

ETUDE DE LA QUALITE PHYSICO-CHIMIQUE ET MYCOLOGIQUE DU CACAO (*THEOBROMA CACAO*) PRODUIT DANS LES ZONES DE YAMOUSSOUKRO ET SOUBRE (Côte d'Ivoire)

[Study of physicochemical and mycologic quality of *Theobroma Cocoa* product in Yamoussoukro and Soubré (Côte d'Ivoire)]

Ama Kouakoubla Agnès KOUADIO¹⁻², Sadat AW², Nogbou Emmanuel ASSIDJO¹, and Lucien Patrice KOUAME²

¹Laboratoire des Procédés Industriels et de Synthèses des Energies Nouvelles (LAPISEN) Institut National Polytechnique Houphouët Boigny Bp1313 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire

²Laboratoire de Biocatalyse et des Bioprocédés de l'Université Nangui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire), 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Cocoa beans are the principal raw material of chocolate manufacture. The beans are subject to post-harvest treatments in the first stage in chocolate production. The current study is designed to investigate the incidence of mycoflora in cocoa beans samples collected from Yamoussoukro and Soubré (Côte d'Ivoire) and the presence of ochratoxinogenic fungi on these samples using direct and dilution techniques. In this work, we evaluated the correlation between physicochemical factors (moisture content and pH) and fungi and mycotoxins contamination. This study highlights the physicochemical composition of cocoa beans, fungal contamination frequency and the fungus population description in different samples of cocoa beans. Our results revealed that the fungi contamination frequency varies according to physicochemical factors; on the one hand it increases proportionally to the moisture content. On the other hand, it decreases with the increase of pH rate. Mycotoxicologically, these results revealed the importance of the initial rate of pollution with a ochratoxinogenic species, as it reflects the risk of the toxic impregnation, in other words, the higher the rate is, the more considerable the risk of finding mycotoxins in foodstuffs is.

KEYWORDS: Côte d'Ivoire, cocoa, contamination, pH, fungal, ochratoxinogenic.

RÉSUMÉ: Les fèves de cacao sont la matière première principale dans la fabrication du chocolat. Elles subissent des traitements post-récoltes dans les premières étapes de la production du chocolat. Cette étude a été réalisée pour étudier l'incidence de microflore sur les échantillons de fèves de cacao collectés à Yamoussoukro et à Soubré (Côte d'Ivoire) et révéler la présence des moisissures ochratoxigéniques par la méthode directe et de dilution. Dans ce travail nous avons évalué le rapport entre les facteurs physicochimiques (humidité, pH..) et la contamination fongique et ochratoxigénique. Nos travaux ont permis de mettre en évidence les caractéristiques physicochimiques des fèves de cacao et la fréquence de contamination fongique ; puis la description de la population fongique dans nos différents échantillons de fèves de cacao. Les résultats obtenus montrent que la fréquence de contamination fongique varie en fonction des paramètres physicochimiques; elle augmente proportionnellement à la valeur de l'humidité, en revanche, elle diminue avec l'augmentation de la valeur du pH. Du point de vue mycotoxicologique, ces résultats mettent en évidence l'importance du taux initial de la pollution par une espèce ochratoxigénique car il reflète le risque d'imprégnation toxinique c'est-à-dire plus le taux sera élevé, plus le risque de trouver les mycotoxines dans un aliment à des niveaux élevés sera important.

MOTS-CLEFS: Côte d'Ivoire, cacao, qualité, pH, teneur en eau, contamination, ochratoxigène, *A. ochraceus*.

1 INTRODUCTION

Le cacao est un ingrédient très important dans les produits pharmaceutiques ainsi que dans différentes sortes d'aliments, tels que les tourteaux, les biscuits, les confiseries à base de chocolat, le chocolat à tartiner, les boissons au cacao, les aliments pour enfants, les glaces ainsi que les sucreries [1]. Les pays d'Afrique de l'ouest tel que le Ghana, le Nigeria et la Côte d'Ivoire produisent deux-tiers du cacao dans le monde [2]. La Côte d'Ivoire est le premier exportateur mondial de fèves de cacao qui constitue un produit agricole de rente de grande importance économique pour celle-ci [3].

La transformation technologique en chocolat et produits dérivés du cacao nécessite un processus primaire de manutention post-récolte comprenant l'écabossage, la fermentation et le séchage [4]; [5]. De nos jours, l'un des problèmes généralisés dans les pays de l'Union Européenne est la qualité et la sécurité alimentaire. En effet, des dispositions légales et réglementaires sont actuellement prises au niveau international par le Codex Alimentarius (CAC) [6] et certains partenaires au développement pour le renforcement des exigences de sécurité alimentaire, en particulier au niveau de l'Union Européenne en vue de protéger les consommateurs des effets néfastes des contaminants chimiques et des mycotoxines, notamment de l'ochratoxine A (OTA) [7]. En Côte d'Ivoire, la production de cacao est dominée par les petits exploitants. La libéralisation de la filière cacao en Côte d'Ivoire a conduit à l'abandon des vergers, à la réduction de la production de cacao et, le plus inquiétant, à l'augmentation des parasites qui donnent lieu à une dégradation significative de la qualité de fèves de cacao [8]. Ce qui a pour conséquence la baisse de la qualité des fèves.

Dans tous les pays chauds et humides, les conditions météorologiques et agronomiques sont favorables à la croissance des champignons et en conséquence à la détérioration de la qualité des aliments. La contamination par les moisissures de la nourriture humaine et animale est difficile à prévoir, car elle dépend d'une interaction complexe de facteurs tels que la température, l'humidité, espèces fongiques endogènes, les conditions et le temps de stockage [9]. Or les conditions de traitement des aliments et en particulier le cacao sont difficilement contrôlées dans les pays tropicaux. La contamination par les champignons est donc possible en de nombreux points critiques de la chaîne de production de cacao [10]. L'activité fongique peut se traduire par la contamination des mycotoxines et pourrait poser un risque pour la santé des consommateurs [11], [12]. Les mycotoxines sont principalement produites par les espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* qui peuvent contaminer les cabosses et les fèves de cacao [13]. Dans le cacao, des traitements post-récoltes mal effectués peuvent conduire à la diffusion des moisissures telles qu'*Aspergillus* et *Penicillium* responsables de la production d'ochratoxine A (OTA) par exemple [14].

L'ochratoxine A est un métabolite secondaire produit par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* [15], qui peut être présent dans une denrée alimentaire même lorsque la moisissure visible n'est pas apparente. L'OTA est caractérisée comme néphrotoxique, immunotoxique, tératogène et cancérigène [16], [17], [18], [19]. Elle se positionne déjà comme une sérieuse menace pour le cacao ivoirien. L'OTA est un contaminant alimentaire qui, si rien n'est fait, pourrait discréditer au niveau du marché mondial, divers produits de consommation « made in Côte d'Ivoire » [20]. Plusieurs études antérieures ont signalé la présence d'ochratoxine A dans le cacao et divers sous-produits [21], [22], [1]. En Côte d'Ivoire, cette mycotoxine (OTA) a été trouvée dans le cacao de deux zones de production et les ports ivoiriens [23], [24].

Il existe un potentiel important pour les champignons filamenteux à croître dans les fèves de cacao en provoquant sa détérioration et compromettant sa qualité par la production de mycotoxines. En Côte d'Ivoire, les informations disponibles sur la présence naturelle de moisissures dans les premières étapes de transformation des fèves de cacao restent insuffisantes. Il est donc important d'identifier les contaminants fongiques dans les fèves de cacao, car certaines moisissures peuvent développer et produire l'ochratoxine A.

L'objectif premier de la présente étude est d'isoler et identifier d'une part des souches de moisissures contaminant naturellement les fèves de cacao en particulier les champignons ochratoxinogéniques afin d'apprécier la qualité marchande des fèves, et d'autre part, d'étudier les paramètres physicochimiques en vue de connaître l'environnement dans lequel se développent les moisissures productrices de l'OTA.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL

L'étude a été réalisée sur des fèves de cacao de la variété Forastero. Ces fèves proviennent de deux zones de production de la Côte d'Ivoire (Soubré et Yamoussoukro).

2.2 MÉTHODES

2.2.1 ECHANTILLONNAGE

Cinq cent vingt-huit (528) échantillons de fèves de cacao (*Theobroma cacao*) ont été recueillis auprès de coopératives agricoles de Soubré et Yamoussoukro. Ces échantillons prélevés durant la période de Décembre 2009 à Février 2010, comprenaient 27 échantillons d'écabossage, 158 échantillons de différentes périodes de fermentation (1 à 6 jours), 241 échantillons de différentes périodes de séchage (1 à 8 jours) au soleil sur claie, en serre et aire cimentée et 102 échantillons stockés dans des sacs en jute (2 à 7 jours).

2.2.2 ZONE D'ÉTUDE

Deux régions productrices de cacao en Côte d'Ivoire, caractérisées par la diversité des conditions climatiques au cours de la récolte et leur rendement dans la production de cacao, ont été sélectionnées pour l'étude. Les régions sont les suivantes: (i) Soubré, zone centre ouest, région pluvieuse tempérée avec une moyenne de 26-27°C et 29-65 mm / mois de précipitations, une altitude modérée en dessous de 600 m, grande région de production de cacao (ii) Yamoussoukro, zone centre, une région pluvieuse chaude modérée avec une moyenne de 25-24°C et 15-36 mm/mois de précipitations, une altitude à 213 m, petite région de production de cacao.

2.2.3 DÉTERMINATION DU TAUX D'HUMIDITÉ

La détermination de la teneur en eau est effectuée par une dessiccation de l'échantillon dans une étuve (Mermert, Germany) réglée à 105 ±2°C jusqu'à une masse constante. Une tare (Pt) est séchée et pesée. Par la suite, 5 g d'échantillon sont mis dans la tare et pesés (Po). L'ensemble est placé dans l'étuve pendant 3 h puis refroidit dans un dessiccateur pendant 15 min. Il est ensuite pesé jusqu'à l'obtention d'un poids constant (P1). Le taux d'humidité (TH (%)) est calculée par différence relative des masses de prise d'essai avant et après séchage à l'étuve [25].

$$TH(\%) = \frac{(P_0 - P_t) - (P_1 - P_t)}{(P_0 - P_t)} \times 100 \quad (1)$$

2.2.4 MESURE DU PH

Pour l'estimation de l'acidité ou l'alcalinité, un échantillon de 20 g est additionné à une solution de 100 mL d'eau distillée bouillante. Après un refroidissement sous agitation continue, la mesure du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre de type Agimatic-N [26].

2.2.5 ANALYSE MYCOLOGIQUE

La numération de la population fongique a été réalisée par inoculation en surface du milieu Pomme de terre Dextrose Agar au chloramphénicol (Merck). L'inoculum est obtenu par trempage de 10 g fèves de cacao dans 90 mL d'une solution d'eau peptonée stérile (0,1% w/v) pendant 10 min. Des dilutions décimales ont été réalisées puis 0,1 mL de chaque dilution a été étalé sur le milieu [27]. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 25°C pendant 5 à 7 jours.

Après incubation, les fèves présentant une croissance fongique ont été isolées sur Czapek Yeast Extrait Agar (CYA) (Merck) et Yeast extract Agar (YES) (Merck) [28]. L'identification des champignons potentiellement ochratoxinogènes, fondée à la fois sur les caractères macroscopiques (diamètre de la colonie, la couleur, l'exsudat et production de pigment soluble) et microscopiques, a été effectuée suivant les clés [29]; [30]; [31]; [32]; [33]. La fréquence d'isolement (Fr) et la densité relative (RD) des espèces sont calculées selon [34]:

$$Fr(\%) = \frac{\text{Nombre d'échantillons par espèce ou genre}}{\text{nombre total d'échantillons}} \times 100 \quad (2)$$

$$RD(\%) = \frac{\text{Nombre d'échantillons avec une espèce ou d'un genre}}{\text{Nombre totale de champignons isolés}} \times 10 \quad (3)$$

Le taux de contamination (N) est calculé selon [35]:

$$N = \frac{\sum C}{V \times n \times d} \quad (4)$$

N = nombre d'unités formants colonies par gramme d'échantillon (UFC/g).

$\sum C$ = la somme de toutes les colonies des boîtes de comptage.

V = le volume de dilution étalé par boîte en ml.

n = nombre des boîtes qui peuvent être évaluées.

d = facteur de dilution.

2.2.6 ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique des valeurs a été réalisée avec le logiciel Statistica 7.1.

3 RÉSULTATS

3.1 ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET PRESENCE DES MOISSURES DANS LES FEVES DE CACAO

L'analyse des paramètres physico-chimiques des fèves de cacao révèle que des taux d'humidité varient de l'écabossage au stockage. Les teneurs en eau diminuent dans les fèves tout au long des phases de traitements. Elles sont de l'ordre de $56 \pm 3,48$ % à l'ouverture des cabosses et $7 \pm 1,76$ % pendant le conditionnement. La perte d'eau dans les fèves est considérable lors du passage de la fermentation au séchage.

Les valeurs moyennes du pH des différents échantillons des fèves de cacao sont comprises entre $4,7 \pm 0,27$ et $5,4 \pm 0,42$.

La figure 1 montre le rapport entre les paramètres physico-chimiques et la fréquence de contamination durant les différentes phases de traitement post-récolte. La fréquence de contamination (FC) varie en fonction des paramètres physicochimiques (TH, pH). Elle diminue au fur à mesure que les fèves de cacao perdent de l'eau tandis que le pH augmente au cours du traitement post-récolte. Les moisissures évoluant dans ce milieu connaissent une prolifération de leur nombre à la fermentation, puis une légère baisse au séchage avant chuter au stockage. Quant au pH, il chute à la fermentation avant de remonter jusqu'au stockage.

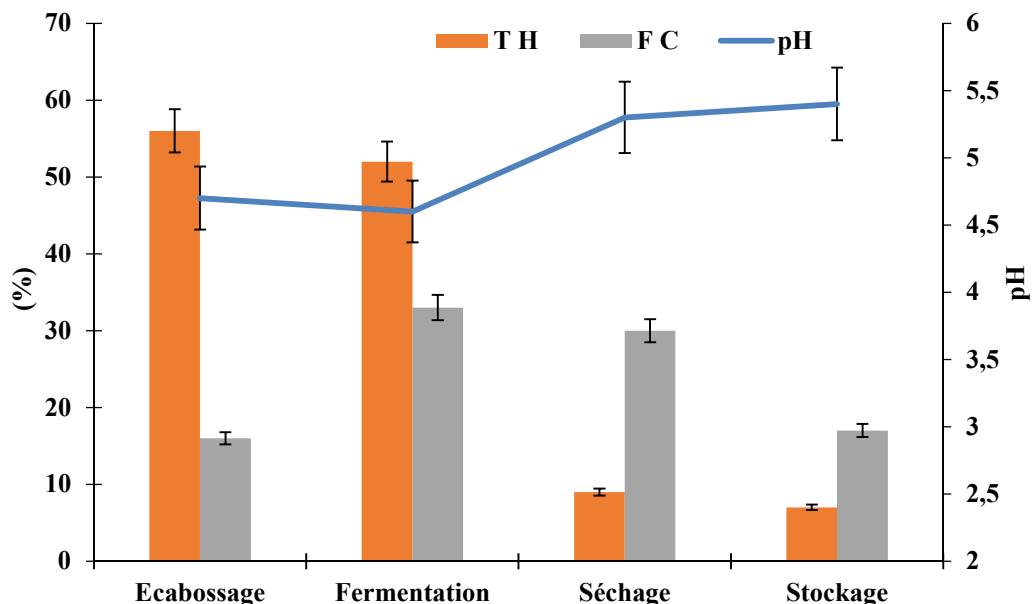


Figure 1 : Rapport entre les paramètres physico-chimiques et la fréquence de contamination

3.2 ETUDE DE LA MICROFLORE

L'étude des caractères macroscopiques portant sur la couleur, l'aspect de colonie et le revers des boîtes, et microscopiques dont la forme du thalle et des spores des souches fongiques isolées, a permis d'identifier les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* et *Fusarium*. La figure 2 montre quelques souches de moisissures isolées des différents échantillons observées au microscope optique (HM-Lux 3) au grossissement X100.

Suivant les clefs d'identification de [28] et [30], l'espèce *Penicillium chrysogenum* a été identifiée. Pour le genre *Aspergillus*, les espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* et *Aspergillus ochraceus* ont été identifiées. Du point de vue diversité des souches isolées, il n'y avait pas de différence significative entre les échantillons de fèves de cacao analysés dans les deux zones.

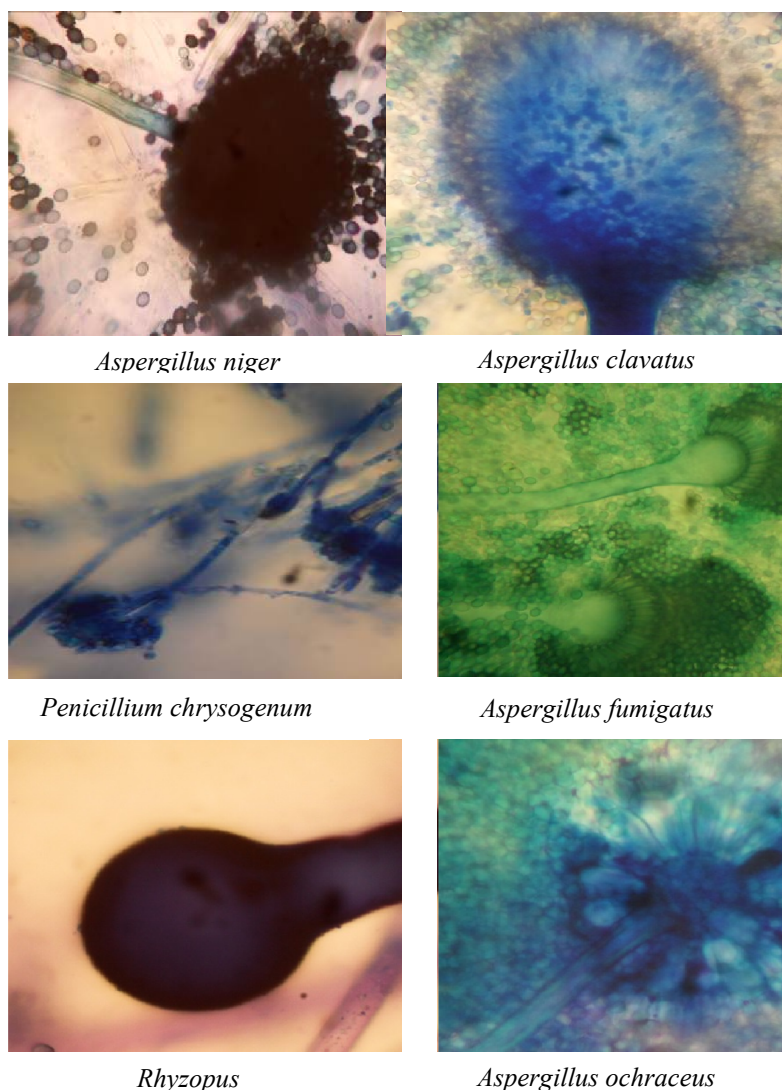


Figure 2 : Aspect microscopique des souches au grossissement optique(X100).

L'utilisation du milieu PDA a permis de révéler les mêmes souches fongiques dans les deux zones (Soubré et Yamoussoukro) (Figure 2 et 3). Les échantillons de fèves de cacao sont contaminés par différentes moisissures. 78,91 % des contaminations sont le fait des *Mucors*, 54,05 % pour *Aspergillus*, 30,4% pour *Penicillium* et le genre *Fusarium* 21,81%. Les résultats de l'analyse mycologique ont montré quelle que soit la zone, une nette dominance du genre *Aspergillus*. Le genre *Aspergillus* présente le plus grand nombre d'espèces isolées des fèves de cacao dont *A. niger* et *aggregats* (36,54%) a été

isolé le plus régulièrement suivie par *A. flavus* (22,64%), *A. fumigatus* (16,98%), *A. versicolor* (13,21%), *A. carbonarius* (4,97%), *A. ochraceus* (3,77%) et *A. clavatus* (1,89%).

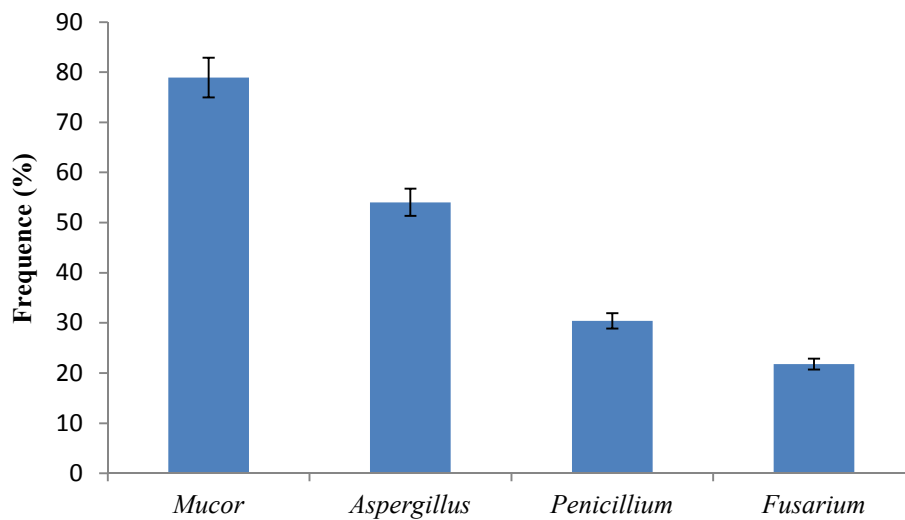


Figure 2 : Microflore des fèves de cacao détectée sur milieu PDA

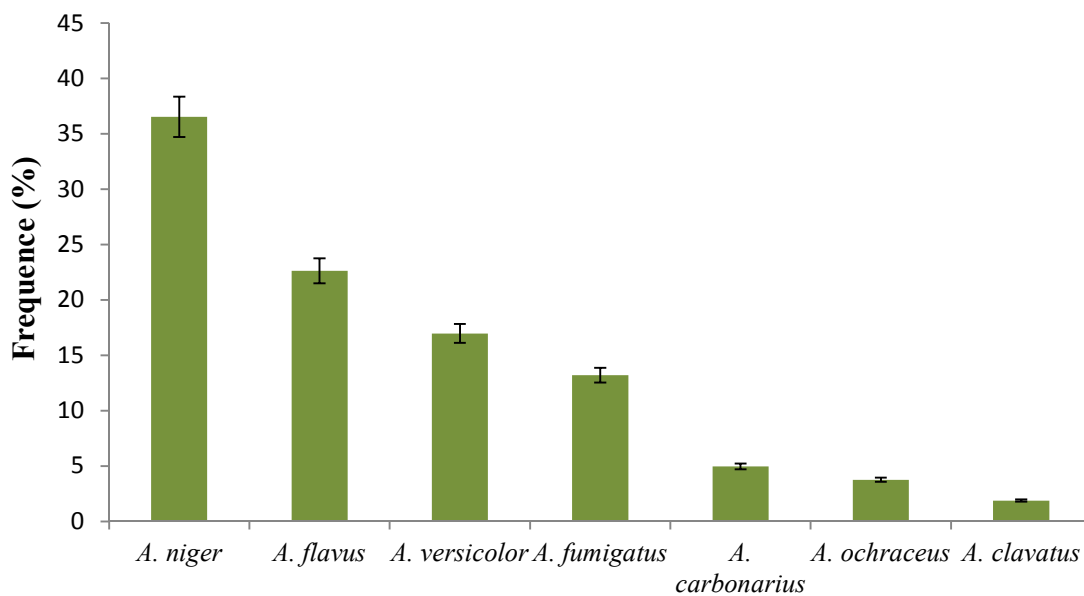


Figure 3 : Fréquence d'observation des espèces d'*Aspergillus*.

Le tableau 1 nous présente la quantité de moisissure déterminée au cours du traitement post-récolte. La charge fongique totale, ainsi que les différentes souches fongiques apparues sur les fèves de cacao témoignent d'un taux de contamination par une flore fongique élevée ($\times 10^2$ UFC/g). Ce taux est de l'ordre $68,28 \times 10^2$ UFC/g. Le taux de contamination des fèves de cacao provenant de Soubré est plus élevé que celui de Yamoussoukro. La fermentation est l'étape pendant laquelle le taux de moisissure est plus élevé au cours du traitement.

Tableau 1 : Quantité de moisissures déterminée dans les différentes zones

	Soubre (UFC/g)	Yamoussoukro(UFC/g)
Ecabossage	06,10. 10 ² ±1.5	03,96. 10 ² ±0.9
Fermentation	15,51.10 ² ±3,09	10,14.10 ² ±2,09
Séchage	12,03 .10 ² ± 0.5	7,89 .10 ² ±0,21
Stockage	7,12 .10 ² ± 0,21	5,53. 10 ² ± 0,14

3.3 ETUDE MYCOTOXICOLOGIQUE

L'analyse des fèves de cacao a mis en évidence la présence de moisissures ochratoxigéniques tout au long des phases de traitement. *Aspergillus ochraceus* et les *Aspergillus* noirs sont potentiellement ochratoxinogènes. Les *Aspergillus* noirs présents sont composés d'*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* et *aggregats* La présence de ces moisissures est observée dès le début des opérations post-récoltes.

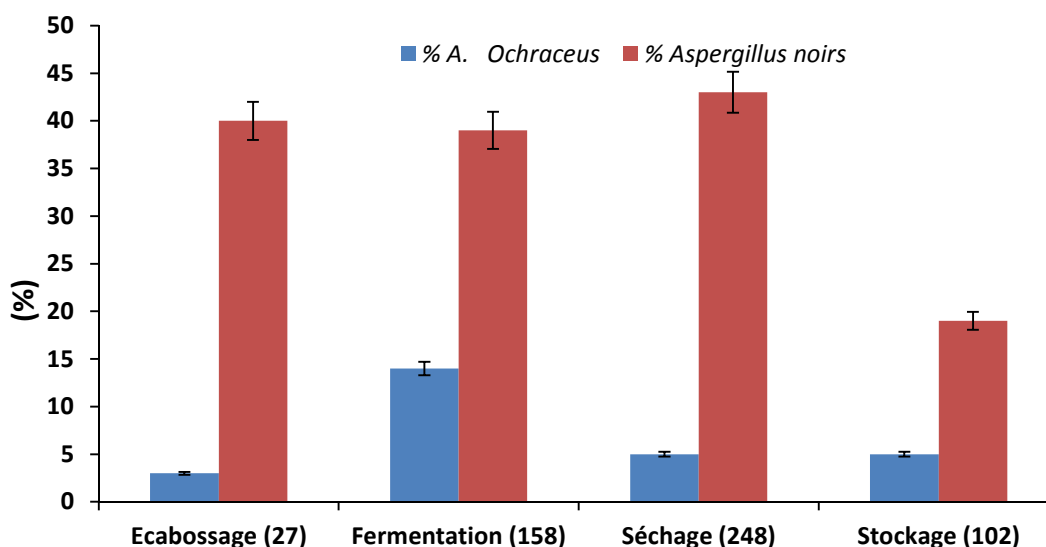


Figure 3: Fréquence de contamination par les moisissures ochratoxigéniques.

3.4 DISCUSSION

Les traitements post-récoltes qui vont de la récolte au stockage sont un enchaînement de phases (récolte, fermentation et séchage, stockage) responsables de la production d'un cacao marchand. Lors de la contamination des fèves de cacao, les paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production de toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en microflore, la présence de fèves brisées, le taux d'humidité élevé, le pH et la température de stockage des fèves [36].

Les résultats attribués à la qualité physico-chimique indiquent que le pH des différents échantillons de fèves de cacao est acide (4,7-5,4). A ce pH, les fèves de cacao sont un substrat favorable à la prolifération des moisissures et par conséquent d'acidifier le substrat. En effet, Selon [37], les champignons peuvent se développer à des pH compris entre 3 et 8 avec un optimum de croissance compris entre 5 et 6.

Le taux d'humidité qui est la quantité d'eau libre disponible dans l'échantillon est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique de l'aliment notamment mycologique. Les résultats obtenus indiquent que plus le taux d'humidité est élevé plus le pourcentage de contamination est accru. Ce rapport peut s'expliquer par le fait que la majorité des moisissures préfèrent des taux d'humidité élevés [38]; en particulier en phase de fermentation où les fèves sont exposées.

Il est su que le facteur qui limite l'augmentation de moisissures et la production de la toxine est l'activité de l'eau dans les aliments [39]. Cependant, le séchage est l'étape du traitement au cours duquel l'eau dans les fèves est éliminée, avec une réduction de l'humidité initiale de 56% à 9%. Cette étape est importante parce qu'en plus d'arrêter le processus de l'acidification qui commence dans la fermentation, elle permet de sécher des fèves. De plus, les processus chimiques qui ont

lieu à l'intérieur de la fève donnent la couleur, le goût et la senteur particulière de chocolat [40]. La réduction de l'humidité des fèves à 7% est importante car elle permet aussi d'éviter la prolifération de moisissures qui peuvent contaminer les fèves pendant le stockage.

Au stockage, les fèves de cacao contiennent une teneur en eau de 7%. Les faibles teneurs en humidité de nos fèves en fin de traitement permettent de classer les fèves de cacao dans la catégorie des produits peu hydratés; avantage qui n'exclut pas leur contamination par une flore fongique xérotolérante prépondérante [41]. La disponibilité en eau a une influence déterminante sur le développement du champignon notamment dans les denrées peu hydratées comme le cacao marchand. [42]. La diminution de l'activité de l'eau réduit le nombre de concurrents dus à la sensibilité élevée des bactéries et levures à la basse disponibilité de l'eau [43]. Cependant beaucoup de produits pauvres en eau libre tel que le cacao marchand non altérables par les bactéries peuvent donc être altérés par les champignons [37].

Les moisissures contaminant les fèves de cacao sont mal connues. Dans des études précédentes, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Absidia* et particulièrement *Aspergillus* ont été fréquemment isolés dans les fèves de cacao [44], [3], [45]. La dominance des *Aspergillus* semble être favorisée par l'humidité élevée dans les fèves de cacao et l'acidité. La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminée des aliments a été reportée dans plusieurs travaux notamment dans les céréales [46],[47]. Presque toutes les espèces des moisissures récupérées dans le travail actuel peuvent être considérées comme des moisissures saprophytes et de stockage. Les autres genres de mucorales et *Fusarium* isolés sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol [48]. En effet, quelques moisissures pouvant entamer la détérioration proviennent des champs tandis que d'autres prolifèrent après la récolte lorsque les défenses principales de la plantes sont réduites ou éliminées.

Des différences au niveau des taux de moisissures contaminants de fèves du cacao ont aussi été constatées entre les zones d'étude. Nos résultats sont identiques à ceux de [3]. En effet, ces auteurs ont trouvés des différences au niveau du taux de moisissures dans leurs zones de prélèvement (Alépé, Duékoué et Soubré). Cette différence pourrait être influencée parfois par les conditions climatiques, le stockage (humidité, température et système de ventilation) et l'installation d'une charge fongique importante, ce qui peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la microflore [49].

[50] rapportent que la contamination fongique des céréales au champ ou pendant le stockage est directement liée aux conditions hydrothermiques. Les résultats suggèrent donc que les différences météorologiques entre les zones d'étude seraient responsables des différences entre les taux de contamination. Les taux élevés dans la zone de Soubré sont probablement dû à l'humidité stagnante qui est plus 70%. La second raison est en rapport avec la mauvaise gestion de la récolte. Dans l'ensemble, le taux de contamination élevé, ainsi que la biodiversité assez importante constatée dans le cacao pourraient s'expliquer par l'état des feves, les méthodes de travail (fermentation et séchage) et les conditions de stockage [45].

Du point de vu mycotoxicologique, la présence d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus noirs* (*A. carbonarius* et *A. niger*) et surtout d'*A. ochraceus*, implique un risque de production de mycotoxine. Ces résultats mettent en évidence l'importance du taux initial de la pollution par une espèce toxinogène et reflètent le risque d'imprégnation toxémique, c'est-à-dire, plus le taux sera élevé et plus le risque de trouver les mycotoxines dans un aliment à des niveaux élevés sera important (Gwladly et Tap, 2004)[51][40]. *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *A. niger* isolés et identifiés lors de nos analyses sont potentiellement capables de produire de l'OTA. Dans notre travail, les *Aspergillus* ochratoxigéniques ont été isolés des fèves durant les différentes étapes post récoltes. Cette contamination pourrait provenir du fait que lorsque les cabosses sont semi-ouvertes, les fèves de cacao sont en contact direct avec l'air et le sol, source possible d'*A. carbonarius*, *A.niger* et *A.ochraceus*. Des travaux sommaires sur la mycoflore des fèves de cacao et le milieu de l'exploitation ont montré que les champignons capables de produire l'OTA étaient présents dans les échantillons de fèves et dans le milieu et le matériel agricole [52]. Cela nous confirme l'hypothèse selon laquelle la contamination par ces moisissures peut être effectuée à toutes les étapes post-récoltes. Nos résultats concordent aussi avec ceux obtenus d'autres auteurs tel que [53] dans leurs études sur le cacao au Brésil. En effet, les 92 isolats de *A. carbonarius* et les 10 isolats issus de *Aspergillus* section *Circumdati* (6 *A. melleus*, 2 *A. ochraceus* et 2 *A. westerdijkiae*) étaient capables de produire de l'OTA. Il en est de même pour [54]. Leurs résultats ont montré que les échantillons positifs à la présence ochratoxigénique et d'altération fongique étaient dû uniquement à *A. niger* et *A. ochraceus*. [55], [56], [57] dans leurs travaux ont montré la capacité d'*A. carbonarius*, *A.niger* et *A.ochraceus* à produire de l'OTA dans le café. Ces moisissures ont donc le potentiel de produire de l'OTA dans le cacao.

Les températures optimales de production de la toxine par les espèces d'*Aspergillus* ochratoxinogènes sont autour de 20°C avec une activité d'eau (Aw) comprise entre 0,86 et 0,98 [58]. Généralement, une valeur de 17% à 18% d'humidité pour la plupart des grains est équivalent à une activité d'eau (Aw) comprise entre 0,80 à 0,83. Les fèves du cacao sont très hygroscopiques, elles peuvent absorber l'humidité pendant leur stockage et transport. Or, le taux d'humidité critique dans les

fèves de cacao est autour de 6 et 8%, équivalent à une Aw de 0,75 à 0,85 [59] Par conséquent, les conditions rendent favorables l'augmentation de moisissures sur les fèves et de la production de l'ochratoxine A possible.

4 CONCLUSION

Les paramètres physico-chimiques tels que le pH et l'humidité constituent des facteurs importants dans la croissance des microorganismes notamment les moisissures. Depuis la récolte jusqu'au stockage, plusieurs paramètres doivent être pris en compte tels que les méthodes de travail des paysans, les instruments utilisés et le lieu de stockage. La présence de moisissures telles que *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* productrice d'OTA dans le cacao ivoirien est un danger pour celui-ci. La démarche qualité pour un contrôle sanitaire des fèves depuis sa récolte, lors du stockage et jusqu'à sa transformation en chocolat serait le meilleur moyen de prévention et de gestion du risque au niveau de la filière cacao.

REMERCIEMENTS

Nous sommes reconnaissants envers le Département de Formation et de Recherche en Génie Chimique et Agro-Alimentaire de l'INPHB de Yamoussoukro pour les équipements de laboratoire.

REFERENCES

- [1] Tafuri, A., Ferracane, R., Ritieni, A. (2004) Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chem.* 88:487-494.
- [2] Anon. (2004) Annual report for 2001/ 02. International Cocoa Organization; [http s://ww w.aginternet work .net/http ://www.icco.org](http://www.w.aginternet.net/http://www.icco.org).
- [3] Guehi, T.S., Konan, Y.M., Koffi-Nevry, R.N'Dri, D.Y., Manizan, N.P. (2007) Enumeration and Identification of Main Fungal Isolates and Evaluation of Fermentation's Degree of Ivorian Raw Cocoa Beans. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1, 479–486.
- [4] Timbie D. J., Sechrist L., P. G. Keeney. (1978) Application of high pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *J Food Sci*43 : 560 – 565.
- [5] Thompson S.S., Miller K.B., A. S. Lopez. (2001) Cocoa and coffee. In: Doyle M. J., Beuchat, L.R., Montville T.J. (Eds.). *Food Microbiology Fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 721 -733.
- [6] FAO. (2003) Réglementations relatives mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003. *Etude FAO Alimentation et Nutrition* 81. 188 p.
- [7] Mills L. (2004) Etude de Stratégie de Prévention de la Contamination du café et du cacao par l'Ochratoxine A en Côte d'Ivoire. Rapport final janvier 2004. 1-76 p.
- [8] DGTCP (Direction Générale du Trésor et de la Comptabilité Publique de Cote d'Ivoire) (2004) Commercialisation du cacao: La Cote d'Ivoire s'apprête à relever le défi de la certification. Article 140 online <http://www.tresor.gov.ci/actualites>. Accessed 08 / 02 / 2006.
- [9] Chelack W .S.,J.Borsa,R. Marquardt, A.A.Frohlich. (1991) Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus var. alutaceus* NRRL3174. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2492-2496.
- [10] Magan, N., Aldred, D. (2005) Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants* 22, 10–16.
- [11] Stinson, E.E., S.F. Osman, E.G. Heisler, J. Siciliano, D.D. Bills (1981) Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 29: 790-792.
- [12] Naresh, M., R. Hope, V. Cairns, D. Aldred (2003) Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 723-730.
- [13] Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabanes, F.J. (2003) *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from Spanish market. *Journal of Food Protection* 66, 504–506.
- [14] Bastide, P.; Fourny, G.; Durand, N.; Petithuguenin, P.; Guyot, B.; Gilmour, M.; Lindblom, M. (2006) Identification of Ochratoxin A Sources during Cocoa Post-Harvest Processing: Influence of Harvest Quality and Climatic Factors. In *Proceeding of 15th Intl Cocoa Research Conference, San Jose, Costa Rica, 9–17 October*.
- [15] Pittet, A., Royer, D. (2002) Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 ug/kg. *J. Agric. Food Chem.* 50: 243-247.

- [16] Boorman, G. A., Hong, H. L., Dieter, M. P., Hayes, H. T., Pohland, A. E., Stack, M., & Luster, M. I. (1984) Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 72, 304-312. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90315-6](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(84)90315-6).
- [17] World Health Organization (WHO). (1993) Ochratoxin A. In IARC Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances, Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. World health organization Report, 56, 489-521.
- [18] Castegnaro, M. (1999) Risques cancérigènes. In Evaluation et gestion du risque. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 121-140.
- [19] Castegnaro, M., Mohr, U., Pfohl-leszkowicz, A., Esteve, J., Steinmann, J., Tilmann, T., Michelon, J., Bartsch, H. (1998) Sex and Strain specific induction of renal tumours by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int. J. Cancer*, 77, 70-75. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980703\)77:1<70::AID-IJC12>3.0.CO;2-D](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980703)77:1<70::AID-IJC12>3.0.CO;2-D).
- [20] Anonyme 1. (2008) Café-cacao : L'ochratoxine A, une menace pour la production. vendredi 8 août 2008 - Fraternité Matin.
- [21] Miraglia, M., Brera, C. (2002) Assessment of dietary Intake of Ochratoxin A by the population of EU member States. Reports on tasks for scientific cooperation, Task 3.2.7 (Scoop Directorate-General Health and consumer protection http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf, pp. 69-86.
- [22] Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. (2003) Occurrence of ochratoxin A in samples of different types of chocolate and cocoa powder, marketed in Spain and fifteen foreign countries. *Alimentaria* 10, 143-153.
- [23] Karine, L. (2001) *Enquête sur les Pratiques Culturelles dans les Cacaoyères en Côte d'Ivoire*; Projet PACCC/ICCO/Industrie sur L'amélioration de la qualité du cacao en Côte d'Ivoire: Abidjan, Côte d'Ivoire.
- [24] Dembele, A., Coulibaly, A., Traoré, S.K., Mamadou, K., Silue, N., Touré, A. (2009) Détermination du niveau de contamination de l'ochratoxine A (OTA) dans les fèves de cacao à l'exportation. *Tropicicultura*, 27, 26-30.
- [25] Nielsen S. Suzanne. (2010) *Food Analysis: Laboratory Manual*. Second Edition, Springer New York Dordrecht Heidelberg London DOI 10.1007/978-1-4419-1463-7.27.
- [26] Lopez, C.I., Bautista, E., Moreno, E., Dentan, E. (1989) Factors related to the formation of "over fermented coffee beans" during the wet processing method and storage of coffee. ASIC, XIIIth International Scientific Colloquium on Coffee, Paipa, Colombia, pp. 373-383.
- [27] Khosravi Ali Reza., Mohammad Dakhili., Hojjatollah Shokri. (2008) Mycological Survey on Feed Ingredients and Mixed Animal Feeds in Ghom Province, Iran. *Pakistan Journal of Nutrition.*, 7 (1): 31-34.
- [28] Pitt J.I., Hocking A.D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edn Blackie Academic and Professional, London.
- [29] Klich, M.A., Pitt, J.I. (1988) *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*. CSIRO Division of Food Research, North Ryde, N.S.W. 116 pp.
- [30] Pitt, J.I., (2000) *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species* 3rd edn. Food Science Australia, North Ryde, N.S.W. 197 pp.
- [31] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (2002) *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraal bureau voor Schimmel cultures, Utrecht, Netherlands.
- [32] Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A. (2004) New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section Circumdati. *Studies in Mycology* 50, 23-43.
- [33] Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C., (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology* 50, 45-61.
- [34] Gonzalez, H.H.L., Resnik, S.L., Boca, R.T., Marasas, W.F.O. (1995) Mycoflora of Argentinean corn harvested in main production area in 1990, *Mycopathologia.*, 130, 29-36.
- [35] VDLUFA. (2007) Standard operating procedure for identifying bacteria, yeasts, moulds and dematiaceae as product-typical and spoilage indicating microorganisms in feeds. In VDLUFA Method Book III, Suppl. 7 (ch. 28.1.3., 11 p).
- [36] Zia-Ur-Rahman K. (2006) Storage effect on nutritional quality of commonly consumed cereals. *Food Chemistry*, 95: 53-57.
- [37] Duron B.S. (1999) *Le Transport Maritime des Céréales*. Mémoire de D.E.S.S. Université d'Aix-Marseille, 81 p.
- [38] Moreau C. (1996) Les moisissures. In Bourgeois C-M., Mescle J-F et Succa J., 1996. *Micobiologie alimentaire. Tome 1. Tec et Doc, Lavoisier. Paris: 234235*.
- [39] Juliana Teixeira de Magalhães, George Andrade Sodré, Henry Viscogliosi, Marie-Florence Grenier-Loustalot. (2011) Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control* 22. 744-748.
- [40] Lopes, A. S., García, N. H. P., Vasconcelos, M. A. M. (2003) Evaluation of roasting conditions after the fermentation of cupuassu (*Theobroma grandiflorum Schum*) and cocoa beans (*Theobroma cacao* vL.). *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(2), 309-316.
- [41] Belli N., Marin S., Sanchis V., Ramos A. J. (2004) Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section Nigri obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 96 : 19-27.

- [42] Cahagnier, B., S. Dragacc., C. Frayssinet., J. M. Frémy., G. L. Hennebert., L. Lesagemeessen., J. L. Multon., D. Richard-Molard., and M. F. Roquebert. (1998) Moisissures des aliments peu hydrates. Lavoisier Tec & Doc. France.
- [43] Beuchat, L.R. (1987) Influence of water activity on sporulation, germination, out growth, and toxin production. In: Rockland, L.D., Beuchat, L.R. (Eds.), Water Activity: Theory and Applications to Food. Marcel Dekker, New York, pp. 153–172.
- [44] Oyetunji, T.O. (2006) Mycological evaluation of a ground cocoa-based beverage. African Journal of Biotechnology 5, 2073–2076.
- [45] Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P.R., Guiraud, J.P. (2008) Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. International Journal of Food Microbiology 128, 234–241.
- [46] Pitt J.I. et Miscamble B.F., (1995), Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. Journal of Food Protection, 58, 86-90.
- [47] Riba A., Sabaou N., Mathieu F. et Lebrihi A., (2005), Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.
- [48] Christensen C.M., Mirocha C.J. et Meronuck R.A., (1977), *Molds, Mycotoxins and Mycotoxicoses*. Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report 142. University of Minnesota, St. Paul, MN. In : Withlow L.W. et Hagler W.M., (2001), Mycotoxin contamination of feedstuffs-An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ Quebec.
- [49] Le Bars J., Le Bars P. (1987) Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987, (cf. Bulletin de l'Association des Anciens élèves de l'Institut Pasteur, 4^e trimestre 1987).
- [50] Wilson D. M., Mubatanhema W., Jurjevic Z., (2002) Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. Adv. Exp. Med. Biol 504: 3-17.
- [51] Gwaldy R., Tap J., (2004), Les mycotoxines. Université Paris XII.
- [52] COCOQUAL(2007) Developing biochemical and molecular markers as indices for improving quality assurance in the primary processing of cocoa in West Africa. Final Report. Analysis of the mycological status of cocoa beans with emphasis on ochratoxigenic fungi. Project No.ICA4-CT-2002-10040 (EU 5th FP INCO-DEV Project) http://cordis.europa.eu/data/PROJ_FP5.
- [53] Copetti, M.V.; Pereira, J.L.; Lamanaka, B.T.; Pitt, J.I.; Taniwaki, M.H. (2010) Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. Int. J. Food Microbiol. 143, 67–70.
- [54] Abrokwa F., Sackey S. T. (2010) Studies on conditions that predispose cocoa to ochratoxin A contamination. MPhil Thesis, University of Ghana, Legon.
- [55] Kouadio I.A., Koffi L.B., Nemlin J.G., Dosso M.B. (2012) Effect of Robusta (*Coffea canephora* P.) coffee cherries quantity put out for sun drying on contamination by fungi and ochratoxin A (OTA) under tropical humid zone (Côte d'Ivoire). Food and Chemical Toxicology 50: 1969.
- [56] Kouadio A.I., Lebrihi A., Agbo N.G., Mathieu F., Pfohlleszkowiz A. Dosso M. B. (2007) Influence de l'interaction de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance et la production de l'ochratoxine A par *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus ochraceus* sur un milieu de base café. Canadian Journal of Microbiology 53 : 852-859.
- [57] Djossou O., Perraud-Gaime i., Mirleau I.F., Rodriguez Serrano G., Karou G., Niamke S., ouzari I. Boudabous A., and Roussos R. (2011) Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius* Anaerobe 17. 267-272.
- [58] Astoreca, A.; Magnoli, C.; Barberis, C.; Chiacchiera, S.M.; Combina, M.; Dalcero, A. (2007) Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section Nigri strains isolated from different substrates in Argentina. Sci. Total Environ., 388, 16–23.
- [59] Magan, N., Aldred, D. (2007) Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. International Journal of Food Microbiology, 119,131et 139.