

Influence de la fermentation sur le taux d'ochratoxine A dans les fèves de cacao

Pierre MANDA*, Aholia Jean Baptiste ADEPO, Djibret DAKOURI et Djédjé Sébastien DANO

*Université Felix Houphouët Boigny, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Laboratoire de Toxicologie, BP V 34 Abidjan, Côte d'Ivoire*

* Correspondance, courriel : mandapierre@yahoo.fr

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer l'influence de l'opération post-récolte de fermentation dans la contamination du cacao par l'OTA pour une meilleure campagne de prévention de la mycotoxine. Les cabosses de cacao « intactes » récoltées, ont subi toutes les étapes des opérations post-récolte (ecabossage, fermentation, séchage). La fermentation est réalisée en variant la durée (2 à 6 jours) et le nombre de brassage (zéro à deux). Des échantillons de cacao (20) prélevés à chaque étape, sont dosés par la méthode CLHP pour la recherche de l'OTA après extraction et purification sur colonnes d'immunoaffinité. Quarante (40) pourcent des échantillons sont contaminés par l'OTA les taux d'OTA détectés dans les échantillons positifs sont très faibles, variant entre la <LD et 0,04 µg/kg. Aucune différence significative n'est établie entre la contamination des fèves de cacao par l'OTA et les variables de fermentation telles que la durée (2 à 6 jours) et le nombre de brassage (0 à 2). L'application des bonnes pratiques agricoles constitue pour le producteur la mesure appropriée pour réduire le taux d'OTA dans le cacao.

Mots-clés : *ochratoxine A, cacao, fermentation, brassage.*

Abstract

Influence of fermentation on ochratoxin A level in cocoa beans

The purpose of this study is to ascertain the influence of the post-harvest fermentation operation in OTA contamination in cocoa for a better prevention campaign against this mycotoxin. "Intact" cocoa pods were harvested and underwent all stages of post-harvest processes (pods opening, fermentation, drying). The fermentation is carried out by varying the duration (2 to 6 days) and the number of brewing (0 to 2). Cocoa Samples (20) collected at each stage, OTA was extracted and then purified using immunoaffinity columns prior to HPLC analysis. Forty (40) percent of the samples were contaminated by OTA and the levels detected in positive samples were very low, ranging between the < LD and 0.04 µg/kg. There were no significant difference between OTA contamination in cocoa beans and fermentation variables such as the duration (2 to 6 days) and the number of brewing (0 to 2). The implementation of good agricultural practices is the required measure, for the producer to reduce the rate of OTA in cocoa.

Keywords : *ochratoxin A, cocoa, fermentation, brewing.*

1. Introduction

L'ochratoxine A est une mycotoxine produite par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, principalement *Penicillium verrucosum* dans les climats tempérés et *Aspergillus ochraceus* dans les régions chaudes [1, 2]. Elle est naturellement présente dans de nombreux produits végétaux du monde entier tels que céréales, grains de café, cacao et fruits séchés. L'OTA a des propriétés néphrotoxique, immunosuppressive, génotoxique, tératogène et cancérigène [3]. Par ailleurs selon les conclusions des travaux de l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer, l'OTA est un cancérigène possible pour l'homme [4]. Dans un souci de protéger la santé des consommateurs, les denrées alimentaires sont soumises à un ensemble de directives et de réglementations au niveau mondial. C'est le cas du règlement EU 1881/2006 [5] fixant les limites maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, notamment celle de l'OTA dans les céréales (5 µg/kg) et produits transformés du céréale (3 µg/kg), les raisins secs (5 µg/kg), les grains de café torréfiés et café torréfié moulu (5 µg/kg), de café soluble (10 µg/kg), le vin (2 µg/kg) et les épices. L'autorité européenne pour la sécurité alimentaire a établi en 2006 une dose hebdomadaire tolérable en OTA de 120 ng/kg de poids corporel [6]. Pour le cacao et produits dérivés, la Commission Européenne a décidé qu'il ne semble pas nécessaire, pour protéger la santé du consommateur, de fixer une teneur maximale en OTA dans le cacao et les produits à base de cacao, puisque ces denrées ne contribuent pas considérablement à l'exposition à l'OTA et que des teneurs élevées en OTA n'ont été que rarement décelées dans ces denrées [7]. Cependant, pour garantir la qualité sanitaire du cacao il est important pour les pays producteurs de concevoir des protocoles de traitements post-récolte afin de réduire autant que possible la contamination du cacao par l'OTA. Les études ont montré que la contamination des fèves de cacao commence la plupart du temps au cours des opérations post-récolte : récolte, écabossage, fermentation, séchage, stockage et transport. Et cette contamination dépend des conditions phytosanitaires de la cabosse de cacao [8 - 10]. Lorsque la cabosse est intacte, [11] ont rapporté le début de la contamination des fèves par l'OTA à partir de la fermentation. [12] dans une enquête sur les pratiques culturelles dans les cacaoyères en Côte d'Ivoire ont rapporté une durée de fermentation variant entre 2 et 6 jours. La fermentation, opération post récolte primordiale du cacao au cours de laquelle se développe l'arôme chocolat du cacao mais également la prolifération d'importantes microorganismes (bactéries ; moisissures, etc.) serait elle l'étape clé de production de l'OTA ? Il apparaît donc important d'évaluer la contamination du cacao par l'OTA en relation avec la durée de la fermentation qui est variable en pratique selon le producteur et la saison. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de ces deux facteurs (durée et nombre de brassage) de fermentation sur la contamination du cacao par l'OTA.

2. Matériel et méthodes

2-1. Collecte des échantillons

Les échantillons de cacao ont été prélevés à Alepé (60 km d'Abidjan) Sud d'Est de la Côte d'Ivoire. Deux mille cinq cent (2500) cabosses « intactes » de cacao sont récoltées et stockées pendant 3 jours. La « cabosse intacte » est définie comme la cabosse à maturité (teinte jaune ou orangée) qui ne présentait pas de défaut au niveau du cortex extérieur et à l'ouverture. Étaient donc exclues, les cabosses noires ; les cabosses pourries, les cabosses attaquées par les insectes et les cabosses blessées au moment de la récolte. De même, les cabosses dont les fèves présentaient des défauts (taches colorées, présence de moisissure) à l'ouverture étaient également exclues.

2-2. Étapes de transformation post récolte

2-2-1. Ecabossage

Les 2500 cabosses de cacao sont ouvertes à l'aide d'un gourdin afin d'en extraire les fèves. Un premier échantillon de 2 kg de fèves fraîches par sous lots de 100 grammes est collecté. Le reste des fèves est réparti en 3 lots.

2-2-2. Fermentation et brassage

Chaque lot de fèves est fermenté sur et sous feuilles de bananier selon la durée déterminée pour l'étude. Ainsi le lot 2 est fermenté pendant 2 jours sans brassage, le lot 3 est fermenté pendant 4 jours et brassé 1 fois, le lot 4 est fermenté pendant 6 jours entrecoupé de 2 brassages.

2-2-3. Séchage

A la fin de la fermentation, chaque lot est séché au soleil sur une claie pendant 4 à 5 jours. Le séchage avait pour but de réduire le taux d'humidité des fèves à moins de 8 % afin d'éviter une éventuelle prolifération des moisissures. A la fin de cette opération un prélèvement d'environ 2 kg est effectué pour chaque lot aux points 2, 3 et 4 de la *Figure 1*.

2-2-4. Séchage des échantillons frais au laboratoire

Les échantillons frais prélevés au point 1, préalablement conservés en chambre froide, sont séchés à l'étuve à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une humidité relative en eau inférieure ou égal à 8 %.

2-2-5. Broyage

Les échantillons sont préalablement congelés pour éviter la prise en masse de la matière grasse puis finement broyés à l'aide d'un «*Waring blinder*» et mélangés pour obtenir une homogénéisation parfaite. Des échantillons finaux de 200 g sont prélevés et conservés en chambre froide à -22°C. Les essais ont été réalisés une fois par mois pendant 5 mois (août - septembre). Un total de 20 échantillons dont 5 échantillons frais et 15 échantillons secs ont été collectés.

2-3. Dosage de l'OTA

2-3-1. Extraction

15 g de poudre de cacao sont pesées à l'aide d'une balance de précision et dilués dans 150 mL du mélange méthanol/hydrogénocarbonate de sodium à 3 %. Le mélange obtenu est agité à 1300 tours/min pendant 15 min à l'aide d'un agitateur magnétique puis filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman n°4. Onze (11) mL du filtrat obtenu sont dilués dans 11 mL de tampon PBS et mélangée au vortex.

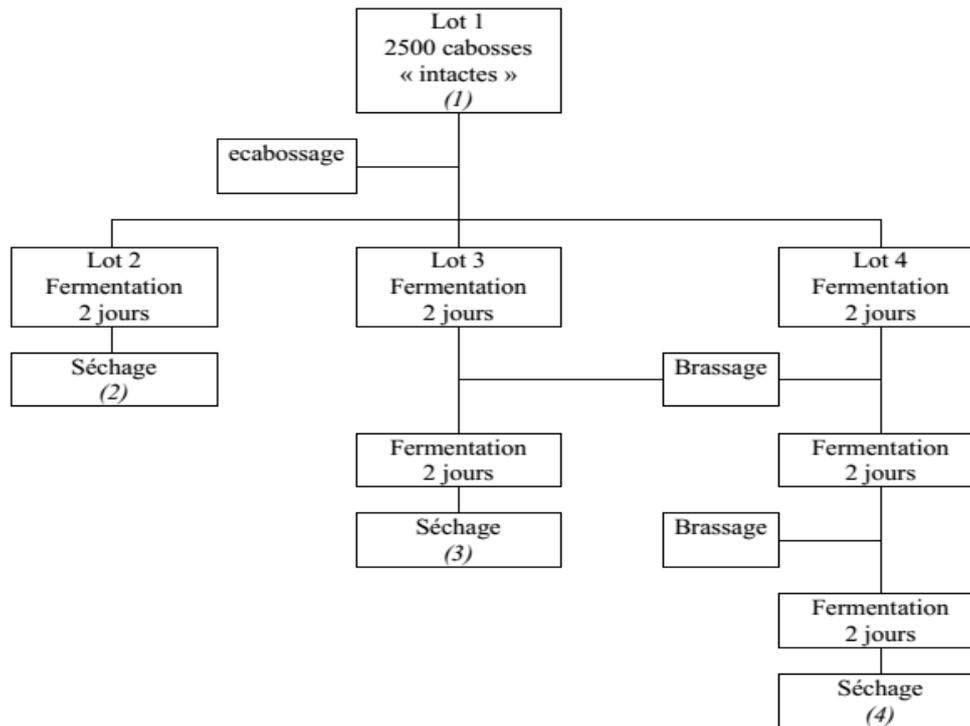


Figure 1 : *Traitement des échantillons : (1), (2), (3), (4) points de prélèvement des échantillons pour analyse*

2-3-2. Purification sur colonne d'immuno affinité

La colonne d'immuno affinité utilisée est l'Ochraprep. Elle contient une suspension en gel d'anticorps monoclonaux fixés par covalence à un support solide. Les colonnes d'immuno affinité sont sorties de la chambre froide au moins 30 min avant de commencer le test et laissées à la température ambiante. Les colonnes sont vidées de leur liquide de conservation et conditionnées avec 10 mL de solution PBS à un débit de 3 mL/min. Vingt (20) mL d'échantillon prélevés à l'aide d'une pipette sont déposés sur la colonne à un débit de 2 mL/min grâce à la pompe à vide. L'OTA est aussitôt capturée par les anticorps de la suspension gélifiée. La colonne est lavée avec 10 mL de BPS à un débit de 3 mL/min afin d'éliminer les composants étrangers. On a procédé ensuite à une élution de l'OTA par 1,5 mL du mélange Méthanol/Acide acétique en trois étapes de 0,5 mL avec une pause de 1 min entre chaque étape, à un débit de 0,5 mL/min. Puis les colonnes sont lavées par 1,5 mL de PBS sur la colonne à un débit de 0,5 mL/min. Le volume final de l'éluat était de 2,8 mL et non 3 mL car il restait toujours quelques gouttelettes sur la colonne. Conditions analytiques de la chromatographie HPLC

- La phase stationnaire est une colonne HPLC, phase inverse Spherisorb C₁₈ S₅ ODS₂, 5µm (250 mm x 4,6 mm) ;
- La phase mobile était constituée d'un mélange acétonitrile /eau qualité HPLC / acide acétique (55/43/2) en régime isocratique ;
- Le débit est de 1 mL/min ;
- détection fluorescente : Longueur d'excitation = 333 nm ;
Longueur d'émission = 460 nm ;
- Le volume d'injection est de 20 µl.

3. Résultats et discussion

Dans cette étude, la durée et le nombre de brassage au cours de la fermentation ont été évalués. Pour cela une sélection des cabosses a été effectuée à deux niveaux.

- *Au niveau du cortex* : en éliminant toutes cabosses présentant un "état sanitaire" favorable à la prolifération des moisissures et partant une contamination des fèves par l'OTA (cabosses blessées au cours de la récolte, les cabosses noires, les cabosses pourries et les cabosses attaquées par les insectes et les animaux) ;
- *A l'ouverture* : par le rejet des cabosses contenant des fèves noires ou moisies trouvées à l'intérieur de la cabosse.

"L'essai" qui comprenait les opérations post-récoltes : récolte, écabossage, fermentation et le séchage) a été réalisé une fois par mois durant 5 mois (Aout - Décembre) couvrant la période de la grande traite cacaoyère.

Tous les 05 échantillons non fermentés du lot 1 sont négatifs à l'OTA (OTA < LD ; Tableau 1). La non contamination des fèves au stade d'ecabossage s'expliquerait par le caractère stérile des fèves provenant de cabosses sélectionnées et intactes. En effet, selon [13] l'intérieur d'une cabosse intacte de cacao est microbiologiquement stérile. L'ensemencement en micro-organismes de fermentation des fèves est réalisé dès l'ouverture des cabosses par des agents fermentaires apportés par l'air, les mains des travailleurs et le matériel utilisé (machettes, supports de fermentation). [14] Mais également au séchage artificiel (à l'étuve) à 50°C qui a réduit la durée du séchage à 48 heures et a permis d'éviter la multiplication fongique et partant la contamination des fèves de cacao par l'OTA [15]. Pour les autres lots (échantillons fermentés), le nombre d'échantillons contaminés par l'OTA est variable : 2/5 échantillons pour le lot 2 et 3/5 pour les lots 3 et 4. Pour les échantillons contaminés, les taux d'OTA détectés sont très faibles ; tous très proche de la limite de détection (LD = 0,03 µg/kg). Les fèves de cacao issues de cabosses intactes sont très faiblement contaminées par l'OTA. Ce constat a été déjà rapporté par des auteurs [10, 16] La durée de la fermentation variant de 2 à 6 jours, de même que le nombre de brassage n'ont pas impacté sur la contamination des échantillons. En effet, la comparaison des taux moyens d'OTA des échantillons des lots 2 ; 3 et 4 ne révèle aucune différence significative.

Tableau 1 : Niveau de contamination en µg/kg des fèves en OTA

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
Positif/total	0 / 5	2 / 5	3 / 5	3 / 5
étendue	< LD	LD - 0,04	LD - 0,04	LD - 0,05
Taux moyens	< LD	0,013 ± 0,01 ^a	0,023 ± 0,02 ^a	0,03 ± 0,02 ^a

^a les chiffres frappés de la même lettre ne sont pas significativement différents

Nos résultats sont en accord avec ceux des auteurs des références [9, 11,12, 17] qui ont rapporté des contaminations moyennes en OTA variant de < LD à 0,05 µg/kg pour de fèves fermentées et séchées issues de cabosses intactes ouvertes immédiatement après récolte. Des études ont mis en évidence que le brassage des fèves pendant une fermentation de plus de 5 jours serait bénéfique car permettant d'éviter le développement des moisissures producteurs d'OTA mais également des bactéries acétiques [18, 19]. Ce processus génère moins de fèves défectueuses et de fèves violettes [20, 21]. Les enquêtes menées sur les pratiques post-récoltes de la cacao culture en Côte d'Ivoire par [12] ont révélé une durée de fermentation moyenne de 5 à 6 jours entrecoupés de 0 ou 1 brassage. Les bonnes pratiques post-récolte recommandent une durée de fermentation de 7 jours en saison sèche et de 6 jours en saison humide entrecoupée d'un

brassage chaque 48 heures. En effet la fermentation permet d'éliminer le mucilage extérieur, par l'action pectinolytique de microorganismes, elle supprime aussi le pouvoir germinatif et surtout rend possible le développement des précurseurs de l'arôme chocolat au sein des cotylédons. Pour limiter la contamination des fèves de cacao pendant la phase de fermentation, certains auteurs ont recommandé l'usage de désinfectant tel le poly hexaméthylène guanidine hydrochloride [22]. L'application des bonnes pratiques agricoles constitue pour le producteur la mesure appropriée pour réduire le taux d'OTA dans le cacao.

4. Conclusion

La fermentation est une opération primordiale dans la production du cacao de bonne qualité. Les résultats de cette étude ont montré qu'une fermentation de 5 à 6 jours entrecoupée de brassage à partir de cabosses « intactes de cacao n'est pas un point important de contamination du cacao par l'OTA. L'application des bonnes pratiques agricoles constitue pour le producteur la mesure appropriée pour réduire le taux d'OTA dans le cacao.

Références

- [1] - P. MANTLE, K. M. MC HUGH, *Mycological research*, 97 (1993) 205 - 212
- [2] - J. L. PITT, *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (1987) 266 - 269
- [3] - A. PFOHL-LESZKOWIZ et M. CASTEGNARO, *Les mycotoxines dans l'alimentation: évolution et gestion des risques*. Edition Lavoisier, Paris, France, (199) 249 - 277
- [4] - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*; IARC Working Group, WHO : Lyon, France, Vol. 56, (1993)
- [5] - LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES (EC). *Journal officiel de l'Union européenne*, L 364/4 - 364/24, (2006)
- [6] - EFSA *The EFSA Journal*, (2006) 365 1 - 56
- [7] - LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES (EC), *Journal officiel DE l'Union Européenne*, L 035, (2010) 0007 - 0008
- [8] - P. BASTIDE, G. FOURNY, N. DURAND, P. PETITHUGUENIN, B. GUYOT, M. GILMOUR, M. LINDBLOM, *15th Intl Cocoa Res. Conf.*, San Jose, Costa Rica, (2006) 9 - 17
- [9] - P. MOUNJOUENPOU, D. GUEULE, M. NTOUPKA, N. DURAND, A. FONTANA-TACHON, B. GUYOT AND J. P. GUIRAUD, *World Mycotoxin Journal*, 4 (2) (2011) 141 - 146
- [10] - S. D. DANO, P. MANDA, D. DEMBELE, A. M. J. ABLA, J. H. BIBAUD, J. Z. GOUET, C. B. Z. SIKA, *Toxins*, 5 (2013) 2310 - 2323
- [11] - M. V. COPETTI, J. L. PEREIRA, B. T. LAMANAKA, J. L. PITT, M. H. TANIWAKI, *International Journal of Food Microbiology*, 143 (2010) 143, 67 - 70
- [12] - K. LAINE, *Projet PACCC/ICCO/ Industrie sur l'amélioration de la qualité du cacao en Côte d'Ivoire*, (2001) 27 p.
- [13] - R. F. SCHWAN, A. E. WHEALS, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, (2004) 1 - 17
- [14] - M. R. YUNUS, Hazard analysis and critical control points in cocoa bean fermentation. *International Journal of Agriculture System*, 4 (1) (2016)
- [15] - M. GILMOUR, M. LINDBLOM, *MYCOTOXINS : Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*. CABI, Wallingford, (2008) 231 - 243
- [16] - F. K ABROKWAH, J. TAKRAMAH, A. OCLLOO, S. T. SACKKEY, *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 1 (3) (2013)

- [17] - K. B. D. KEDJEBO, T. S. GUEHI, B. KOUAKOU, N. DURAND, P. AGUILAR, A. FONTANA & D. MONTET, *Food Additives & Contaminants : Part A*, 33 (1) (2016) 157 - 166, DOI: 10.1080/19440049.2015.1112038
- [18] - M. BAREL, *Qualité du cacao. L'impact du traitement technologique*. Nancy (France) : Quae, (2013)
- [19] - D. S. NIELSEN, M. CRAFTACK, L. JESPERSEN, M. JAKOBSEN. In : R. R. WATSON, V. R. PREEDY, S. ZIBADI, editors. *Chocolate in health and nutrition*. New York (USA) : *Humana Press*, (2013) 39 - 60
- [20] - I. GANESWARI, S. K. BARIAH, M. A. AMIZI and K.Y SIM, *International Food Research Journal*, 22 (1) (2015) 70 - 76
- [21] - S. T. GUEHI, S. DABONNE, L. BAN-KOFFI, D. K. KEDJEBO and G. IRIE, B. ZAHOU LI, *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2 (3) (2010) 163 - 171
- [22] - K. M. YAO, O. KAMBIRE, K. C. KOUASSI, R. K. NEVRY, T. S. GUEHI, *Food and Public Health*, 7 (2) (2017) 40 - 50, DOI: 10.5923/j.fph.20170702.03