., Beck, J. S., Stone, E. M., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40 bp
481 G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction
482 results in improved detection of single-base changes. *Proceeding of the National Academy of*
483 *Sciences of the United States of American*, 86, 232-236.
- 484 • Shemekite, F., Gómez-Brandón, M., Franke-Whittle, I. H., Praehauser, B., Insam, H., and
485 Assefa, F. (2014). Coffee husk composting: An investigation of the process using molecular
486 and non-molecular tools. *Waste Management*, 34(3), 642–652.

- 487 • Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Sucession of
488 bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food*
489 *Microbiology*, 25, 951-957.
- 490 • Silva, C. F., Schwan, R. F., Dias, E. S., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during
491 maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* L. in Brazil.
492 *International Journal of Food Microbiology*, 60, 251-260.
- 493 • Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation
494 and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.
495 *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846-849.
- 496 • Sven E. L., & Walter J. D. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and
497 feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 48, 149-163.
- 498 • Teixeira, A. A., Brando, C. H. J., Thomaziello, R.A., Teixiera R., Illy, A., & Viani R. (1995),
499 (Eds.), Espresso coffee: The science of quality, Elsevier Academic Press, Italy, pp. 90-102.
- 500 • Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., De Candia, S., Lavermicocca, P. (2009).
501 Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem
502 against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger*contaminating
503 bakery products. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 438–448.
- 504 • Van Hannen, E. J., Zwart, G., Van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J., & Laanbroek, H. J.
505 (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of
506 filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*
507 65, 795-801.
- 508 • Vega, F. E., Pava-ripoll, M., Posada, F., Buyer, J. S. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea*
509 *arabica* L. *Journal Basic Microbiology*, 45, 371–380.
- 510 • Vega, F., Simpkins, A., Aime, M. C., Posada, F., Peterson, S. W., Rehner, S. A., Infante, F.,
511 Castillo, A., Arnold, A. E. (2010). Fungal endophyte diversity in coffee plants from
512 Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3(3), 122–138.

- 513 • Vilela, D. M., De M. Pereira, G. V., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010).
514 Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry
515 processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27, 1128-1135.
- 516 • Wall, G.G., Santos. V.M., (1988). A new bacterial disease of watermelon in the Mariana
517 Islands. *Phytopathology*, 78 (1605), 1-9.
- 518 • Willems, A., Goar, M., Thielemans, S., Gills, M., Kersters, K., Deley. J. (1992). Transfer of
519 several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax*
520 *avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* and *Acidovorax konjaci*.
521 *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 107–119.
- 522 • Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hota, H., Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of
523 two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov., *Ralstonia*
524 *solanacearum* (Smith, 1986) comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, 39, 897–904.
- 525 • Yaynu, H. (1989). Characteristics of isolates of *Pseudomonas solanacearum* in Ethiopia.
526 *Ethiopian journal of agricultural sciences*, 11, 7–13.
527

Figure

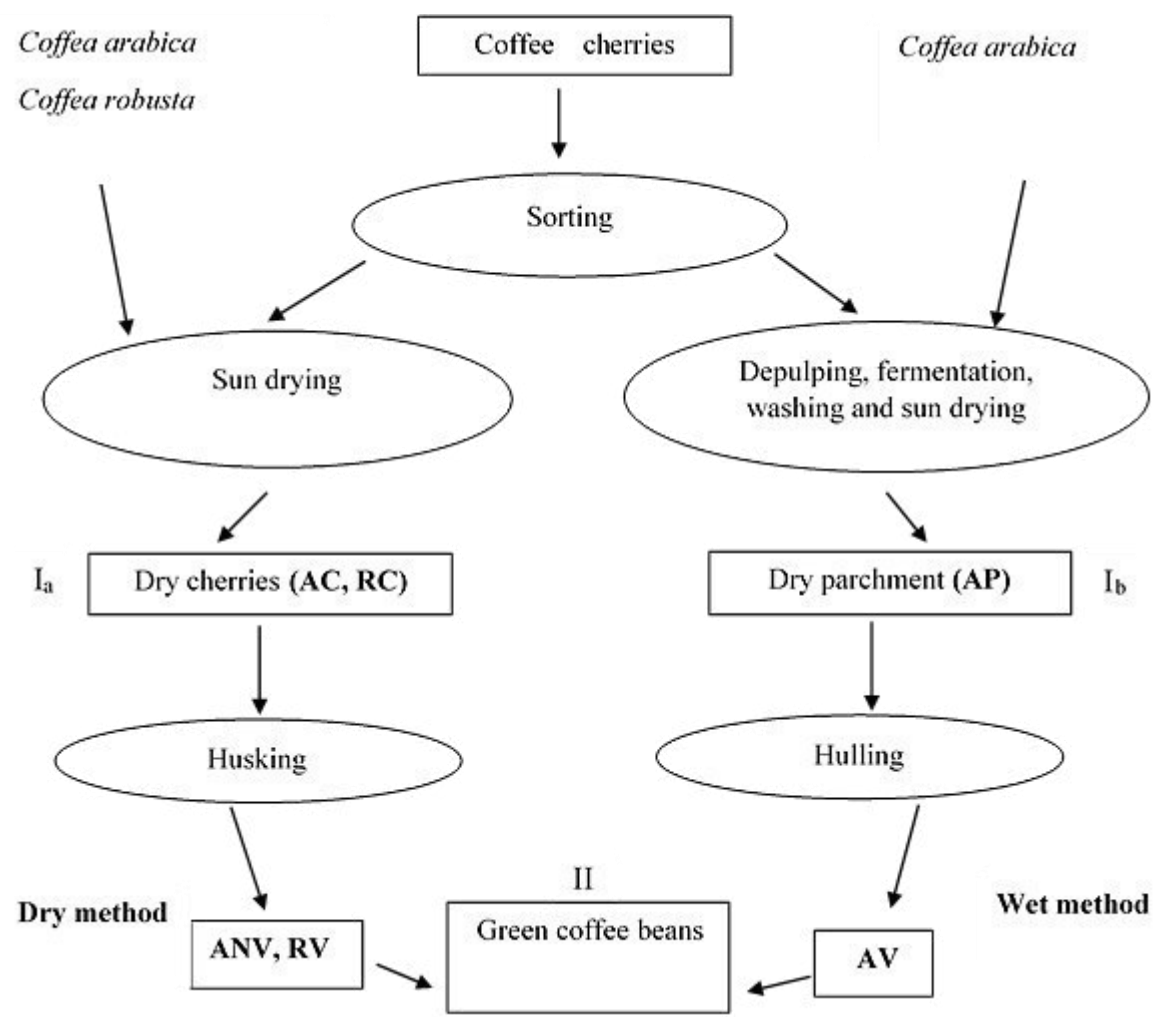


Figure 1

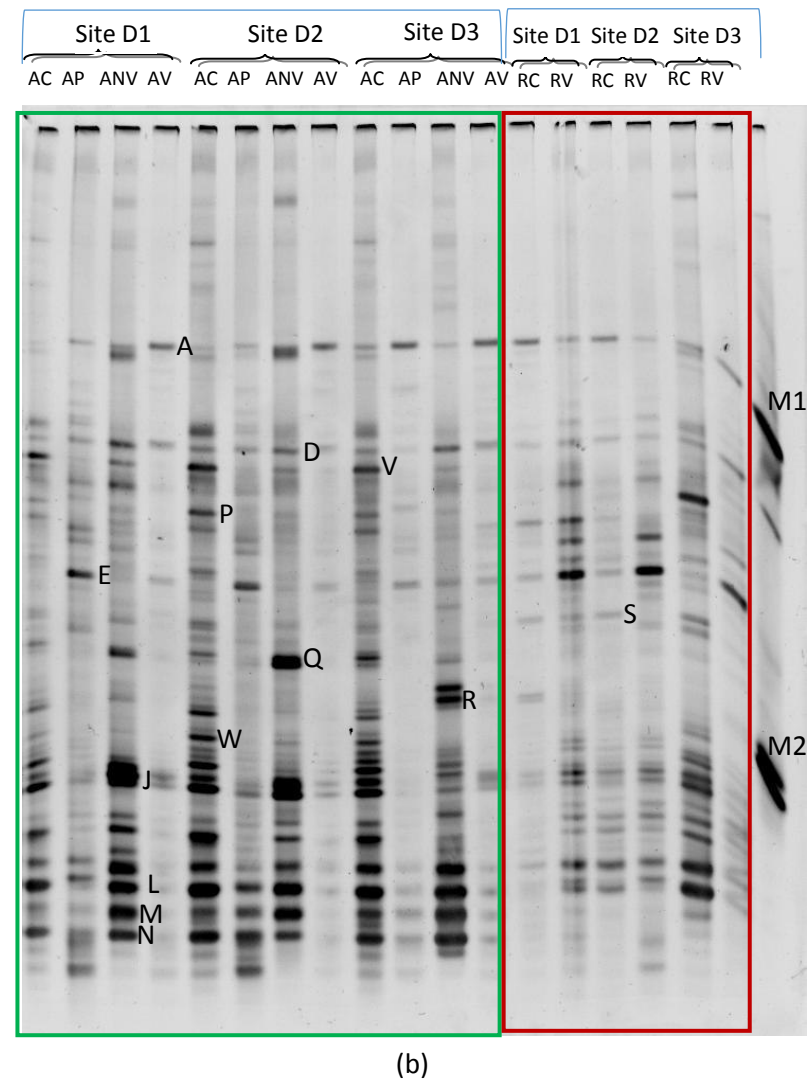
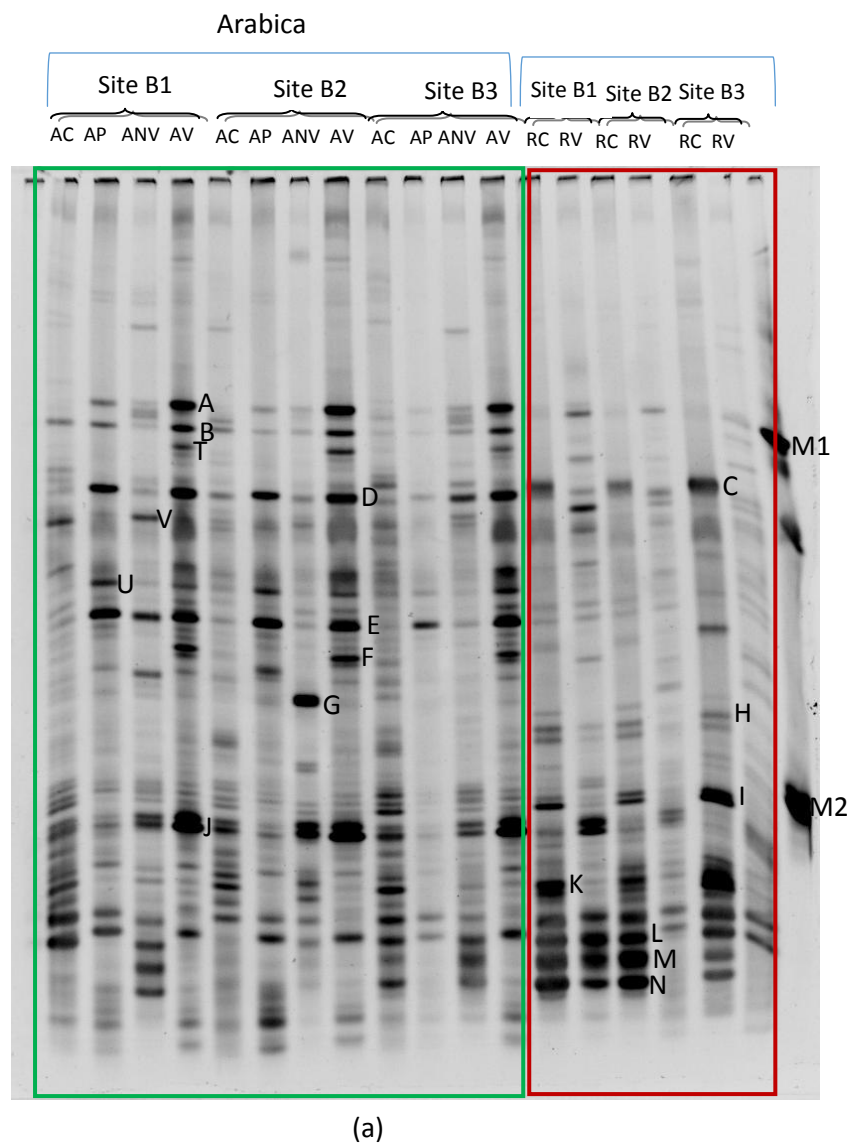


Figure 2

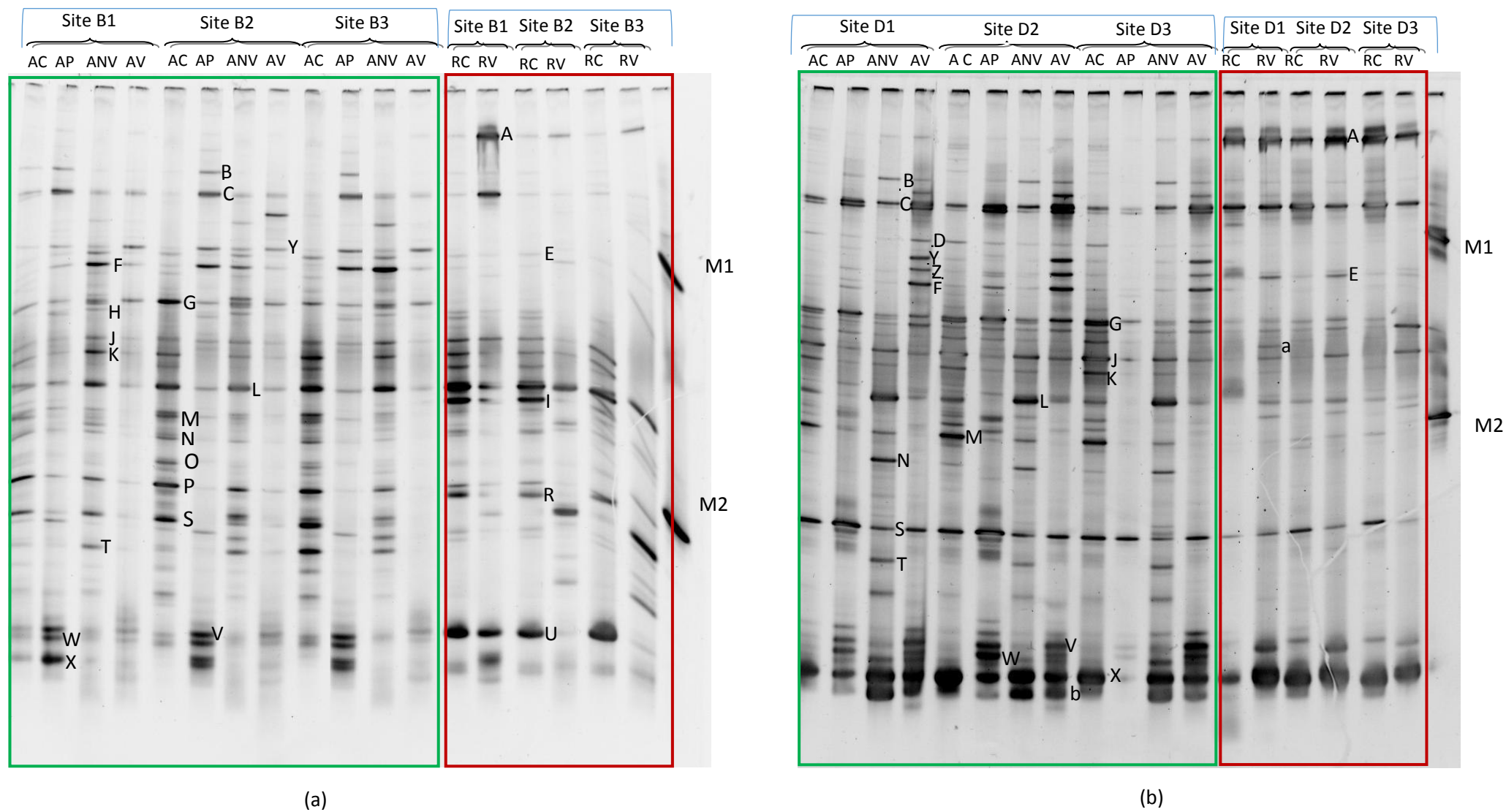
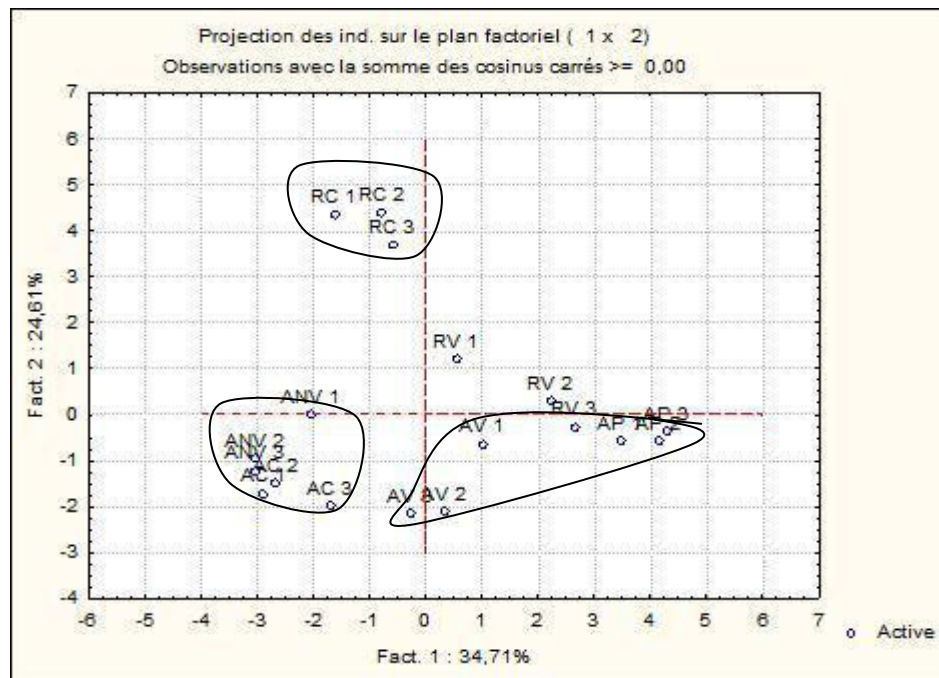
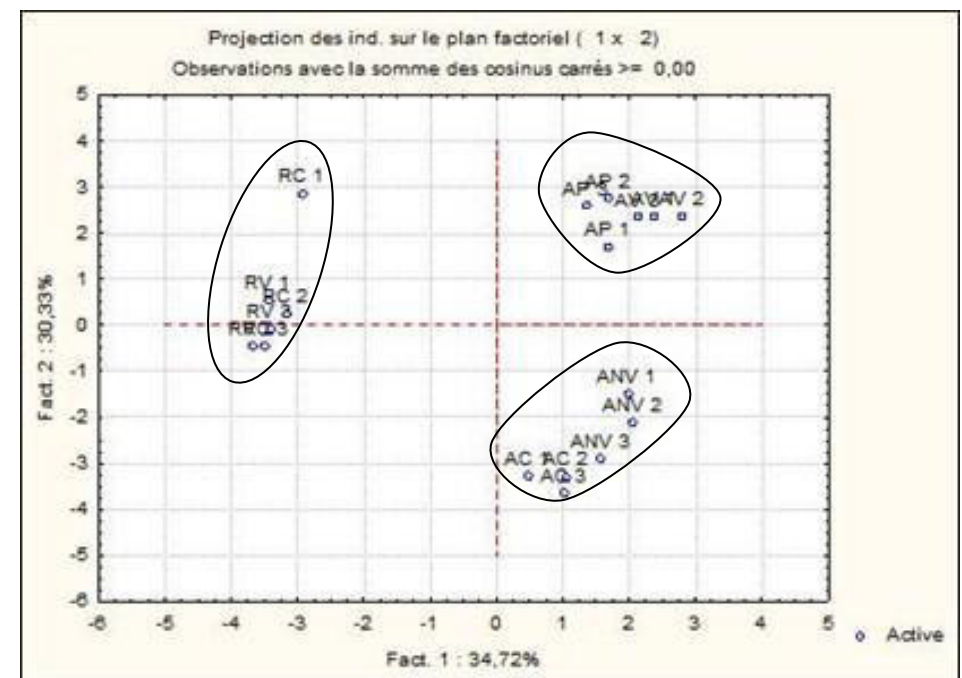


Figure 3

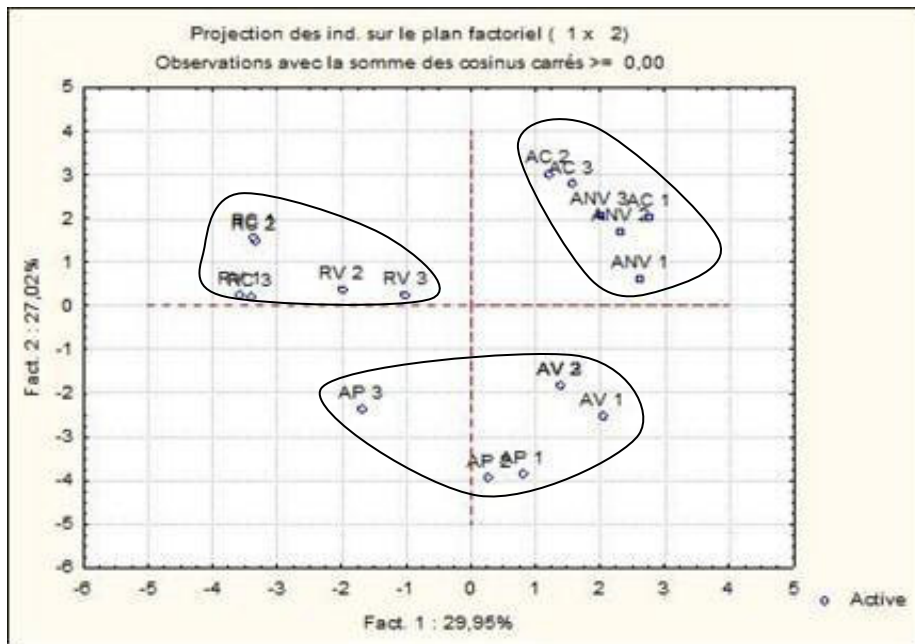


(a)

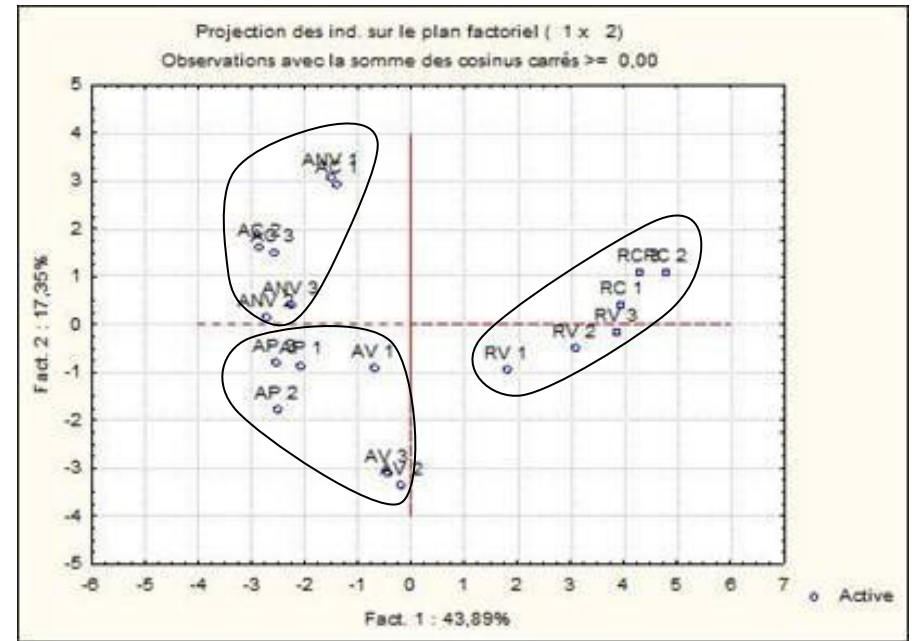


(b)

Figure 4

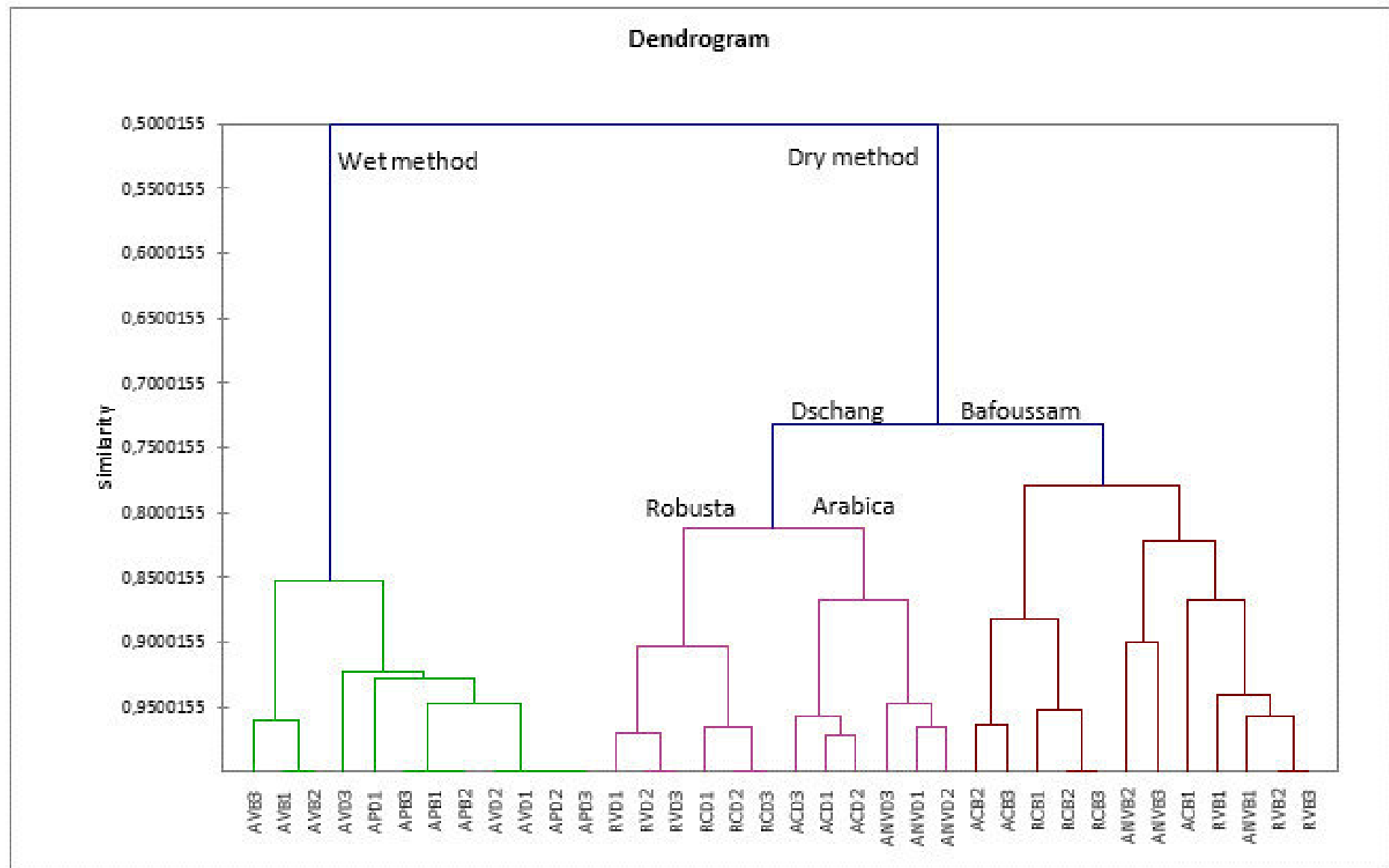


(a)



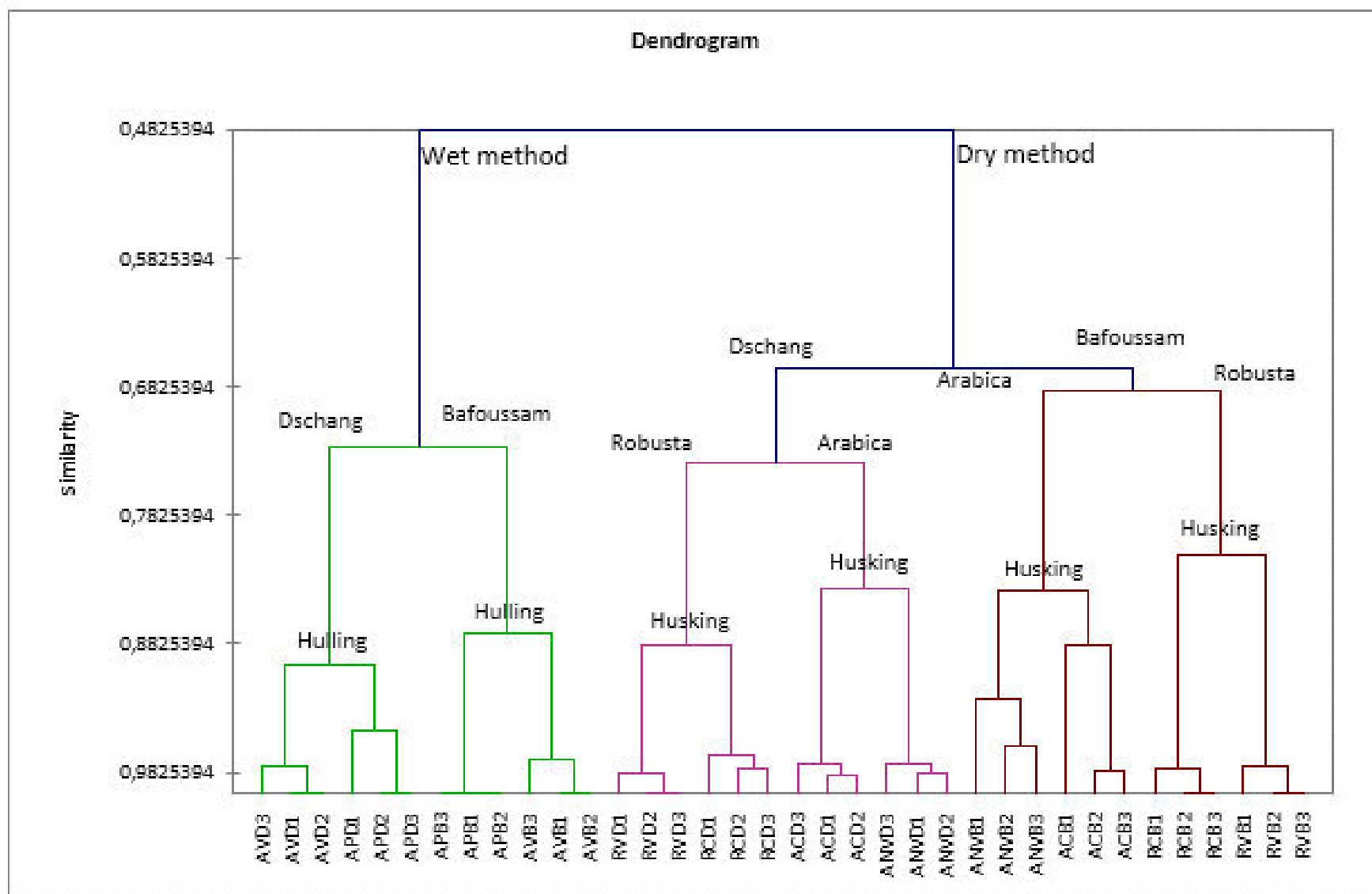
(b)

Figure 5



(a)

Figure 6



(b)

Figure 6

Figure 1: *Coffea* processing steps from fresh cherries to green coffee beans in Cameroon (Dschang and Bafoussam), I_a, I_b, II: sampling steps. AC: Arabica husk coffee, RC: Robusta husk coffee, AP: Arabica hull coffee, AV: Arabica green coffee (wet process), ANV: Arabica green coffee (dry process) and RV: Robusta green coffee (dry process).

Figure 2: Bacterial DNA DGGE profiles obtained from coffee samples during two processes in two locations from Cameroon, Bafoussam (a) and Dschang (b). Sites B1, B2 and B3 correspond to Bafoussam; Sites D1, D2 and D3 correspond to Dchang; AP: hull Arabica coffee or coffee parchment (wet method); AV: green Arabica coffee or washed coffee (wet method); AC: husk Arabica coffee or dry cherries (dry method); ANV: green Arabica coffee obtained or natural coffee (dry method); RC: husk Robusta coffee; RV: green Robusta coffee. M1: *Lactobacillus plantarum* DNA, and M2: *Escherichia coli* DNA are pure bacterial strain markers. Identification of DGGE bands for bacterial species (Table 1).

Figure 3: Fungal DNA DGGE profiles from coffee samples during two processes in two locations from Cameroon, Bafoussam (A) and Dschang (B). Sites B1, B2 and B3 correspond to Bafoussam; Sites D1, D2 and D3 correspond to Dchang; AP: hull Arabica coffee or coffee parchment (wet method); AV: green Arabica coffee or washed coffee (wet method); AC: husk Arabica coffee or dry cherries (dry method); ANV: green Arabica coffee obtained or natural coffee (dry method); RC: husk Robusta coffee; RV: green Robusta coffee. M1: *Candida apicola* DNA M2: *Lodderomyces elongisporus* DNA are pure yeast strain markers. Identification of DGGE bands for fungal species (Table 2).

Figure 4: Principal component analysis (PCA) of bacterial 16S rDNA DGGE band profiles from coffee Arabica by dry and wet method and Robusta obtained by wet method from Bafoussam (A) and Dschang (B). 1, 2 and 3: sites. AP: hull Arabica coffee or coffee parchment (wet method); AV: green Arabica coffee or washed coffee (wet method); AC: husk Arabica coffee or dry cherries (dry method); ANV: green Arabica coffee obtained or natural coffee (dry method); RC: husk Robusta coffee; RV: green Robusta coffee.

Figure 5: Principal component analysis (PCA) of fungal 26S rDNA DGGE band profiles from coffee Arabica by dry and wet method and Robusta obtained by wet method from Bafoussam (A) and Dschang (B). 1, 2 and 3: sites. AP: hull Arabica coffee or coffee parchment (wet method); AV: green Arabica coffee or washed coffee (wet method); AC: husk Arabica coffee or dry cherries (dry method); ANV: green Arabica coffee obtained or natural coffee (dry method); RC: husk Robusta coffee; RV: green Robusta coffee.

Figure 6: Ascending Hierarchical Classification (AHC) of bacterial 16S r (a) and fungal 26S r DNA (b) DGGE banding profile obtained from coffee. Sites B1, B2 and B3 correspond to Bafoussam; Sites D1, D2 and D3 correspond to Dchang; AP: hull Arabica coffee or coffee parchment (wet method); AV: green Arabica coffee or washed coffee (wet method); AC: husk Arabica coffee or dry cherries (dry method); ANV: green Arabica coffee obtained or natural coffee (dry method); RC: husk Robusta coffee; RV: green Robusta coffee.

Acetic Acid Bacteria - food
- fermentation

6

Acetic Acid Bacteria Prospective Applications in Food Biotechnology

Corinne Teyssier^{1,*} and Yasmine Hamdouche¹

1. Introduction

Acetic Acid Bacteria (AAB) play important roles in the food and beverage industry everywhere in the world. They present large interests in food and beverage production and, in particular, in vinegar making, mainly due to their ability to oxidize ethanol to acetic acid. Conversely, they are also responsible for spoilage effects in some products such as wine. This chapter describes, briefly, the biotechnological applications of AAB in the food and beverage industry.

2. AAB Taxonomy

AAB belong to the family *Acetobacteraceae* in the *Alphaproteobacteria* phylum. In the past, AAB comprised two main genera (*Acetobacter* described in 1898 and *Gluconobacter* introduced in 1935). Then, the genus *Gluconacetobacter* was created in 1997 in order to group *Acetobacter* species containing Q-10 ubiquinone as the major quinone component (Yamada et al. 1997). In recent years, the number of genus expanded very quickly due to the development of molecular phylogenetic analyses and many changes occurred in AAB taxonomy. Up to date, AAB are classified in 17 genera: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Endobacter*, *Kosakia*, *Swaminathanian*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*,

¹ Corinne Teyssier, UMR Qualisud, University of Montpellier, Yasmine Hamdouche, UMR Qualisud, Cirad, TA B-95/16, 73, rue Jean-François Breton, 34398 Montpellier cedex 5, France.

* Corresponding author: corinne.teyssier@cirad.fr

Tanticharoenia, *Ameyamaea*, *Neokomagataea*, *Komagataeibacter*, *Nguyenibacter*, and *Swingsia* (Malimas et al. 2013) and recently, two more genera have been added: *Bombella* and *Commensalibacter* (Trček and Barja 2015).

AQ: Not mentioned in References; please add details.

A brief overview of food-associated literature shows that only three genera are mostly involved in the food industry: *Acetobacter*, *Gluconobacter* (*G.*), and *Gluconacetobacter* (*Ga.*).

3. Morphology and Physiology

AAB are strictly aerobic rods or ellipsoidal shaped cells with Gram negative or Gram variable staining. The non-spore-forming cells have peritrichous or polar flagella when motile. They are catalase positive and oxidase negative. AAB are mesophilic bacteria with an optimum growth temperature range of 25°C to 30°C. Although the optimum pH growth range is 5.0 to 6.5, AAB can grow at lower pH values between 3.0 and 4.0 (Holt et al. 1994, Sievers and Swings 2005). According to the species or strains, AAB are able to transform most of the sugars and alcohols into organic acids such as acetic, citric, fumaric, lactic, malic, pyruvic, tartaric and succinic acids. Two types of membrane-bound enzymes are involved in the conversion of ethanol into acetic acid: alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) (Matsushita et al. 1994). The genus *Acetobacter* oxidizes alcohol preferentially over glucose whereas *Gluconobacter* preferentially oxidizes glucose more readily than ethanol (Gullo and Guidici 2008).

4. Culture, Identification and Molecular Typing of AAB Strains

AAB are considered as fastidious bacteria because they are difficult to isolate, cultivate and maintain in pure culture. The main media used for their culture are as follows: acetic acid bacteria (AAB) medium, *Acetobacter* medium, Glucose Yeast Extract CaCO₃ (GYC) medium, Yeast Extract Peptone Mannitol (YPM) medium and Acetic Acid Ethanol (AE) medium (Hommel et al. 2014). Many media derive from the previous media with changes only in the proportion of the different components. AAB culture on media containing CaCO₃ results in CaCO₃ degradation, forming a characteristic clear halo around the colonies due to the acid production (Cleenwerck and deVos 2008). The incubation time at 30°C on each medium varied from 24 h to 72 h according to the species and strains.

Classic biochemical identification systems commonly used for Gram-negative bacilli identification such as API 20E and API20NE systems (BioMérieux) or automated systems like VITEK 2 with ID-GNB card (BioMérieux) give unsatisfactory results for most AAB because the characteristics of these bacteria are absent from the database of these identification systems (Alauzet et al. 2010).

Molecular approaches are highly recommended for the identification of AAB. Amplification and sequencing of the 16S rRNA gene give excellent results for the identification at the genus level but are not sufficient to discriminate species in the genus (Alauzet et al. 2010). Many previous studies showed that the 16S rRNA gene is not a useful tool for species identification because the 16S rRNA gene present in

some cases allows polymorphism between species (Alauzet et al. 2010) or macro (Teyssier et al. 2003) or micro (Marchandin et al. 2003) heterogeneities which are detrimental to identification. Therefore, multilocus sequence-based analyses of housekeeping genes were performed to obtain a successful affiliation at the species level. Cleenwerck et al. (2010) defined three housekeeping genes (*dnaK*, *groEL* and *rpoB*) useful for the species differentiation in the AAB group such as *Acetobacter*, *Gluconobacter*, and *Gluconacetobacter*. This multilocus approach allowed for the reclassification of species which had been mis-identified (i.e., *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Cleenwerck et al. 2010), and the description of novel species: *Gluconacetobacter medellinensis* (Castro et al. 2013), *Gluconacetobacter maltaceti* (Slapsak et al. 2013), and *Acetobacter sicerae* (Li et al. 2014).

Closing bracket?

Strains belonging to the same AAB species could be compared with conventional molecular techniques such as Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), or repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences, Repetitive Extragenic Palindromic (REP) elements (Versalovic et al. 1991) or (GTG)₅ sequences (Versalovic et al. 1994) with conclusive and robust results. In recent years, PFGE was considered as the gold standard for AAB typing (Alauzet et al. 2010). Fernandez-Perez et al. (2010) showed that PFGE of *SpeI*-digested DNA and ERIC-PCR analysis were suitable tools for typing 103 AAB isolates from vinegars. ERIC-PCR analysis was also used to detect intra-specific variability from AAB strains isolated from Shanxi aged vinegar, a traditional Chinese cereal-based vinegar (Wu et al. 2012), present in healthy grapes from the Canary Islands (Valera et al. 2011) recovered from healthy, mold-infected and rot-affected grapes from South Australian vineyards (Mateo et al. 2014). (GTG)₅-rep-PCR permitted the study of AAB population during traditional wine vinegar production (Vegas et al. 2010) and during fermentation of cocoa beans from Ghana (De Vuyst et al. 2008).

4.1 Methods to Detect AAB and Analyze Inter-specific Diversity in Foods and Beverages

Culture-based studies comprise both phenotypic (cultural, physiological and biochemical analyses) and genotypic (16S rRNA or multilocus sequencing) approaches. Phenotypic and genotypic methods are still used to investigate cultivable microbiota of fermented foods. For example, the presence of *Acetobacter fabarum* was detected at high concentration (5.0×10^6 CFU/mL) in some Tibetan kefir grains samples (Gao et al. 2012a). Ouoba et al. (2012) detected AAB in the range of 1.2×10^5 and 1.0×10^6 CFU/g in Bandgi, a palm wine of *Borassus akeassi*, from Burkina Faso. Among these AAB strains, nine *Acetobacter* species with *Acetobacter indonesiensis* as predominant species, *Gluconobacter oxydans* strains and *Gluconacetobacter saccharivorans* were isolated.

AQ : Please confirm change in naming citation made based on two references to Gao et al. 2012.

It is generally accepted that it is very difficult to obtain correct culture from AAB strains originating from wines and vinegars. In recent years, culture-independent methods have been used primarily to assess the microbial diversity of fermented foods and beverages. These metagenomic methods circumvent the problems of Viable But Non Cultivable (VBNC) AAB. Methods based on the amplification by PCR of a short

hyper variable region of the 16S rRNA gene followed by a Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) or by a Temporal Temperature Gel Electrophoresis (PCR-TTGE) are demonstrated to be efficient and reliable for analysis of bacterial diversity in foods: raw milk (Quigley et al. 2011), vinegar (Ilabaca et al. 2008), fruits (Le Nguyen et al. 2008a, El Sheika et al. 2012), fishes (Le Nguyen et al. 2008b), etc. Thus, PCR-DGGE analysis was applied to study the importance and diversity of AAB in vinegar production (De Vero et al. 2006), in various Philippine fermented food products (Dalmacio et al. 2011), in cocoa beans from different geographical regions (Papalexandratou et al. 2011a, Lefeber et al. 2011, Hamdouche et al. 2015), in fermented onion products (Cheng et al. 2014) and during malolactic fermentation of Tempranillo wines (Ruiz et al. 2010). Real-time quantitative methods associated with TaqMan Minor Groove Binder (MGB) probes have also been successfully applied not only to study, with high accuracy, AAB diversity but also to quantify them in food products such as wine and vinegars (Torija et al. 2010, Valera et al. 2013).

The next-generation sequencing (NGS) methods such as pyrosequencing analysis (Margulies et al. 2005) are currently the most promising, accurate and reliable approaches to analyze the microbial communities because they produce thousands of genetic sequences at the same time, including sequences from uncultivable micro-organisms and those from micro-organisms present in very small numbers. Usually, the generated sequences correspond to short hyper variable regions of the bacterial 16S rRNA gene. This high-throughput sequencing method was applied to various fermented food ecosystems such as fermented dairy products (Masoud et al. 2012, Aldrete-Tapia et al. 2014), plant- (Bessmeltseva et al. 2014, Jeong et al. 2013), meat-, and fish-derived (Jung et al. 2013, Kim et al. 2014) fermented foods (Mayo et al. 2014). NGS were successfully used to detect AAB in various fermented foods such as tarag (a fermented milk of cows from Mongolia and northwest China) (Sun et al. 2014), Brazilian kefir grains (Leite et al. 2012), and water kefir from multiple sources (Marsh et al. 2013). NGS methods confirmed the presence of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation process (Illegheems et al. 2012).

Besides, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis appears to be an appropriate technique for routine microbial quality control, in particular for AAB responsible for spoilage in the beer industry (Wieme et al. 2014).

5. Natural Habitats of AAB

AAB are present everywhere in the environment, mainly in fruits and flowers. For example, the recently described *Gluconobacter kanchanaburiensis*, *Gluconobacter wancherniae*, *Gluconobacter nephelii*, were isolated respectively from a spoiled fruit of *Artocarpus heterophyllus* in Thailand (Malimas et al. 2009), from an unknown yellow fruit in Thailand (Yukphan et al. 2010), and from a tropical fruit of *Nephelium lappaceum* (Kommanee et al. 2011). Similarly, *Acetobacter okinawensis*, *Acetobacter papayae* and *Acetobacter persicus* were recovered respectively from stems of sugarcane, various fruits and a flower in Japan (Lino et al. 2012a). The very recently described genus *Neokomagataea* comprises two species *N. thailandica*

and *N. tanensis*, respectively isolated from the flowers of lantana and candel bush collected in Thailand (Yukphan et al. 2011). AAB may also propagate in food materials which contain sugar or in fermented products which contain alcohol. Sixty-four AAB strains belonging to *Acetobacter* (45 isolates), *Gluconobacter* (11 isolates) and *Gluconacetobacter* (8 isolates) genera were collected from Indonesian fruits, flowers and fermented foods (Yamada et al. 1999). An earlier study underscored that *Acetobacter* and *Gluconacetobacter* stains were recovered primarily from fermented foods, while *Gluconobacter* strains were collected mainly from fruits and flowers (Lisdiyanti et al. 2003). AAB are commonly recovered from various vinegars such as traditional kaki vinegar in Japan (Lino et al. 2012b), coconut water vinegar in Sri Lanka (Perumpuli et al. 2014), Shanxi aged vinegar, a traditional cereal vinegar in China (Wu et al. 2012), and of course, wine vinegar (Mas et al. 2014), among others. AAB were also recovered from fermented beverages such as water-kefir from United Kingdom, Canada, and the United States as a minor component (Marsh et al. 2013), but in higher amounts from other water-kefir (Gulitz et al. 2011). AAB were also present in other fermented beverages such as kombucha tea samples (Marsh et al. 2014). Two very recently described species of *Acetobacter*, *A. sicerae* and *A. lambici*, were isolated from cider and kefir respectively (Li et al. 2014) and from lambic beer (Spitaels et al. 2014). *Acetobacter* sp. strains and, in particular, *Acetobacter farinalis* was recovered from different fermented rice flours (khao-khab) and related products (Tanasupawat et al. 2011a,b).

AAB are present at all stages of wine-making, from the mature grape, through vinification to storage (Bartowsky and Henschke 2008). Indeed, AAB were isolated from grapes of South Australian vineyards (Mateo et al. 2014) and from healthy grapes from the Canary Islands (Valera et al. 2011). AAB were responsible of spoilage in grape wine (Bartowsky and Henschke 2008) and also in other fermented beverages such as beer, or soft drinks (Raspor and Goranovic 2008). The presence of AAB during cocoa fermentation was implied in the development of flavor in cocoa products (Lefebvre et al. 2012).

AQ : From which areas ?
Recommend addition of specific area where AAB was recovered as a large component from water-kefir.

6. Importance and Roles of AAB in Food and Beverage Production

AAB play not only beneficial but also undesirable roles in food and beverage production. This section presents the importance and role of AAB in foods and beverages highlighting, in particular, their worldwide economic impact (Table 1). The presence of AAB in three food products has been outlined: vinegar, wine and cocoa.

6.1 AAB and Vinegar Production

The earliest industrial application of AAB in food production corresponds to vinegar making. Vinegar is defined as the result of acetous fermentation of natural alcoholic substrates by AAB. In fact, AAB are involved secondarily after the conversion of ethanol from a carbohydrate source performed by yeasts. Various substrates could be used to produce vinegars: fruits (apple wine, grape wine, fermented juices such

Table 1. Main species of AAB recovered from foods and beverages of worldwide interest.

Food	Species	References
Vinegar (from different sources)	<i>A. aceti</i> , <i>A. cerevisiae</i> , <i>A. estunensis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. oeni</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. pomorum</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>Ga. entanii</i> , <i>Ga. europaeus</i> , <i>Ga. hansenii</i> , <i>Ga. intermedius</i> , <i>Ga. liquefaciens</i> , <i>Ga. oboediens</i> , <i>Ga. xylinus</i>	Sokollek et al. 1998, Nanda et al. 2001, De Vero et al. 2006, Haruta et al. 2006, Wu et al. 2010
Wine	<i>A. aceti</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>Ga. liquefaciens</i>	Yamada et al. 1998, Du Toit and Lambrechts 2002, Bartowsky et al. 2003, Gonzalez et al. 2004, Silva et al. 2006, Silhavy and Mandl 2006
Fermented cocoa	<i>A. aceti</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>Ga. xylinus</i> , <i>Ga. xylinus</i> subsp. <i>sucrofermentans</i>	De Vuyst et al. 2008, Camu et al. 2007, 2008, Lefeber et al. 2011, 2012, Papalexandratou et al. 2011a,b,c, 2013, Hamdouche et al. 2015
Coffee	<i>Ga. Azotocaptans</i> , <i>Ga. diazotrophicus</i> , <i>Ga. johannae</i>	Jimenez-Salgado et al. 1997, Fuentes-Ramírez et al. 2001, Madhaiyana et al. 2004

* *A.*: *Acetobacter*; *G.*: *Gluconobacter*; *Ga.*: *Gluconacetobacter*.

AQ : This citation (year, 1998) not mentioned under References. Please add details or edit year as required

as peaches and blueberries), starch (malt, rice), and spirit (Raspor and Goranovic 2008). A wide variety of vinegars are produced around the world but wine vinegar is predominant in continental Europe. Two well-defined methods could be used to produce vinegar: the traditional or 'surface method' and 'the submerged method' (Budak et al. 2014). In the 'submerged method', commonly used for commercial vinegars, AAB are submerged in the liquid substrate and constant aeration is provided to accelerate the fermentation; vinegars are ready after 24–48 hours of fermentation. The traditional method corresponds to a 'surface method', in which the AAB culture occurs on the surface of wood barrels in direct contact with atmospheric oxygen. To initiate the process, a starter culture, called 'seed vinegar' or 'mother of vinegar', obtained from a previous vinegar batch should be added. This method is time-consuming (taking several weeks) but permits the development of metabolic by-products, increasing the sensorial complexity of vinegars, thus leading to high quality vinegars. The AAB isolated during vinegar fermentations belong mainly to the genera *Acetobacter*, *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* (Table 1). Among them, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter intermedius*, *Gluconacetobacter oboediens*, and *Gluconacetobacter xylinus* were the more frequently recovered species (De Vero and Giudici 2008, Budak et al. 2014). *A. pasteurianus* was usually predominant in the production of vinegars with low acetic acid content (4–7% w/v) whereas *Gluconacetobacter* species (*Ga. xylinus*, *Ga. europaeus*, *Ga. intermedius*, and *Ga. oboediens*) were used to produce high acidity industrial vinegars (up to 15–20%) (Vegas et al. 2010). Trcek et al. (2007) showed that *Ga. europaeus* adapts to high acetic acid concentrations by modifying the phospholipid

Repetition of similar details as in Chapter 5.

contents of their cytoplasmic membrane. For mid-acidity vinegar such as traditional balsamic vinegar, *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus*, and *Ga. xylinus* were predominant species. Thus, different AAB were associated during vinegar production in order to optimize the properties of each species; *Acetobacter* spp. are better acid producers but in contrast, they can fully oxidize acetic acid to CO₂ and H₂O whereas *Gluconobacter* is unable to. The greater tolerance of *Gluconacetobacter* to acetic acid could explain its contribution in the end of processes when acetic acid content is higher. Depending on the strains, secondary fermentations often associated with acetic acid fermentation lead to typical aroma and flavor (Raspor and Goranovic 2008). Some *Ga. europaeus* strains used for rice vinegar production are known to produce an unfavorable flavor compound, acetoin. A genetic approach was successfully applied to reduce acetoin production by using the *Ga. europaeus* strain KGMA4004 (Akasaka et al. 2013). With reference to wine vinegar-associated AAB, *A. pasteurianus* appears to be predominant throughout the process (Ilabaca et al. 2008, Vegas et al. 2010). The results of AAB monitoring during traditional wine vinegar production highlighted the predominance of *A. pasteurianus* throughout the process. *Ga. europaeus*, however, increased when the acetic acid concentration was above 6% (w/v). Different AAB strains followed each other according to the acetic acid concentration (Vegas et al. 2010). AAB diversity studies performed throughout the fermentation process let us envisage the use of starter culture to improve the vinegar process control and sensory qualities.

6.2 AAB and Grape Wine Production

Wine is most often obtained by the alcoholic fermentation of grapes. Microorganisms responsible for wine fermentations are mainly yeasts present on grapes. Many microorganisms (yeasts, acetic acid bacteria and lactic acid bacteria) present on the grapes can also survive and grow in wine, constituting the wine microbial consortium (Barata et al. 2012a). The proportion of these microorganisms depends on the grape ripening stage and on the availability of nutrients.

Microorganisms such as AAB are responsible for wine spoilage which could affect wine quality. However good manufacturing practices could avoid proliferation of AAB and the production of acetic acid could be limited. For example, anaerobic conditions of the alcoholic fermentation do not permit the growth of AAB whereas higher temperature of wine storage and higher wine pH promote the growth and metabolism of AAB (Sengun and Karabiyikli 2011). Addition of sulfites in wine represents an efficient method to decrease the number of detrimental microorganisms. In a recent approach, promoting the reduction of chemicals, grape and wine phenolic extracts were successfully tested for their antimicrobial activities against frequently occurring wine spoilage AAB (Pastorkova et al. 2013). Among AAB, *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Gluconacetobacter* are the main genera involved in wine spoilage (Table 1). *Acetobacter* spp. are the dominant AAB in the final stage of sour rot while the genera *Gluconacetobacter* and *Gluconobacter* are mostly recovered from sound berries (Barata et al. 2012b). It was commonly admitted that *G. oxydans* was preferentially detected in grape must whereas *A. aceti* and *A. pasteurianus* were detected in wine. Progress performed in the intra-specific identification of AAB could partially explain that other species are currently showed to be associated with grapes or wines. These

‘novel’ species often depended on the geographical origin of wine (Silva et al. 2006, Valera et al. 2011). Recent results obtained from AAB isolated from grapes of South Australian vineyards demonstrated the presence of *Gluconobacter* genus with predominance of *G. cerinus* but also strains belonging to the species *Asaia siamensis* were isolated (Mateo et al. 2014). Wine-associated AAB were also analyzed for their potential role in malolactic fermentation resulting in main spoilage of wine caused by the well-known lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (Ruiz et al. 2010). Thus AAB community associated to grape wine varies according to the state of grape but also to the vineyards contributing to the characteristics of wine.

6.3 AAB and Cocoa Fermentation

Cocoa beans are the major raw material for chocolate production. Spontaneous fermentation of mucilaginous pulp that surrounds beans is crucial for the development of precursors of chocolate flavor (Thompson et al. 2013). Although industry of cocoa represents tremendous income for many countries, little is known about this traditional process of fermentation. Three groups of microorganisms are successively involved in 2–8 days fermentation. First, yeasts produce ethanol from carbohydrates of the pulp in absence of oxygen. The increased pH supports the growth of lactic acid bacteria, which produce lactic acid from sugars. Then, AAB whose presence is facilitated by aeration during mixing oxidize alcohol to acetic acid resulting in the death of seed embryo and liberation of endogenous enzymes implied in flavor precursors. Finally, sun drying of beans stops fermentation and permits to eliminate the detrimental acetic acid. The activity of AAB is crucial to obtain high-quality cocoa. *Acetobacter pasteurianus* but also others *Acetobacter* species (*A. syzygii*, *A. ghanensis*, *A. senegalensis*, *A. tropicalis*, etc.) as *Ga. medellinensis* (formerly *Ga. xylinus*) and *G. oxydans* are the main representatives of the AAB communities (Table 1) (De Vuyst et al. 2008, Papalexandratou et al. 2011a,b,c and 2013, Hamdouche et al. 2015). Monitoring of AAB population during fermentation and sun drying of cocoa from Ivory Coast showed a succession of different AAB species: *A. pasteurianus* and *A. syzygii* were dominant in the first half of fermentation whereas *A. tropicalis* was dominant during the later stages. Presence of *Ga. xylinus* was only detected during sun drying step (Hamdouche et al. 2015). Cocoa beans origin and fermentation practices in the farm impacted microbial community in particular AAB present during fermentation (De Vuyst et al. 2008, Papalexandratou et al. 2011a,b,c and 2013, Hamdouche et al. 2015). Currently, many studies examined the microbial communities associated to cocoa fermentation in different countries in order to choose the well-adapted strains and to produce functional starter-culture (Pereira et al. 2012, Lefeber et al. 2012, Illegghems et al. 2013, Moens et al. 2014). AAB together with yeasts and lactic acid bacteria will be certainly part of this starter-culture. The objectives are to control and improve the cocoa fermentation and to obtain the best quality cocoa.

7. Other Roles of AAB in Biotechnology

AAB play also a role in the production of commercially important molecules used in the food and pharmaceutical industries. Among the AAB, *G. oxydans* is known to be

AQ : Please confirm changes.

resourceful in particular for its enzymes, which find applications in biotechnology. For example, metabolic bioengineering research on *G. oxydans* will soon lead to replacing two time-consuming chemical processes used to produce xylitol and vitamin C (L-ascorbic acid). Xylitol represents a potential alternative to the utilization of sucrose because xylitol: (i) has the same degree of sweetness, (ii) is appropriate for diabetics, (iii) is not involved in dental caries. Xylitol can be obtained chemically but an approach involving *G. oxydans* was proposed to limit chemicals and to reduce costs. *G. oxydans* presents the ability to produce xylitol from D-arabitol due to the presence of a xylitol dehydrogenase. A two-step process was described to produce xylitol directly from D-glucose: a recombinant strain of *G. oxydans* called PXPG (the strain expresses *xdh* together with *gdh*) was used to efficiently transform xylitol from D-arabinose, generated previously by osmotic yeasts (Zhang et al. 2013). For several decades, a two-step fermentation route involving three microorganisms, including *G. oxydans*, was used at an industrial scale for the production of 2-Keto-L-gulonic acid, the direct precursor of L-ascorbic acid, from D-sorbitol. In order to reduce costs and simplify the process but preserve the excellent yield, a recombinant strain of *G. oxydans* named WSH-003, possessing genes encoding many different enzymes, was constructed (Gao et al. 2014b, Gao et al. 2014) and tested for its utilization in a one-step process.

AQ : Please confirm change in naming citation made based on two references to Gao et al. 2012.

Other *G. oxydans* strains were chosen because of the tremendous potential in terms of enzymes and their applications in industries. Mao et al. (2012) isolated from *G. oxydans* DSM-2003, a novel intracellular dextrinase, which catalyzed the synthesis of dextran from maltodextrin. Navarro-Gonzalez et al. (2012) reported the presence of a novel enzyme, arylesterase, isolated from the wine-associated *G. oxydans* strain 621H. This enzyme could be a promising biocatalyst in the variation of wine-aromas. However, the hopes riding on *G. oxydans* for the production of D-xylonate directly from D-xylose (and originating from plant biomass hydrolysates) remain unsuccessful because of reduced yields as compared to those from others microorganism (Toivari et al. 2012).

Gluconacetobacter hansenii was also studied for its ability to produce cellulose, which could be used for a variety of applications (Mohite and Patil 2014).

8. AAB as Human Opportunistic Pathogen: Consequences on Human Health?

In recent years, members of the genera *Acetobacter*, *Asaia*, *Gluconobacter* and *Granulibacter* have been recognized as emerging opportunistic human pathogens (see review of Alauzet et al. 2010). AAB such as *Acetobacter indonesiensis* (Bittar et al. 2008), *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter lannaensis*, *Asaia bogorensis* and *Gluconobacter* sp. were largely recovered from bloodstream infections or from respiratory tracts of cystic fibrosis patients (Bittar et al. 2008, Gouby et al. 2007, Abdel-Haq et al. 2009, Alauzet et al. 2010). Considering that AAB were able to grow in an acidic environment, it could explain the fact that they may specifically colonize and potentially infect the acidic liquid of respiratory tract of cystic fibrosis patients. Little is known about the mode of transmission of these bacteria to man, but

food and beverages represent a potential source of contamination. A case of bacteremia reported in an intravenous drug abuser suggests that the origin of contamination results from the use of acidic substances like vinegar or lemon juice to dilute heroin (Alauzet et al. 2010). Vigilance should be observed mainly for the immune-compromised person, given that many AAB clinical strains were multi-resistant to antibiotics (Alauzet et al. 2010).

9. Conclusion

AAB are used worldwide to produce foods and beverages. They are also involved in food and pharmaceutical industries. The tremendous progress made in the molecular methods of identification have resulted in significant advances in knowledge about AAB; this will permit better monitoring and control.

References

- Abdel-Haq, N., Savacsan, S., Davis, M., Asmar, B.I., Painter, T. and Salimnia, H. 2009. *Asaia lannaensis* bloodstream infection in a child with cancer and bone marrow transplantation. *Journal of Medical Microbiology* 58: 974–976.
- Akasaka, N., Sakoda, H., Hidese, R., Ishii, Y. and Fujiwara, S. 2013. An efficient method using *Gluconacetobacter europaeus* to reduce an unfavorable flavor compound, acetoin, in rice vinegar production. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 7334–7342.
- Alauzet, C., Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Gouby, A., Chiron, R., Rabaud, C., Counil, F., Lozniewski, A. and Marchandin, H. 2010. *Gluconobacter* as well as *Asaia* species newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 3935–3942.
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M.C., Tamplin, M.L. and Hernández-Iturriaga, M. 2014. High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology* 44: 136–141.
- Barata, A., Mafêito-Ferreira, M. and Loureiro, V. 2012a. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153: 243–259.
- Barata, A., Mafêito-Ferreira, M. and Loureiro, V. 2012b. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 154: 152–161.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, R.L. and Henschke, P.A. 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36: 307–314.
- Bartowsky, E.J. and Henschke, P.A. 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine: A review. *International Journal of Food Microbiology* 125: 60–70.
- Bessmeltseva, M., Viirad, E., Simm, J., Paalme, T. and Sarand, I. 2014. Evolution of bacterial consortia in spontaneously started rye sourdoughs during two months of daily propagation. *Plos One* 9(4): e95449.
- Bittar, F., Reynaud-Gaubert, M., Thomas, P., Boniface, S., Raoult, D. and Rolain, J.M. 2008. *Acetobacter indonesiensis* pneumonia after lung transplant. *Emerging Infectious Diseases* 14: 997–998.
- Budak, N.H., Aykin, E., Seydim, A.C., Greene, A.K. and Guzel-Seydim, Z.B. 2014. Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science* 79: 757–764.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M. and De Vuyst, L. 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1809–1824.
- Camu, N., González, Á., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J.S., Addo, S.K. and De Vuyst, L. 2008. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 86–98.
- Castro, C., Cleenwerck, I., Trček, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., Aguirre, R., Putaux, J.L. and Gañán, P. 2013. *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose producing acetic acid

- bacteria isolated from vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 1119–1125.
- Cheng, L., Luo, J., Li, P., Yu, H., Huang, J. and Luo, L. 2014. Microbial diversity and flavor formation in onion fermentation. *Food and Function* 5: 2338–2347.
- Cleenwerck, I. and De Vos, P. 2008. Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology* 125: 2–14.
- Cleenwerck, I., De Vos, P. and De Vuyst, L. 2010. Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) comb. nov., *International Journal of Systematic and Applied Microbiology* 60: 2277–2283.
- Dalmacio, L.M., Angeles, A.K., Larcia, L.L., Balolong, M.P. and Estacio, R.C. 2011. Assessment of bacterial diversity in selected Philippine fermented food products through PCR-DGGE. *Beneficial Microbes* 2: 273–281.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Land, S. and Giudici, P. 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23: 809–813.
- De Vero, L. and Giudici, P. 2008. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 125: 96–101.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P. and Cleenwerck, I. 2008. Validation of the (GTG)_n-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology* 125: 79–90.
- Du Toit, W.J. and Lambrechts, M.G. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74: 57–64.
- El Sheikh, A.F., Durand, N., Sarter, S., Okullo, J.B.L. and Montet, D. 2012. Study of the microbial discrimination of fruits by PCR-DGGE: Application to the determination of the geographical origin of *Physalis* fruits from Colombia, Egypt, Uganda and Madagascar. *Food Control* 24: 57–63.
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S. and Ruiz-Larrea, F. 2010. Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiology* 27: 973–978.
- Fuentes-Ramírez, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E.T., Martínez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1305–1314.
- Gao, J., Gu, F., Abdella, N.H., Ruan, H. and He, G. 2006a. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas from China. *Journal of Food Science* 77: 425–433.
- Gao, L., Zhou, J., Liu, J., Du, G. and Chen, J. 2012b. Draft genome sequence of *Gluconobacter oxydans* WSH-003, a strain that is extremely tolerant of saccharides and alditols. *Journal of Bacteriology* 194: 4455–4456.
- Gao, L., Hu, Y., Liu, J., Du, G., Zhou, J. and Chen, J. 2014. Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulonic acid from D-sorbitol. *Metabolic Engineering* 24: 30–37.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A. and Guillaumon, J.M. 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96: 853–860.
- Gouby, A., Teyssier, C., Vecina, F., Marchandin, H., Granolleras, C., Zorziotti, I. and Jumas-Bilak, E. 2007. *Acetobacter cibaiongensis* bacteremia in human. *Emerging Infectious Diseases* 13: 784–785.
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. 2011. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology* 151: 284–288.
- Gullo, M. and Giudici, P. 2008. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology* 125: 46–53.
- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K.B.D., Montet, D. and Meile, J.C. 2015. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Control* 48: 117–122.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M. and Igarashi, Y. 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar

AQ : Please confirm change ; refer to citation on page 114.

AQ : Please confirm change ; refer to citation on page 120.

- assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109: 79–87.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. pp. 71–84. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (ed.). Maryland, U.S.A.
- Hommel, R.K. 2014. *Acetobacter*. pp. 3–10. In: *Encyclopedia of Food Microbiology—Second edition*. (ed.) Academic Press, Elsevier.
- Ilabaca, P., Navarrete, P., Mardones, J. and Romero, A. 2008. Mas application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology* 126: 245–249.
- Illegheems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z. and Weckx, S. 2012. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *Plos One* 7(5): e38040.
- Illegheems, K., De Vuyst, L. and Weckx, S. 2013. Complete genome sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well-adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem. *BMC Genomics* 14: 526–540.
- Jeong, S.H., Lee, S.H., Jung, J.Y., Choi, I.J. and Jeon, C.O. 2013. Microbial succession and metabolite changes during long-term storage of kimchi. *Journal of Food Science* 78(5): M763–9.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M.A., Martinez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3676–3683.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Lee, H.J. and Jeon, C.O. 2013. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: Traditional Korean salted seafood. *Food Microbiology* 34: 360–368.
- Kim, H.J., Kim, M.J., Turner, T.L., Kim, B.S., Song, K.M., Yi, S.H. and Lee, M.K. 2014. Pyrosequencing analysis of microbiota reveals that lactic acid bacteria are dominant in Korean flat fish fermented food, gajami-sikhae. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 78: 1611–1618.
- Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. and Yamada, Y. 2011. *Gluconobacter nephelii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the class *Alphaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 2117–2122.
- Lefebvre, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N. and De Vuyst, L. 2011. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology* 28: 457–464.
- Lefebvre, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N. and De Vuyst, L. 2012. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavor of chocolates produced thereof. *Food Microbiology* 30: 379–392.
- Leite, A.M.O., Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Peixoto, R.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F. and Delgado, S. 2012. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology* 31: 215–221.
- Le Nguyen, D.D., Gemrot, E., Loiseau, G. and Montet, D. 2008a. Determination of citrus fruit origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on clementine from Morocco and Spain. *Fruits* 63: 3–9.
- Le Nguyen, D.D., Ngoc, H.H., Dijoux, D., Loiseau, G. and Montet, D. 2008b. Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on Pangasius fish from Viet Nam. *Food control* 19: 454–460.
- Li, L., Wieme, A., Spitaels, F., Balzarini, T., Nunes, O.C., Manaia, C.M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Clewerck, I. and Vandamme, P. 2014. *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir, and identification of species of the genus *Acetobacter* by *dnaK*, *groEL* and *rpoB* sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2407–2415.
- Lino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. and Uchimura, T. 2012a. *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov. and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *Journal of General and Applied Microbiology* 58: 235–243.
- Lino, T., Suzuki, R., Tanaka, N., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. and Uchimura, T. 2012b. *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from a traditional Japanese fruit vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1465–1469.

- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. 2003. Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiology and Culture Collections* 19: 91–98.
- Madhaiyana, M., Saravanamb, V.S., Jovic, D.B.S.S., Leea, H., Thenmozhid, R., Harie, K. et al. 2004. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiological Research* 159: 233–243.
- Malimas, T., Yukphan, P., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K.-I., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. 2009. *Gluconobacter kanchanaburiensis* sp. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium for Thai isolates in the *Alphaproteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 247–254.
- Malimas, T., Chaipitakchonlatarn, W., Thi Lan Vu, H., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Tanasupawat, S., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. 2013. *Swingsia samuiensis* gen. nov., sp. nov., an osmotolerant acetic acid bacterium in the *Proteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 59: 375–384.
- Mao, X., Wang, S., Kan, F., Wei, D. and Li, F. 2012. A novel dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans* DSM-2003: purification and properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168: 1256–1264.
- Marchandin, H., Teyssier, C., Siméon de Buochberg, M., Jean-Pierre, H., Carrière, C. and Jumas-Bilak, E. 2003. Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: Implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology UK* 149: 1493–1501.
- Margulies, M. et al. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Marsh, A.J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P. and Cotter, P.D. 2013. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters* 348: 79–85.
- Marsh, A.J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P. and Cotter, P.D. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology* 38: 171–178.
- Mas, A., Torija, M.J., García-Parrilla, M.C. and Troncoso, A.M. 2014. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *The Scientific World Journal* 2014: 394671.
- Masoud, W., Vogensen, F., Lillevang, S., Al-Soud, W., Sørensen, S. and Jakobsen, M. 2012. The fate of indigenous microbiota, starter culture, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheese determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 153: 192–202.
- Mateo, E., Torija, M.J., Mas, A. and Bartowsky, E.J. 2014. Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 178: 98–106.
- Matsushita, K., Toyama, H. and Adachi, O. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in microbial physiology* 36: 247–301.
- Mayo, B., Rachid, C.T., Alegria, A., Leite, A.M., Peixoto, R.S. and Delgado, S. 2014. Impact of next-generation techniques in food microbiology. *Current genomics* 15: 293–309.
- Moens, F., Lefeber, T. and De Vuyst, L. 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 80: 1848–1857.
- Mohite, B.V. and Patil, S.V. 2014. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 61: 101–110.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. and Murooka, Y. 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentations of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 986–990.
- Navarro-Gonzales, I., Sanchez-Ferrer, A. and Garcia-Carmona, F. 2012. Molecular characterization of a novel arylesterase from the wine-associated acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10789–10795.
- Ouoba, L.I.I., Kando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B. and Sutherland, J.P. 2012. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1428–1441.
- Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G. and De Vuyst, L. 2011a. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology* 28: 964–973.

- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J.C., Amores, F., Daniel, H.-M. and De Vuyst, L. 2011b. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa beans fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7698–7714.
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P. and De Vuyst, L. 2011c. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology* 28: 1326–1338.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O.S., Daniel, H.-M. and De Vuyst, L. 2013. *Hanseniospora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology* 35: 73–85.
- Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Nokakova, J., Vadlejch, J. and Kokoska, L. 2013. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 161: 209–213.
- Pereira, G.V., Da Cruz Pedrozo Miguel, M.G., Ramos, C.L. and Schwan, R.F. 2012. Microbiological and physiological characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 5395–5405.
- Perumpuli, P.A., Watanabe, T. and Toyama, H. 2014. Identification and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria strains isolated from coconut water vinegar in Sri Lanka. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 78: 533–541.
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Cotter, P.D. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150: 81–94.
- Raspor, P. and Goranovic, D. 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 28: 101–124.
- Ruiz, P., Seseña, S., Izquierdo, P.M. and Palop, M.L. 2010. Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1555–1562.
- Sengun, I.Y. and Karabiyikli, S. 2011. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control* 22: 647–656.
- Sievers, M. and Swings, J. 2005. Family II. *Acetobacteraceae*. pp. 41–95. In: G. Garrity, D.L. Brenner, N.R. Krieg and J.T. Staley (eds.). *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. Springer New York.
- Silhavy, K. and Mandl, K. 2006. *Acetobacter tropicalis* in spontaneously fermented wines with vinegar fermentation in Austria. *Mitteilungen Klosterneuburg* 56: 102–107.
- Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A. and Velázquez, E. 2006. *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 21–24.
- Slapšak, N., Cleenwerck, I., De Vos, P. and Trček, J. 2013. *Gluconacetobacter maltaceti* sp. nov., a novel vinegar producing acetic acid bacterium. *Systematic and Applied Microbiology* 36: 17–21.
- Sokollek, S.J., Hertel, C. and Hammes, W.P. 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 935–940.
- Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L. and Vandamme, P. 2014. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *Plos One* 9(4): e95384.
- Sun, Z., Liu, W., Bao, Q., Zhang, J., Hou, Q., Kwok, L., Sun, T. and Zhang, H. 2014. Investigation of bacterial and fungal diversity in Tarag using high-throughput sequencing. *Journal of Dairy Science* 97: 6085–96.
- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. and Yamada, Y. 2011a. *Acetobacter farinalis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 57: 159–167.
- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Yukphan, P., Nakagawa, Y. and Yamada, Y. 2011b. Identification of *Acetobacter* strains from Thai fermented rice products based on the 16S rRNA gene sequence and 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer restriction analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 2652–2659.

- Teyssier, C., Marchandin, H., Siméon de Buochberg, M., Ramuz, M. and Jumas-Bilak, E. 2003. Atypical 16S rRNA gene copies in *Ochrobactrum intermedium* strains reveal a large genomic rearrangement by recombination between *rrn* copies. *Journal of Bacteriology* 185: 2901–2909.
- Thompson, S.S., Miller, K.B., Lopez, A. and Camu, N. 2013. Cocoa and coffee. pp. 881–889. In: M.P. Doyle and R.I. Buchanan (eds.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC.
- Toivari, M.H., Nygard, Y., Penttilä, M., Ruohonen, L. and Wiebe, M.G. 2012. Microbial D-xylonate production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 1–8.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamon, J.M. and Mas, A. 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 27: 257–265.
- Trcek, J., Jernejc, K. and Matsushita, K. 2007. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* 11: 627–635.
- Valera, M.J., Laich, F., Gonzalez, S.S., Torija, M.J., Mateo, E. and Mas, A. 2011. Diversity of acetic acid bacteria present in healthy grapes from the Canary Islands. *International Journal of Food Microbiology* 151: 105–112.
- Valera, M.J., Torija, M.J., Mas, A. and Mateo, E. 2013. *Acetobacter malorum* and *Acetobacter cerevisiae* identification and quantification by real-time PCR with TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 36: 30–39.
- Vegas, C., Mateo, E., Gonzalez, A., Jara, C., Guillamon, J.M., Poblet, M., Torija, M.J. and Mas, A. 2010. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology* 138: 130–136.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823–6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25–40.
- Wieme, A.D., Spitaels, F., Aerts, M. and De Bruyne, K. 2014. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology* 185: 41–50.
- Wu, J.J., Gullo, M., Chen, F.S. and Giudici, P. 2010. Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Current in Microbiology* 60: 280–286.
- Wu, J.J., Ma, Y.K., Zhang, F.F. and Chen, F.S. 2012. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of ‘Shanxi aged vinegar’ a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology* 30: 289–297.
- Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequence of 16S ribosomal RNA: The elevation of subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61: 1244–1251.
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T. and Komagata, K. 1999. Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *Journal of General and Applied Microbiology* 45: 23–28.
- Yamada, Y. 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedium* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedium* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2225–2227.
- Yukphan, P., Malimas, T., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K.-I., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. 2010. *Gluconobacter wancherniae* sp. nov., an acetic acid bacterium from isolates in the *Alphaproteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 56: 67–73.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. 2011. *Neokomagataea* gen. nov., with descriptions of *Neokomagataea thailandica* sp. nov. and *Neokomagataea tanensis* sp. nov., osmotolerant acetic acid bacteria of the α -*Proteobacteria*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 75: 419–426.
- Zhang, J., Li, S., Xu, H., Zhou, P., Zhang, L. and Ouyang, P. 2013. Purification of xylitol dehydrogenase and improved production of xylitol by increasing XDH activity and NADH supply in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 2861–2867.

Please check spelling.
This is the name in the
title of the article

Résumé

Le cacao et le café sont les produits agricoles les plus échangés dans le monde. Ils subissent de nombreuses transformations post-récolte au niveau des pays producteurs (tropicaux) avant d'être exportés. Les procédés de traitements post-récolte diffèrent d'un pays à l'autre voire d'un agriculteur à l'autre. La transformation technologique du cacao en fèves marchandes et des grains de café en café vert nécessite un processus primaire de manutention. Ces pratiques participent et influencent, en général, la qualité marchande et organoleptique des produits destinés à la transformation. Notre hypothèse de travail est que les différents procédés de transformation post-récolte appliqués sur le café et le cacao ont une influence sur la structure des communautés microbiennes. L'objectif principal était de pouvoir mesurer cet effet en réalisant l'analyse globale des communautés microbiennes en utilisant un outil de biologie moléculaire, la PCR-DGGE (Amplification par PCR couplée à l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant). Cette technique a été associée au séquençage afin d'identifier les espèces microbiennes majoritaires. Cette étude a montré que les communautés microbiennes associées aux grains de café et aux fèves de cacao varient au cours des différentes étapes pour chaque type de traitement post-récolte appliqué. Notre approche a permis de discriminer les voies de traitements, et l'origine géographique du café Camerounais et Indonésien. Notamment, nous avons montré que l'origine géographique et l'espèce de café utilisée ont un impact sur l'écologie microbienne du café moins important par rapport à celui du procédé.

L'application au cacao nous a permis de relier l'analyse globale de l'écologie microbienne (DGGE) à l'analyse des composés volatils (SPME-GC-MS) afin de discriminer les différents traitements post-récolte. Des micro-fermentations ont été réalisées avec des souches microbiennes isolées du cacao (*L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* et *P. mashurica*) dans le but d'identifier l'origine des composés volatils détectés sur le cacao fermenté. Notre étude a contribué à montrer que la fermentation combinée à une courte durée de stockage avant fermentation est le procédé qui permet d'obtenir des fèves contenant plus de composés aromatiques désirables sur le cacao. Une analyse statistique a permis de combiner les résultats des deux types d'analyses (écologie microbienne et composés aromatiques) et de créer des relations entre les espèces détectées et les composés volatils présents. Les profils aromatiques identifiés ont permis d'envisager l'utilisation des souches testées comme starters de culture pour la fermentation du cacao.

Mots clés

Communautés microbiennes, PCR-DGGE, Café, Cacao, Procédés post-récolte, Composés aromatiques

Abstract

Cocoa and coffee are the most traded agricultural commodities in the world. They undergo many post-harvest transformations in producing countries (tropical) before being exported. Post-harvest processes differ from one country to another and from one production site to another. The technological transformation of cocoa on commercial beans and of coffee to green coffee requires a primary process handling. These practices play a crucial role in global and organoleptic quality of the products that will be processed. Our work hypothesis is that different post-harvest processing applied to coffee and cocoa have an influence on the structure of microbial communities. The main objective was to measure this effect by performing a global analysis of microbial ecology using a molecular biology tool (PCR-DGGE, PCR amplification coupled to denaturing gradient gel electrophoresis). This technique allows variations in microbial communities to be detected and the main microbial species to be identified by sequencing.

Our approach permitted to discriminate treatments, and the geographical origin of Cameroonian and Indonesian coffees. Notably, we showed that geographical origin and coffee species have a minor impact on the structure of the microbial communities when compared to the type of process used (wet or dry).

By applying the approach to cocoa, we could link the global analysis of microbial ecology (PCR-DGGE) to the analysis of volatile compounds (SPME-GC-MS) to discriminate the different post-harvest treatments. Micro-fermentation were carried out with strains isolated from cocoa (*L. fermentum*, *A. pasteurianus*, *P. kudriavzevii* and *P. mashurica*) in order to identify the origin of the volatile compounds detected in the fermented cocoa. This study contributed to show that fermentation combined with a short storage duration before fermentation is the best method to obtain cocoa beans with more desirable aromatic compounds. The statistical analysis was used to combine the results of both types of analyzes (microbial ecology and aromatic compounds) and get relations between the detected microbial species and volatile compounds. The identified aromatic profiles prompted us to consider the use of the tested microbial strains as starter culture for cocoa fermentation.

Keywords

Microbial communities, PCR-DGGE, Coffee, Cocoa, post-harvest process, Aroma compounds.