

n° 154  
3 microfiches

Isabelle  
PERRAUD-GAIME

**T h è s e s   e t   d o c u m e n t s   m i c r o f i c h é s**

Cultures mixtes en milieu solide  
de bactéries lactiques et de champignons filamenteux  
pour la conservation et la décaféination  
de la pulpe de café

**ORSTOM**  
éditions

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II  
--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

**THESE**

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés. Agronomie. Environnement.

**CULTURES MIXTES EN MILIEU SOLIDE DE BACTERIES LACTIQUES  
ET DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX POUR LA CONSERVATION  
ET LA DECAFEINATION DE LA PULPE DE CAFE**

par

**PERRAUD-GAIME Isabelle**  
Chargée de Recherche Ière classe, ORSTOM

Soutenue le 1er Mars 1995

devant le Jury composé de :

MM. BENSOUSSAN Maurice, Maître de Conférences, ENSBANA, Dijon	Rapporteur
GUYOT Bernard, Ingénieur, CIRAD-CP, Montpellier	Examineur
NAVARRO Jean-Marie, Professeur, Université de Montpellier II	Président
RAIMBAULT Maurice, Directeur de Recherche, ORSTOM, Colombie	Examineur
ROUSSOS Sévastianos, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Directeur de Thèse
VANBELLE Marcel, Professeur, Université de Louvain, Belgique	Rapporteur
VINIEGRA Gustavo, Professeur, UAM-Iztapalapa, Mexique	Examineur

n° 154

3 microfiches



Thèses et documents microfichés



Orstom, l'Institut français de recherche scientifique  
pour le développement en coopération

La loi du 1<sup>er</sup> juillet 1992 (code de la propriété intellectuelle, première partie) n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article L. 122-5, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans le but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1<sup>er</sup> de l'article L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon passible des peines prévues au titre III de la loi précitée.

© ORSTOM éditions 1996, Paris

ISSN : 0767-922X

ISBN : 2-7099-1329-1

**à GILLES**

**à MON PERE**

*La mort a toujours tort  
mais dans la lueur d'un nouveau jour  
et dans le sourire d'un enfant  
il y a toujours un message d'espoir*

**à FLORENCE et à NICOLAI**  
avec tout mon amour et qu'ils me pardonnent

**à MA MERE**  
pour toute son aide et sa compréhension si précieuse

**à MON GRAND-PERE**  
qui vient juste de nous quitter

**à toute ma famille**  
**à Sévastianos, à Clarisse et à Jacques**  
**à tous ceux qui ont été présents ces dernières années**

**Merci**

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier sous la direction de Monsieur Sévastianos ROUSSOS, Directeur de Recherches à l'ORSTOM. Je voudrais lui exprimer ici ma profonde reconnaissance pour la confiance et le soutien qu'il n'a cessé de me porter au cours de ces dernières années ainsi que pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail.

Que Monsieur le Professeur Jean-Marie NAVARRO de l'Université de Montpellier II, qui me fait l'honneur de présider ce jury, reçoive ici tous mes sincères remerciements.

C'est avec plaisir que je remercie Monsieur Maurice BENSOUSSAN, Maître de Conférences à l'ENSBANA et Monsieur le Professeur Marcel VANBELLE de l'Université de Louvain, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Bernard GUYOT, Ingénieur au CIRAD-CP, à Monsieur Maurice RAIMBAULT, Directeur de Recherche à l'ORSTOM et à Monsieur le Professeur Gustavo VINIEGRA de l'Université Autonome de Mexico, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail et plus particulièrement aux stagiaires que j'ai eu l'honneur d'encadrer, Alexandre BUSUTTIL, Caroline CALLIES, Carole NOBLANC, Rahma RACHDI, Stéphane VIDAL. Je voudrais remercier tout particulièrement Laure HANNIBAL pour sa collaboration technique ainsi les personnels des laboratoires de Chimie Technologie Café Cacao du CIRAD-CP et leurs responsables, Messieurs Bernard GUYOT et Emile CROS pour la réalisation des analyses de caféine et des composés phénoliques.

Un grand merci à Sylvain DENIS, Alain RIVAL et Eric GIRAUD pour leurs nombreuses corrections et leurs judicieuses remarques. Une attention toute particulière pour Nathalie PUJET, pour m'avoir supportée et encouragée.

Toute ma reconnaissance s'adresse également à toutes les personnes qui ont participé même momentanément à la vie du laboratoire ces dernières années, pour leur soutien, leur amitié et leurs encouragements.

Enfin, je voudrais dire à Gilles et à mon père que j'ai tenu ma promesse. Qu'ils reposent en paix.

## RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail est d'établir les connaissances qui permettront la mise au point de méthodes permettant de conserver par ensilage de la pulpe de café décaféinée. Pour cela, nous avons utilisé des ferments mixtes de bactéries lactiques et de champignons filamenteux cultivés en Fermentation Solide anaérobie ou aérobie.

La pulpe de café est quantitativement et qualitativement le sous-produit le plus important du traitement par voie humide des cerises de café. Ce résidu humide et saisonnier engendre de sérieux problèmes de pollution qu'il serait possible de résoudre en le stabilisant par ensilage. De part sa composition chimique, la pulpe de café pourrait être utilisée en alimentation animale. Mais il faut alors éliminer les composés toxiques que sont la caféine et les composés phénoliques. Des études préalables ont démontré que des champignons filamenteux sont capables de dégrader la caféine en FMS.

Mais au préalable à toute étude de conservation ou de valorisation de ce substrat, nous avons identifié et quantifié la microflore endogène de la pulpe. Celle-ci varie de  $7.10^5$  à  $1,12.10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS suivant la variété du café, l'origine géographique et le type de traitement appliqué aux cerises de café.

La microflore lactique endogène de la pulpe de café ( $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS) s'exprime dès que les conditions environnementales (anaérobiose et humidité) sont favorables. Nous avons d'autre part testé l'effet de l'apport de différents ferments lactiques. La qualité des ensilages est parfaitement acceptable.

Quelque soit le type d'ensilage réalisé, la caféine de la pulpe de café présente à la mise en silos, n'est pas dégradée. Après un criblage en FMS de huit souches de champignons filamenteux, nous avons continué notre étude avec *Penicillium* V33A25. Ce microorganisme dégrade la caféine de la pulpe de café à 94 % après 30 heures de fermentation aérobie, avant la phase de sporulation. Ces paramètres sont parfaitement corrélés à la respirométrie, technique qui nous permet de suivre en continu le développement des microorganismes. D'autre part, il n'y a pas d'influence de la stérilisation sur la dégradation de la caféine.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons imposé à la microflore endogène, des conditions anaérobies et l'apport de ferments lactiques qui ont permis d'obtenir une conservation par acidification sans perte importante de matière sèche. Puis, afin d'obtenir un produit décaféiné, le substrat a été inoculé massivement par *Penicillium* V33A25 et cultivé en aérobie. Dans un dernier temps, le produit décaféiné a été réensilé avec ou sans apport de ferments lactiques dans des conditions anaérobies. On obtient un produit décaféiné et stabilisé par acidification.

Nous avons confirmé nos résultats en inoculant de la pulpe de café au temps 0 par un ferment mixte composé de *Penicillium* V33A25 et de *Lactobacillus plantarum* A6.

**Title : Mixed cultures of lactic bacteria and filamentous fungi for conservation and decaffeination of coffee pulp in solid state fermentation.**

The main goal of this study is the conservation by silage of decaffeinated coffee pulp. For this purpose to be succeeded, we have used mixed cultures of lactic bacteria and filamentous fungi, in aerobic or anaerobic solid fermentation.

Coffee pulp is the most important by-product of the wet process of coffee fruit. This wet and seasonal residue causes a whole series of pollution problems, which is possible to be eliminated by stabilization of this substrate by silage process. From the chemical composition viewpoint, coffee pulp could be used for animal consumption, if only toxic compounds such as caffeine and phenols were eliminated by microbial degradation. Preliminary studies demonstrate the filamentous fungi ability to degrade caffeine in SSF.

After a first study about the quantity and the nature of the endogenous microflora of coffee pulp, we impose anaerobic conditions and lactic ferments which permit the conservation of this residue by acidification without important loss of dry matter. Moreover, for obtaining a decaffeinated product, ensiled coffee pulp was inoculated by a strain of *Penicillium* in aerobic culture. At the end, the decaffeinated product was reensiled with or without inoculation by lactic ferment in anaerobic conditions. We obtained a decaffeinated and stabilized product by mixed and alternated culture aerobic or anaerobic fermentation in solid state system. Our results have been confirmed by inoculation of the coffee pulp at time 0 with a mixed culture of *Penicillium sp.* and *Lactobacillus plantarum*.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ	4
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ANNEXES	15
LISTE DES ABRÉVIATIONS	16
1 - INTRODUCTION	17
2 - ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
2.1 - Le café	22
2.1.1 - La description du fruit	24
2.1.2 - La localisation géographique et la production de café	27
2.1.3 - La transformation industrielle du café	29
2.1.3.1 - La voie sèche	29
2.1.3.2 - La voie humide	30
2.1.3.3 - Les opérations communes aux deux voies	32
2.1.3.4 - Le choix entre ces deux méthodes	33
2.1.3.5 - Le procédé semi-humide	33
2.1.4 - Les résidus du traitement du café	34
2.2 - La pulpe de café	38
2.2.1 - La composition chimique de la pulpe de café	39
2.2.2 - Les facteurs toxiques dans la pulpe de café	43
2.2.2.1 - La caféine	43
2.2.2.1.1 - Les effets physiologiques de la caféine	44
2.2.2.1.2 - La dégradation de la caféine	45
2.2.2.2 - Les composés phénoliques	45
2.2.2.3 - Le potassium et l'acide salicilique	47
2.2.3 - Les utilisations de la pulpe de café	47
2.2.3.1 - En alimentation animale	47
2.2.3.2 - Comme engrais organique	50
2.2.3.3 - Comme substrat pour la production de biogaz	50
2.2.3.4 - Comme substrat pour la production de microorganismes et d'enzymes	50
2.2.3.5 - Comme substrat pour la production de champignons comestibles	51
2.2.3.6 - Comme substrat pour la lombriculture	51
2.2.4 - Des alternatives pour améliorer la qualité de la pulpe de café	52

2.3 - Les Fermentations en Milieu Solides (FMS)	53
2.3.1 - Les avantages et les inconvénients des FMS	54
2.3.2 - Les applications des FMS	54
2.3.2.1 - L'enrichissement protéique	54
2.3.2.2 - Le compostage et l'ensilage : valorisation des déchets agricoles	56
2.3.2.3 - La dégradation de composés toxiques	57
2.3.3 - Les principaux paramètres des FMS	57
2.3.3.1 - Les microorganismes	57
2.3.3.2 - Les substrats	58
2.3.3.3 - L'activité de l'eau et l'humidité	58
2.3.3.4 - L'aération et les échanges gazeux	59
2.3.3.5 - Le contrôle de la température	60
2.3.3.6 - Le contrôle du pH	60
2.3.3.7 - La détermination de la biomasse	61
2.4 - La décaféination de la pulpe de café par fermentation solide	62
2.4.1 - Les champignons filamenteux	62
2.4.1.1 - Le genre <i>Aspergillus</i>	63
2.4.1.2 - Le genre <i>Penicillium</i>	63
2.4.2 - La dégradation de la caféine par des champignons filamenteux	64
2.4.2.1 - L'isolement et l'identification des souches de champignons filamenteux	65
2.4.2.2 - La sélection des souches	65
2.4.2.3 - L'optimisation des conditions de culture de <i>Penicillium</i> V33A25 en FMS	66
2.4.2.4 - La décaféination de la pulpe de café au niveau pilote	67
2.4.3 - Les voies métaboliques de dégradation de la caféine	68
2.5 - Conservation par ensilage	69
2.5.1 - Les bactéries lactiques	71
2.5.2 - La microflore des ensilages	72
2.5.3 - Les facteurs intervenant dans le processus d'ensilage	73
2.5.3.1 - L'anaérobiose	74
2.5.3.2 - La teneur en matière sèche	74
2.5.3.3 - La teneur en sucres fermentescibles	74
2.5.3.4 - La nature de la fermentation lactique	75
2.5.4 - Les additifs chimiques ou biologiques	76
2.5.4.1 - Les additifs enzymatiques	76
2.5.4.2 - Les ferments lactiques	77
2.5.4.3 - Les additifs enzymes - bactéries lactiques	77
2.5.5 - L'intérêt des additifs en nutrition animale	78
2.5.6 - La conservation de la pulpe de café par ensilage	78
2.5.6.1 - Les silos et la nature du substrat	79
2.5.6.2 - L'évolution chimique de la pulpe de café au cours de l'ensilage	79
2.5.6.3 - La valeur nutritive des ensilages de pulpe de café	83
2.6 - Conclusion	84

<b>3 - MATÉRIEL ET MÉTHODE</b>	<b>85</b>
3.1 - Nature et origine des substrats	86
3.2 - Détermination de la microflore endogène de la pulpe de café	86
3.2.1 - Milieux de culture	86
3.2.2 - Ensemencement et comptage	87
3.3 - Les microorganismes	88
3.3.1 - Les champignons filamenteux	88
3.3.2 - Les ferments d'ensilage	88
3.3.3 - La conservation des souches	89
3.4 - Les Fermentations en Milieu Solide (FMS)	89
3.4.1 - Les FMS aérobies pour la croissance des champignons	89
3.4.1.1 - Mise en œuvre d'une FMS	90
3.4.1.1.1 - Suspension de spores et solution minérale	90
3.4.1.1.2 - Préparation des colonnes de fermentation	90
3.4.1.2 - Installation de la fermentation	91
3.4.2 - La technique d'ensilage	92
3.4.2.1 - Mise en œuvre des ensilages	92
3.4.2.1.1 - Préparation des ferments d'ensilage	92
3.4.2.1.2 - Préparation des microsilos	93
3.4.2.2 - Conditions de fermentation d'ensilage	93
3.5 - Le traitements des échantillons	93
3.6 - Les techniques d'analyses	95
3.6.1 - Analyse des gaz	95
3.6.2 - Observation du matériel frais	95
3.6.3 - Suivi de la microflore	95
3.6.4 - Matière sèche, humidité	96
3.6.5 - Mesure du pH	96
3.6.6 - Dosage des substrats et des produits de la fermentation par HPLC	96
3.6.7 - Dosage des sucres réducteurs totaux	97
3.6.8 - Dosage de la caféine	98
3.6.9 - Dosage des composés phénoliques	98
3.7 - Expression des résultats	98
3.7.1 - Evaluation de la microflore	98
3.7.2 - Evaluation des produits	98
3.7.3 - Résultats des analyses de gaz	99

<b>4 - MICROFLORE ENDOGÈNE DE LA PULPE ET DE COQUES DE CAFÉ</b>	<b>101</b>
4.1 - Origine de la pulpe et des coques de café	102
4.2 - Evaluation quantitative de la microflore	103
4.3 - Distribution qualitative de la microflore	105
4.3.1 - Populations se développant sur cellulose, amidon et/ou pectine	105
4.3.2 - Populations se développant sur milieu pulpe de café	107
4.3.3 - Populations se développant sur milieu MRS	107
4.4 - Discussion	107
4.5 - Conclusion	110
<b>5 - CONSERVATION DE LA PULPE DE CAFÉ PAR ENSILAGE</b>	<b>111</b>
5.1 - Ensilage témoin et préparation d'un ferment naturel	113
5.1.1 - Evolution des paramètres physico-chimiques et suivi de la microflore	113
5.1.2 - Caractérisation des bactéries anaérobies	115
5.2 - Ensilage de pulpe de café avec addition de ferments contrôlés	117
5.2.1 - Evolution de la microflore	117
5.2.2 - Les paramètres physico-chimiques en fin d'ensilage	119
5.2.3 - Cinétiques des paramètres physico-chimiques	120
5.3 - Discussion	122
5.4 - Conclusion	126
<b>6 - DÉCAFÉINATION DE LA PULPE DE CAFÉ</b>	<b>127</b>
6.1 - Description morphologique des souches retenues en boîte de Pétri	129
6.2 - Description de la croissance des souches en FMS sur pulpe de café	129
6.2.1 - L'observation microscopique	130
6.2.2 - La respirométrie	131
6.2.3 - L'humidité et la perte de matière sèche	133
6.2.4 - Le pH	134
6.2.5 - La caféine	135
6.3 - Relations entre les différents paramètres de croissance et choix d'une souche	136
6.4 - Influence des facteurs de culture sur la dégradation de la caféine de la pulpe de café par <i>Penicillium</i> V33A25	140
6.4.1 - Définition des facteurs essentiels et mise en place du plan d'expérience	140
6.4.2 - Résultats expérimentaux	141
6.4.3 - Analyse des effets relatif des facteurs	142
6.5 - Conclusion	144

<b>7 - FERMENTATIONS SUCCESSIVES</b>	<b>145</b>
7.1 - Décaféination de la pulpe ensilée	147
7.1.1 - Evolution de la microflore	148
7.1.2 - Evolution des paramètres physico-chimiques	150
7.1.3 - Discussion	153
7.2 - Réensilage de la pulpe de café désilée puis décaféinée	154
7.2.1 - Evolution de la microflore	155
7.2.2 - Evolution des paramètres physico-chimique au cours des réensilages	155
7.2.3 - Discussion	156
7.3 - Ensilage de pulpe stérile décaféinée	159
7.3.1 - Evolution de la microflore	159
7.3.2 - Evolution des paramètres physico-chimiques	161
7.3.3 - Discussion	161
7.4 - Conclusion	164
<b>8 - CULTURES MIXTES : <i>L. plantarum</i> A6 ET <i>Penicillium</i> V33A25</b>	<b>166</b>
8.1 - Evolution de la microflore	168
8.2 - Evolution des paramètres physico-chimiques	169
8.3 - Discussion	172
8.4 - Conclusion	175
<b>9 - CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>176</b>
<b>10 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>184</b>
<b>11 - ANNEXES</b>	<b>210</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 2.1</b> : Plantation de caféiers arabica en Colombie	22
<b>Figure 2.2</b> : Plant de caféier arabica	23
<b>Figure 2.3</b> : Rameau de cerises de café	24
<b>Figure 2.4</b> : Vue macroscopique d'une coupe longitudinale d'une cerise de café	25
<b>Figure 2.5</b> : Vue microscopique d'une coupe longitudinale d'une cerise de café	26
<b>Figure 2.6</b> : Vue microscopique d'une coupe d'un grain de café	26
<b>Figure 2.7</b> : Production internationale de café des principaux pays producteurs	28
<b>Figure 2.8</b> : Opérations successives dans le traitement des cerises de café par voie humide et par voie sèche	30
<b>Figure 2.9</b> : Répartition en pourcentage des macrocomposants obtenus lors du traitement par la voie humide des cerises de café	35
<b>Figure 2.10</b> : Possibilités de valorisation de la pulpe de café	36
<b>Figure 2.11</b> : Possibilités de valorisation du mucilage	37
<b>Figure 2.12</b> : Aire de stockage de la pulpe de café en Colombie	39
<b>Figure 2.13</b> : Représentation chimique de la xanthine et de ses dérivés méthylés	43
<b>Figure 2.14</b> : Schémas des structures reproductrices du genre <i>Aspergillus</i> et du genre <i>Penicillium</i> .	64
<b>Figure 3.1</b> : Schéma de la technique d'ensemencement par point des boîtes de Pétri pour déterminer les dilutions optimales	87
<b>Figure 3.2</b> : Dispositif d'incubation pour les FMS aérobies	89
<b>Figure 3.3</b> : Dispositif d'analyse automatisé des gaz de la fermentation solide utilisant un chromatographe des gaz.	91
<b>Figure 3.4</b> : Schéma du dispositif d'un microsilo expérimental pour l'ensilage de la pulpe de café	92
<b>Figure 3.5</b> : Schéma du traitement et de la préparation des échantillons de fermentation solide en vue de la réalisation des analyses	94
<b>Figure 4.1</b> : Distribution de la microflore totale de champignons, de bactéries et de levures contenus dans les lots de pulpes et de coques de café.	104
<b>Figure 4.2</b> : Distribution de la microflore totale en fonction de la composition des milieux de culture	106
<b>Figure 4.3</b> : Distribution des bactéries, des champignons et des levures en fonction de la composition des milieux de culture.	106
<b>Figure 5.1</b> : Analyse en HPLC des composés phénoliques de la pulpe de café avant et après ensilage.	114
<b>Figure 5.2</b> : Evolution de la microflore au cours d'ensilages de pulpe de café inoculés par trois ferments lactiques différents (Pied de cuve ; <i>L. plantarum</i> A6 ; DpH4).	118
<b>Figure 5.3</b> : Evolution du pH, de l'acide lactique et de l'acide acétique au cours d'ensilages de pulpe de café inoculés par trois ferments lactiques différents.	121
<b>Figure 5.4</b> : Evolution des sucres réducteurs (glucose et fructose) au cours d'ensilages de pulpe de café inoculés par trois ferments lactiques différents.	122

<b>Figure 6.1</b> : Evolution du CO <sub>2</sub> au cours de la croissance des souches de champignons filamenteux en FMS sur pulpe de café.	132
<b>Figure 6.2</b> : Evolution de l'humidité de la pulpe de café au cours des 8 FMS	133
<b>Figure 6.3</b> : Perte de poids en % de matière sèche au cours des 8 FMS	133
<b>Figure 6.4</b> : Evolution du pH au cours des 8 FMS	134
<b>Figure 6.5</b> : Evolution des taux de caféine au cours des 8 fermentations	135
<b>Figure 6.6</b> : Profils du pH, du taux de caféine et variation de la teneur en CO <sub>2</sub> au cours de la croissance des souches de champignons filamenteux en FMS sur pulpe de café.	137
<b>Figure 6.6 bis</b> : Profils du pH, du taux de caféine et variation de la teneur en CO <sub>2</sub> au cours de la croissance des souches de champignons filamenteux en FMS sur pulpe de café.	138
<b>Figure 6.7</b> - Evolution du CO <sub>2</sub> au cours de la croissance de <i>Penicillium</i> V33A25 sur pulpe de café.	142
<b>Figure 6.8</b> : Analyse graphique des effets des facteurs sur la dégradation de la caféine, sur la production de CO <sub>2</sub> , sur la sporulation et sur le pH final.	143
<b>Figure 7.1</b> : Schéma synthétique des fermentations successives pour l'étude de la décaféination et la conservation de la pulpe de café mexicaine A et de l'influence de la microflore endogène au cours de ces procédés aérobie ou anaérobie.	146
<b>Figure 7.2</b> : Evolution de la microflore au cours des fermentations aérobies inoculées par <i>Penicillium</i> V33A25 réalisées à partir de trois lots de pulpe ensilée par trois ferments différents (Pied de cuve ; <i>L. plantarum</i> A6 ; DpH4).	149
<b>Figure 7.3</b> : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux de trois ensilages de pulpe de café inoculés par trois ferments lactiques différents (Pied de cuve ; <i>L. plantarum</i> A6 ; DpH4) pendant 30 jours en anaérobiose puis inoculés par <i>Penicillium</i> V33A25 et fermentés en aérobiose.	151
<b>Figure 7.4</b> : Evolution du CO <sub>2</sub> au cours des fermentations aérobies inoculées par <i>Penicillium</i> V33A25, réalisées sur trois lots de pulpe ensilée avec trois ferments lactiques différents : Pied de Cuve ; <i>L. plantarum</i> A6 ; DpH4. Comparaison avec une fermentation aérobie témoin sur de la pulpe non ensilée, stérile et inoculée par <i>Penicillium</i> V33A25.	152
<b>Figure 7.5</b> : Evolution de la microflore lors du réensilage de la pulpe décaféinée avec ou sans réinoculation avec <i>L. plantarum</i> A6 ou DpH4.	157
<b>Figure 7.6</b> : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux lors du réensilage de la pulpe décaféinée avec ou sans réinoculation.	158
<b>Figure 7.7</b> : Evolution de la microflore au cours d'ensilages réalisés à partir de pulpe de café décaféinée par <i>Penicillium</i> V33A25 en aérobiose pendant 30 heures puis inoculés par deux ferments lactiques : A : <i>L. plantarum</i> A6 ; B : Ferment commercial DpH4.	160
<b>Figure 7.8</b> : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux de deux ensilages de pulpe de café décaféinée par <i>Penicillium</i> V33A25 en aérobiose pendant 30 heures, puis inoculés par deux ferments lactiques différents <i>L. plantarum</i> A6 et DpH4 pendant 48 jours en anaérobiose.	162
<b>Figure 8.1</b> : Schéma de l'hypothèse initiale	167
<b>Figure 8.2</b> : Evolution de la microflore au cours de la culture mixte	169
<b>Figure 8.3</b> : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux au cours de fermentations successives, aérobie et anaérobie de pulpe de café inoculée par un ferment mixte composé de <i>Penicillium</i> V33A25 et <i>L. plantarum</i> A6.	170
<b>Figure 8.4</b> : Evolution du CO <sub>2</sub> au cours d'une fermentation aérobie de pulpe de café inoculée par un ferment mixte composé de <i>Penicillium</i> V33A25 et de <i>L. plantarum</i> A6. Comparaison avec une fermentation témoin de pulpe de café inoculée par <i>Penicillium</i> V33A25 seul.	171

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 2.1 :</b> Production mondiale de café vert et de pulpe de café pour la période 1989-1990	28
<b>Tableau 2.2 :</b> Liste des différents sujets de recherche concernant les possibilités d'utilisations des sous-produits issus de la transformation industrielle du café.	38
<b>Tableau 2.3 :</b> Composition chimique de la pulpe de café.	39
<b>Tableau 2.4 :</b> Composition en acides aminés des protéines de la pulpe de café. Comparaison avec d'autres sources de protéines végétale.	40
<b>Tableau 2.5 :</b> Les autres composés organiques de la pulpe de café.	41
<b>Tableau 2.6 :</b> Cendres et composés minéraux de la pulpe de café.	41
<b>Tableau 2.7 :</b> Constituants des parois cellulaires et des polysaccharides de la pulpe de café	42
<b>Tableau 2.8 :</b> Composition en sucres de la pulpe de café	42
<b>Tableau 2.9 :</b> Composition en composés phénoliques de la pulpe de café.	46
<b>Tableau 2.10 :</b> Valeurs moyennes des composés phénoliques de la pulpe de café fraîche	46
<b>Tableau 2.11 :</b> Inventaire des différentes possibilités d'utilisations de la pulpe de café	48
<b>Tableau 2.12 :</b> Quelques domaines d'applications des Fermentations en Milieu Solide	55
<b>Tableau 2.13 :</b> Caractérisation physiologique des souches présélectionnées	66
<b>Tableau 2.14 :</b> Décaféination de la pulpe de café avec <i>Penicillium</i> V33A25 par fermentation solide : Effet de l'addition d'azote minéral	67
<b>Tableau 2.15 :</b> Décaféination de la pulpe de café avec <i>Penicillium</i> V33A25 par fermentation solide au niveau pilote avec 20 kg de pulpe en Zymotis	68
<b>Tableau 2.16 :</b> Liste d'auteurs ayant travaillé sur l'ensilage dans différents domaines	70
<b>Tableau 2.17 :</b> Teneur en glucides de réserve (% PMS) de différents végétaux	71
<b>Tableau 2.18 :</b> Influence du traitement enzymatique sur les paramètres de conservation	76
<b>Tableau 2.19 :</b> Evolution de la composition chimique de la pulpe de café au cours d'un ensilage sans additif.	79
<b>Tableau 2.20 :</b> Caractéristiques physiques et chimiques de trois lots de pulpe de café. La pulpe de café est ensilée seule ou mélangée à des fourrages.	80
<b>Tableau 2.21 :</b> Caractéristiques physiques et chimiques de quatre lots de pulpe de café ensilés pendant 90 jours.	81
<b>Tableau 2.22 :</b> Production d'acide lactique et d'acides organiques (% PMS) au cours d'ensilages de pulpe de café.	82
<b>Tableau 2.23 :</b> Effet sur la mortalité et la prise de poids chez des rats nourris avec de la pulpe de café fraîche (P.F) et de la pulpe ensilée (P.E).	83
<b>Tableau 3.1 :</b> Composants quantifiés par l'HPLC équipé de deux détecteurs	97
<b>Tableau 4.1 :</b> Caractéristiques des différents lots de pulpes et de coques de café .	102
<b>Tableau 4.2 :</b> Numération de la microflore totale des lots de pulpes et de coques de café	103
<b>Tableau 4.3 :</b> Microflore totale de différents substrats tropicaux.	108
<b>Tableau 5.1 :</b> Confection des silos à partir de pulpe de café (Pulpe A) réhumidifiée avec de l'eau	113
<b>Tableau 5.2 :</b> Evolution des principaux paramètres au cours d'un ensilage naturel de pulpe de café (2 mois).	113
<b>Tableau 5.3 :</b> Evolution de la microflore dans l'ensilage naturel de pulpe de café.	114
<b>Tableau 5.4 :</b> Détermination du métabolisme de différentes bactéries anaérobies isolées de la pulpe de café ensilée naturellement.	115
<b>Tableau 5.5 :</b> Principaux paramètres avant et après ensilage de la pulpe de café	119

<b>Tableau 6.1 :</b> Description morphologique des 8 souches de champignons filamenteux cultivés en boîte de Pétri à 25 °C	129
<b>Tableau 6.2 :</b> Développement morphologique des 8 souches au cours des FMS sur pulpe de café.	130
<b>Tableau 6.3 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus par respirométrie	131
<b>Tableau 6.4 :</b> Principaux critères pour sélectionner la meilleure souche capable de dégrader la caféine de la pulpe de café en FMS	136
<b>Tableau 6.5 -</b> Matrice d'expériences avec les valeurs codées des différents facteurs	141
<b>Tableau 6.6 -</b> Relation entre les niveaux codés et les valeurs réelles des facteurs étudiés.	141
<b>Tableau 6.7 -</b> Résultats expérimentaux des réponses déterminées par le plan d'expérience.	141
<b>Tableau 6.8 -</b> Conditions de fermentation pour <i>Penicillium</i> V33A25 en FMS	143
<b>Tableau 7.1 :</b> Principaux paramètres des trois ensilages de pulpe de café après 1 mois de fermentation anaérobie.	148

## LISTE DES ANNEXES

**Annexe 1 :** Composition des milieux de culture

Références des milieux PCA, PDA, Sabouraud et MRS  
Composition du milieu de Mandels et Weber  
Composition du milieu à base d'amidon  
Composition du milieu gélosé à base de pectine  
Composition du milieu gélosé à base de pulpe de café  
Composition du milieu gélosé à base de café (CMS)

**Annexe 2 :** Fiches descriptives des souches de champignons filamenteux

*Penicillium* V26A25  
*Penicillium* V33A25  
*Aspergillus* C16A25  
*Aspergillus* V12A25  
*Aspergillus* C17B25  
*Aspergillus* C11B25  
*Aspergillus* C28B25  
*Aspergillus* C23B25

**Annexe 3 :** Exemple de fiche technique d'une mise en œuvre d'une FMS aérobie

**Annexe 4 :** Base de calcul des différentes quantités pour une FMS aérobie

**Annexe 5 :** Exemple de fiche technique d'une mise en œuvre d'un ensilage de pulpe de café

**Annexe 6 :** Dosage de la caféine

**Annexe 7 :** Protocole d'extraction des composés phénoliques

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>À</b>	: Amnstrongs
<b>AFEP</b>	: Aliment Enrichi En Protéine
<b>A<sub>w</sub></b>	: Activité de l'eau
<b>CENICAFE</b>	: Centro Nacional de Investigaciones de Café
<b>CFTRI</b>	: Central Food Technological Research Institute
<b>CIRAD-CP</b>	: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. Département des Cultures Pérennes.
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxide de Carbone
<b>CHN</b>	: Teneurs en Carbone, Hydrogène et Azote
<b>CMS</b>	: Milieu Café Moulu Saccharose
<b>CPG</b>	: Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>DCO</b>	: Demande Chimique en Oxygène
<b>dCO<sub>2</sub></b>	: Dérivée de la concentration en dioxyde de carbone en fonction du temps
<b>EMP</b>	: Voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas
<b>FMS</b>	: Fermentation en Milieu Solide
<b>HMP</b>	: Voie des Hexose Mono Phosphate
<b>HPLC</b>	: Chromatographie Liquide Haute Pression
<b>IMNECAFE</b>	: Instituto Mexicano del Café
<b>IRCC</b>	: Institut de Recherche Café Cacao
<b>MO</b>	: Matière Organique
<b>MSI</b>	: Matière Sèche Initiale
<b>ND</b>	: Non Déterminé
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oxygène
<b>ORSTOM</b>	: Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération
<b>PCA</b>	: Milieu Plate Count Agar
<b>PDA</b>	: Milieu Potatoes Dextrose Agar
<b>PMF</b>	: Poids de Matière Fraîche
<b>PMS</b>	: Poids de Matière Sèche
<b>PVP</b>	: Poly-Vinyl-Pyrrolydone
<b>SAB</b>	: Milieu Sabouraud Dextrose Agar
<b>UAM</b>	: Université Autonome Métropolitaine de Mexico
<b>UFC</b>	: Unité Formant Colonie
<b>α</b>	: Activités respiratoires

# **INTRODUCTION**

## 1 - INTRODUCTION

Le café en grains est l'un des produits agricoles les plus échangés à travers le monde. Mais pour obtenir ce grain exportable, le fruit du caféier communément appelé « cerise de café » doit subir après sa récolte un traitement, soit par voie sèche, soit par voie humide. La voie sèche consiste à sécher la cerise entière, puis à la décortiquer. Les résidus secs de ce traitement sont les coques. La voie humide est appliquée directement sur le fruit frais. Trois opérations principales permettent d'obtenir le grain de café sec. Il s'agit en premier lieu de débarrasser le fruit de la peau et de la pulpe qui entourent la graine, puis de retirer le mucilage et enfin de sécher uniquement le grain de café. Ces opérations nécessitent de grandes quantités d'eau et génèrent des sous-produits humides, forts peu valorisés à l'heure actuelle et donc sources de pollution.

Parmi les résidus du traitement par voie humide, la pulpe de café est quantitativement et qualitativement le sous-produit le plus important. Trois facteurs justifient une recherche intensive sur la valorisation de ce substrat.

- La grande quantité de pulpe disponible dans les pays producteurs. La pulpe de café représente environ 40 % du poids frais de la cerise du café (TAUK, 1986) et 29 % du poids sec (BRESSANI et coll., 1972). Pour la saison 1989-1990, la production mondiale de pulpe était de 2,8 millions de tonnes. Ces pulpes sont utilisées en petites quantités comme engrais organique sur les lieux même de production, la plus grande partie est considérée comme un déchet agricole et rejetée dans l'environnement.

- Les problèmes de pollution engendrés par une production élevée de ce sous-produit. Dans un pays comme la Colombie, le traitement par voie humide de la production annuelle de café frais, provoque la même pollution organique que celle produite annuellement par 24 millions d'habitants (ZULUAGA, 1989) ; or la population colombienne est de 30 millions de personnes.

- La possibilité d'utiliser la pulpe de café dans des domaines très divers. D'après sa composition chimique, elle peut être une matière première pour l'alimentation animale (la pulpe de café contient environ 10 % de protéines). Elle peut aussi être utilisée comme engrais organique, comme substrat pour la production de biogaz, pour la production d'enzymes (pectinases, cellulases, décaféinases, etc...), pour la production de champignons comestibles (*Pleurotus ostreatus*), comme substrat pour la lombriculture. La pulpe de café peut également servir de substrat pour la production de microorganismes (levures, champignons filamenteux, etc...) ou encore comme substrat pour l'extraction de caféine. De nombreuses autres utilisations sont sûrement envisageables.

Mais il existe des facteurs qui, par contre, limitent l'utilisation de ce matériel. Son humidité importante (80 à 85 %) à la sortie du dépulpeur (BRESSANI et coll., 1972), rend difficile l'utilisation immédiate de ce sous-produit. De plus, la pulpe de café est un substrat

riche en sucres, en protéines, en acides aminés et autres nutriments. Tous ces facteurs favorisent le développement de la microflore endogène et posent le problème de la conservation de ce matériel. Le stockage en l'état frais de la pulpe permettrait de résoudre le problème occasionné par la nature saisonnière de la production de ce substrat (3 à 5 mois par an), facteur fort dissuasif pour une utilisation industrielle. La déshydratation de la pulpe de café est quasiment impossible à réaliser lors de la récolte du café car toutes les structures de séchage sont occupées en priorité pour le traitement du grain.

La pulpe de café présente un autre inconvénient majeur lié à sa composition chimique. En effet, la présence de substances ayant un effet anti-physiologique telles que la caféine et les composés phénoliques pose un problème certain pour son utilisation en alimentation animale.

Le premier objectif de ce travail est de déterminer une technique permettant de conserver la pulpe de café, en vue de sa valorisation ultérieure. Mais au préalable à toute étude de conservation ou de valorisation de ce substrat, il est nécessaire de connaître, d'identifier et de quantifier la microflore endogène de la pulpe, aucune étude détaillée n'ayant été réalisée sur ce sujet.

L'ensilage, procédé de conservation anaérobie par fermentation lactique, est une technique largement utilisée dans les pays tempérés pour la conservation des fourrages. Très peu d'études existent en milieu tropical. Pourtant dans ces régions, à une saison pluvieuse succède une saison sèche, au cours de laquelle la production de fourrage est largement déficitaire et la technique d'ensilage pourrait être une des solutions.

Quelques travaux ont été réalisés sur l'ensilage de la pulpe de café (BOHKENFOR et FONSECA, 1974 ; MURILLO, 1978 ; CARRIZALES et GONZALEZ, 1984). Ces travaux concernent la technique de mise en œuvre des silos et plus particulièrement l'effet d'additifs chimiques sur la qualité nutritionnelle de la pulpe conservée. Par contre, l'ensilage de la pulpe de café a été peu étudié du point de vue microbiologique et biochimique. Pour cette raison, nous nous intéresserons ici, au suivi de ces paramètres au cours d'ensilages naturels de pulpe de café. Nous étudierons d'autre part, l'influence de trois types d'additifs biologiques, un pied de cuve, un ferment monosouche, un ferment commercial associant deux souches de bactéries lactiques à un complexe enzymatique.

Dans la mesure où l'on souhaite utiliser ce substrat en alimentation animale, il est nécessaire de détoxifier la pulpe de café. Des chercheurs de l'ORSTOM et de la UAM d'Iztapalapa à Mexico ont isolé à partir d'échantillons de terre, de feuilles de caféier et de branches décomposées, de cerises de café abîmées ou en voie de décomposition naturelle, colonisées par un mycélium de moisissures, 350 souches de champignons filamenteux (AQUIAHUATL et coll., 1988). Dans cette collection, huit souches ont été présélectionnées pour leur haute capacité à dégrader la caféine (ROUSSOS et coll., 1989). Le développement de ces champignons filamenteux sur pulpe de café en Fermentation en Milieu Solide (FMS) pourrait être une alternative pour améliorer la qualité nutritionnelle de ce substrat.

Le deuxième objectif de cette étude est de sélectionner un ou plusieurs champignons filamenteux capables de se développer en FMS sur pulpe de café en dégradant la caféine de la pulpe avant de sporuler de manière à pouvoir le tester en association avec des bactéries lactiques au cours d'un procédé de stabilisation. Nous rechercherons d'autre part, un facteur corrélé à la dégradation de la caféine et à la sporulation, facilement mesurable au cours de la fermentation.

L'objectif final de ce travail est d'obtenir un produit décaféiné et stabilisé, susceptible d'être utilisé comme élément d'une ration animale.

Tout au long de ce travail, nous suivrons l'évolution des populations microbiennes. Nous examinerons, dans un premier temps, qualitativement et quantitativement, l'évolution de la microflore naturelle de la pulpe. Puis, nous imposerons des microflore de bactéries lactiques ou de champignons filamenteux, afin d'étudier leur comportement dans des conditions de cultures différentes. Suivant les résultats obtenus, nous élaborerons des ferments constitués d'un mélange de microorganismes que nous inoculerons à la pulpe dans des conditions précises afin d'obtenir un produit stabilisé et détoxiqué.

Les microorganismes que nous impliquons dans ces procédés, appartiennent à des groupes très différents. Les bactéries lactiques sont des anaérobies facultatives, les champignons filamenteux sont des aérobies stricts. D'autre part, la conservation par ensilage est une fermentation strictement anaérobie, la dégradation de la caféine se réalise, par contre, en condition aérobie.

Nous étudierons, dans un premier temps, l'évolution des différentes populations de microorganismes inoculées au cours de fermentations successives réalisées dans des conditions différentes (aérobiose ou anaérobiose). Puis, nous suivrons l'évolution d'un inoculum mixte de bactéries lactiques et de champignons filamenteux. Au cours de cette fermentation, nous imposerons des conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose qui permettront d'orienter la croissance et le métabolisme des populations vers la dégradation de la caféine ou bien vers la production d'acide lactique. Cette expérience nous permettra de discuter sur l'hypothèse initiale de ce travail :

**" La possibilité d'ensemencer la pulpe de café au temps 0 par un ferment mixte composé de champignons filamenteux et de bactéries lactiques, capable de dégrader la caféine et de stabiliser le produit fermenté par ensilage."**

L'étude bibliographique que nous présentons au début de ce travail, permettra de définir le substrat que nous allons étudier, ainsi qu'un état des connaissances des techniques (FMS, ensilage) que nous utiliserons. Au cours de cette étude, nous ferons également le point sur l'état actuel des recherches sur la dégradation de la caféine par des champignons filamenteux, ainsi que sur l'ensilage de la pulpe de café.

**ETUDE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours de cette étude bibliographique, il nous est apparu essentiel de présenter dans un premier temps le café, son industrialisation et les possibilités de valorisation des sous-produits issus de cette industrie. Parmi ceux-ci, la pulpe de café est quantitativement et qualitativement le plus important. Nous présenterons ses potentialités, les perspectives et les difficultés rencontrées pour sa valorisation biotechnologique. Puis nous ferons le point sur les diverses techniques de Fermentations en Milieu Solide susceptibles d'être mises en œuvre pour la décaféination par des champignons filamenteux et la conservation par ensilage de la pulpe de café.

### 2.1 - Le café

La cerise de café est le fruit du caféier qui appartient à la Famille des Rubiacées dont il constitue le genre *Coffea* (COSTE, 1989). On connaît environ soixante espèces du genre *Coffea* dont les plus importantes du point de vue commercial sont :

- *Coffea arabica* Linn, originaire des montagnes d'Abyssinie, qui contient peu de caféine. Il représente les trois quarts de la production mondiale et se développe plus particulièrement sur les haut-plateaux (Figure 2.1) ;

- *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, découvert au Congo dont la variété la plus répandue est *Coffea robusta*, qui représente 25 % de la production mondiale. Il s'acclimate bien aux faibles altitudes et contient deux fois plus de caféine que la variété *C. arabica* .



Figure 2.1 : Plantation de caféiers arabica en Colombie

D'autres espèces sont également exploitées mais à un niveau très modeste :

- *C. liberica* ; *C. eugenioides* ; *C. stenophylla* ; *C. congensis* ; *C. excelsa* ainsi que *C. arabusta*, hybride de *C. arabica* et de *C. robusta*, créée en Côte d'Ivoire par l'Institut de Recherche du Café et du Cacao (IRCC) en collaboration avec l'ORSTOM mais dont l'avenir commercial est encore incertain.

Le caféier (Figure 2.2), originaire d'Afrique, requiert un climat chaud et humide typiquement tropical (températures comprises entre 17 et 23 °C et 1 500 à 1 800 mm de précipitation par an). On le rencontre entre les parallèles 30 nord et 30 sud. L'époque de la récolte dépend de la région, de la latitude et de l'altitude qui peut varier du niveau de la mer (*C. canephora*) jusqu'à 2 000 mètres (*C. arabica*).

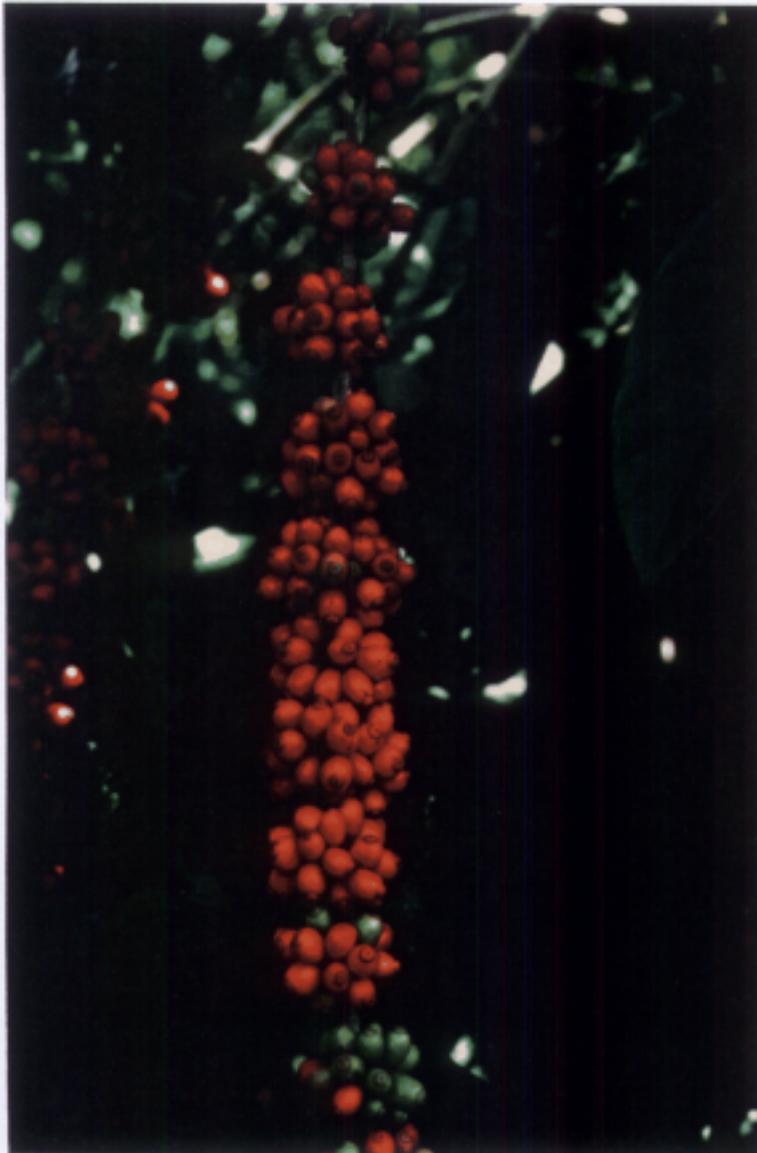


**Figure 2.2 :**  
**Plant de caféier arabica**

### 2.1.1 - La description du fruit

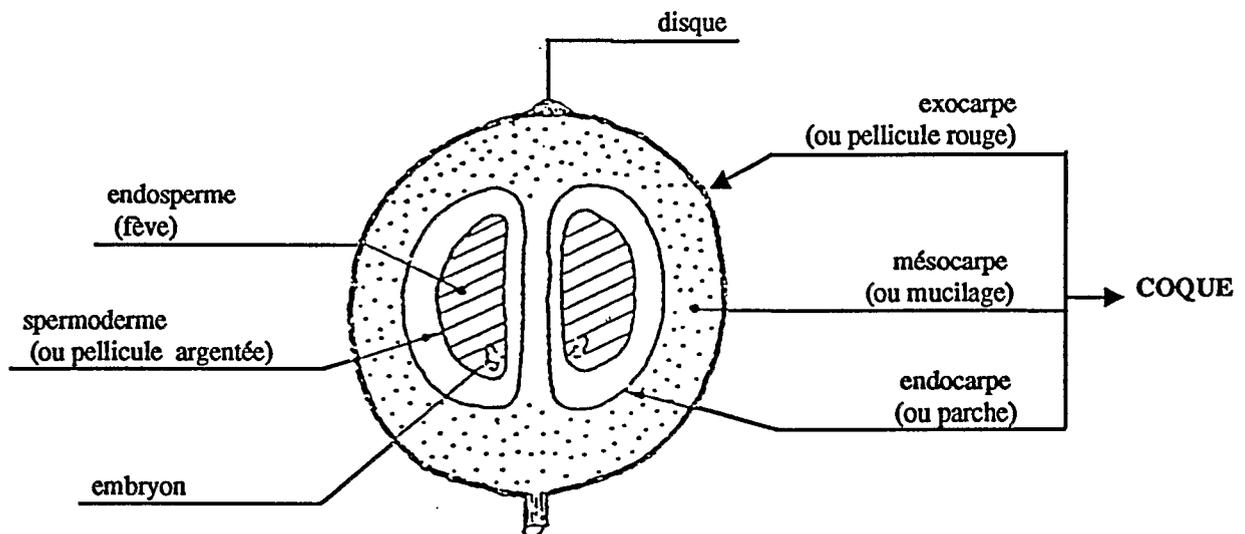
L'époque de la floraison varie selon la région, la latitude et l'espèce. Il se passe 28 semaines environ entre la floraison et la fructification ; le temps de maturation du fruit est de 5 à 6 mois.

Le fruit du caféier a le même aspect extérieur que celui d'une cerise, c'est pourquoi on le désigne également par « cerise de café ». Les fruits sont regroupés sur les rameaux (Figure 2.3), en globomérules (WILBAUX, 1956). Il s'agit de drupes (fruit à mésocarpe charnu et endocarpe ligneux protégeant le grain), ovoïdes ou subglobuleuses. La couleur varie du jaune au rouge cerise selon la variété et l'exposition au soleil. Les fruits rouges sont commercialement les plus appréciés car considérés de meilleure qualité. La taille varie peu selon les variétés, en moyenne : 10 mm de longueur, 6-7 mm de largeur et 3-4 mm d'épaisseur.



**Figure 2.3 :**  
Rameau de cerises de café  
à maturité

La coupe longitudinale de ce fruit (Figure 2.4) montre les différentes couches tissulaires. La pulpe est formée par l'exocarpe (épiderme) coloré et le mésocarpe (pulpe) charnu blanc-jaunâtre. La couleur de l'épiderme varie du vert (chlorophylles) au rouge (anthocyanes), voire au rouge foncé, parfois même jusqu'au violet et au noir lorsque les cerises sont trop mûres. L'exocarpe est constitué d'une couche de cellules polygonales géantes présentant des stomates. Sa consistance varie avec l'espèce. Enveloppé par l'épiderme, le mésocarpe, épaisse couche de tissu spongieux de cinq millimètres d'épaisseur, riche en sucres et en pectines, entoure deux graines accolées par leur face plane. Les graines sont revêtues d'une double membrane : la première communément appelée parche (endocarpe mince, mucilage) est de couleur jaune pâle et de consistance dure et fragile, la deuxième, beaucoup plus fine que la précédente et adhérant à la graine (albumen), est appelée pellicule argentée (tégument séminal, périsperme, spermoderme). Les graines sont composées d'un endosperme, d'un cotylédon et d'un embryon situé à la base de la graine sur la face interne.



**Figure 2.4 : Vue macroscopique d'une coupe longitudinale d'une cerise de café**

L'observation microscopique de la coupe du fruit (Figure 2.5) montre en détail chacun des tissus mentionnés précédemment. Cette coupe permet de constater que la pulpe n'est pas seulement composée de l'exocarpe et du mésocarpe, mais également de trois autres couches de tissus cellulaires : cellules en palissade, cellules longitudinales du sclérenchyme, cellules transversales du sclérenchyme. La pellicule argentée comporte également trois couches : épiderme, couche moyenne, cellules comprimées. Dans la graine, on remarque le tissu de réserve parenchymatique et des matériaux gras (Figure 2.6).

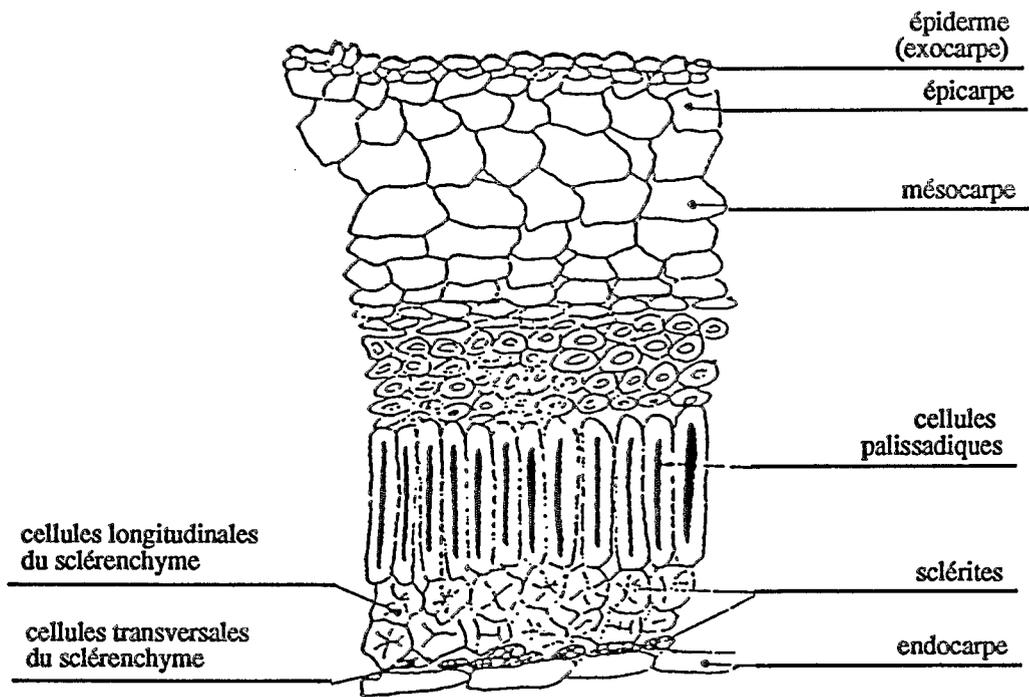


Figure 2.5 : Vue microscopique d'une coupe longitudinale d'une cerise de café

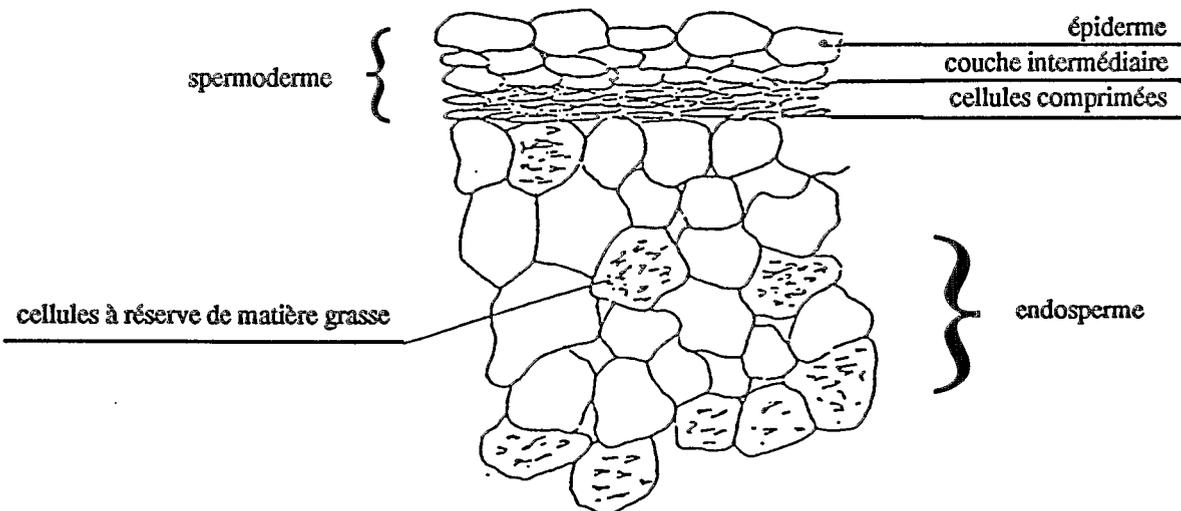


Figure 2.6 : Vue microscopique d'une coupe d'un grain de café

### 2.1.2 - La localisation géographique et la production de café

La répartition de la culture du café dans le monde s'étend entre le Tropique du Cancer et le Tropique du Capricorne (COSTE, 1989). On s'intéressera aux deux grandes espèces cultivées : *C. arabica* et *C. canephora*.

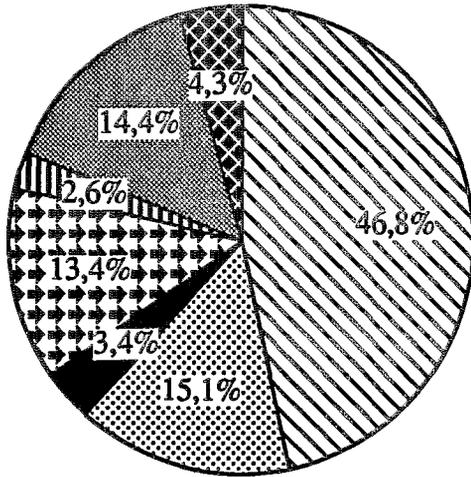
Le peuplement naturel de l'espèce *C. arabica* se situe sous un climat tropical tempéré par l'altitude, à saisons contrastées. Dans les régions intertropicales, elle ne peut prospérer que si la conjugaison du relief et la latitude apportent des correctifs à des facteurs défavorables. On la trouve ainsi dans les zones suivantes :

- Afrique : Zones d'altitude du Burundi, du Kenya, de la Tanzanie, de l'Ouganda, du Cameroun, de l'Ethiopie, du Zaïre, du Rwanda et de Madagascar.
- Asie : Zones d'altitude du Yémen, des Indes, du Vietnam, du Laos, des Philippines et d'Indonésie.
- Amérique : Zones d'altitude du Mexique, du Guatemala, du Honduras, de San Salvador, du Nicaragua, du Costa-Rica, du Panama, de l'Equateur, de la Colombie, du Vénézuéla, du Paraguay et du Pérou. Zones de moyenne altitude du Brésil, des Caraïbes, etc..

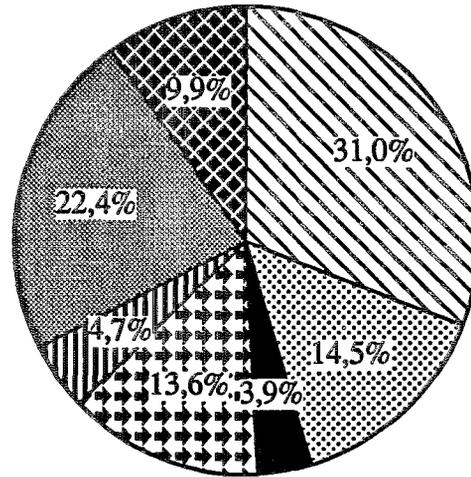
L'espèce *C. canephora* s'épanouit sous un climat tropical humide. On la trouve dans les zones suivantes :

- Afrique : Zones basses du Congo, de Côte d'Ivoire, de Guinée, de l'Angola, de la République Centrafricaine et de Madagascar. Zones de moyenne altitude du Cameroun, de l'Angola et de Tanzanie.
- Asie : Zones basses et moyennes d'Indonésie, des Indes, des Philippines et de Nouvelle-Calédonie.
- Amérique : Au Brésil et exceptionnellement au Mexique, où l'on cultive du *C. robusta* uniquement dans la région de Tepatlaxca.

Sur la figure 2.7, sont répertoriées les productions moyennes de café des principaux pays producteurs pour les périodes 1950/51 à 1954/55 et 1980/81 à 1985/86. Dans cet intervalle de 30 ans, la production mondiale a été multipliée par un facteur 2,3. La contribution du Brésil sur le plan mondial a substantiellement diminué alors que la participation de l'Asie et de l'Afrique a sensiblement augmenté.



Production moyenne 1950/51 - 1954/55  
40 878 millions de sacs de 60 kg



Production moyenne 1980/81 - 1985/86  
92 530 millions de sacs de 60 kg

**Figure 2.7 : Production internationale de café des principaux pays producteurs (ZULUAGA, 1989)**

En 1989-1990, la production de café au niveau mondial était de l'ordre de 5,5 millions de tonnes, 70 à 75 % sont des cafés arabica et le reste des cafés robusta (ANONYME, 1991). La quantité de pulpe produite était d'environ 2,8 millions de tonnes. Le café vert représente 52 % en poids sec du fruit et la pulpe 29 % PMS (AGUIRRE, 1966 ; BRESSANI et coll., 1972 ; ZULUAGA, 1989). Autrement dit, la production de 1 tonne de café vert donne 500 kg de pulpe de café (ROUSSOS et coll., 1989). Le tableau 2.1 présente la production de café vert et de pulpe de café pour les 14 principaux pays producteurs.

**Tableau 2.1 : Production mondiale de café vert (d'après F.O. Licht's International Coffee Report) et de pulpe de café pour la période 1989-1990**

PAYS	PRODUCTION		%
	CAFE VERT (Tonnes)	PULPE DE CAFE (Tonnes)	
MONDIAL	5.525.000	2.762.500	100,00
BRESIL	1.416.000	708.000	25,62
COLOMBIE	780.000	390.000	14,11
INDONESIE	391.000	196.000	7,00
MEXIQUE	309.000	154.000	5,60
GUATEMALA	210.000	105.000	3,80
COTE D'IVOIRE	205.000	102.000	3,71
ETHIOPIE	195.000	97.500	3,53
SALVADOR	173.000	86.500	3,13
UGANDA	168.000	84.000	3,04
COSTA RICA	148.000	74.000	2,68
INDE	130.000	65.000	2,35
EQUATEUR	123.000	61.000	2,22
HONDURAS	112.000	56.000	2,02
KENYA	104.000	52.000	1,90

### 2.1.3 - La transformation industrielle du café

La cueillette des cerises de café s'effectue manuellement. Un récolteur cueille 50 à 60 kg de cerises par journée de travail. Il est essentiel, pour tirer le maximum d'avantage de la qualité des fruits, de les récolter à pleine maturité. Les fruits rouges doivent être séparés un à un du rameau. Ce mode de cueillette nécessite deux à trois passages dans la plantation. Dans certains pays d'Afrique et au Brésil, les cerises sont cueillies rameau par rameau ("strip picking"). Le pourcentage d'immatures est alors élevé, ce qui nuira à la qualité de la boisson (WILBAUX, 1956 ; BRESSANI, 1978a ; SIVETZ et DESROSIER, 1979 ; COSTE, 1989).

Les fruits mûrs du caféier sont traités sur les lieux de production. Ils subissent un certain nombre d'opérations qui ont pour objet de dégager les graines de leurs enveloppes (pulpe, mucilage, parche, pellicule), de les conserver par séchage et d'améliorer leur présentation. Il existe deux techniques pour l'obtention du grain marchand (Figure 2.8).

La méthode dite de la voie humide s'impose pour les cafés arabica « fins suaves » d'Amérique Centrale, de Colombie ou du Kenya. Elle confère aux grains un aspect agréable qui valorise les lots et améliore la qualité à la tasse. Les cafés traités par voie humide sont dits « lavés ».

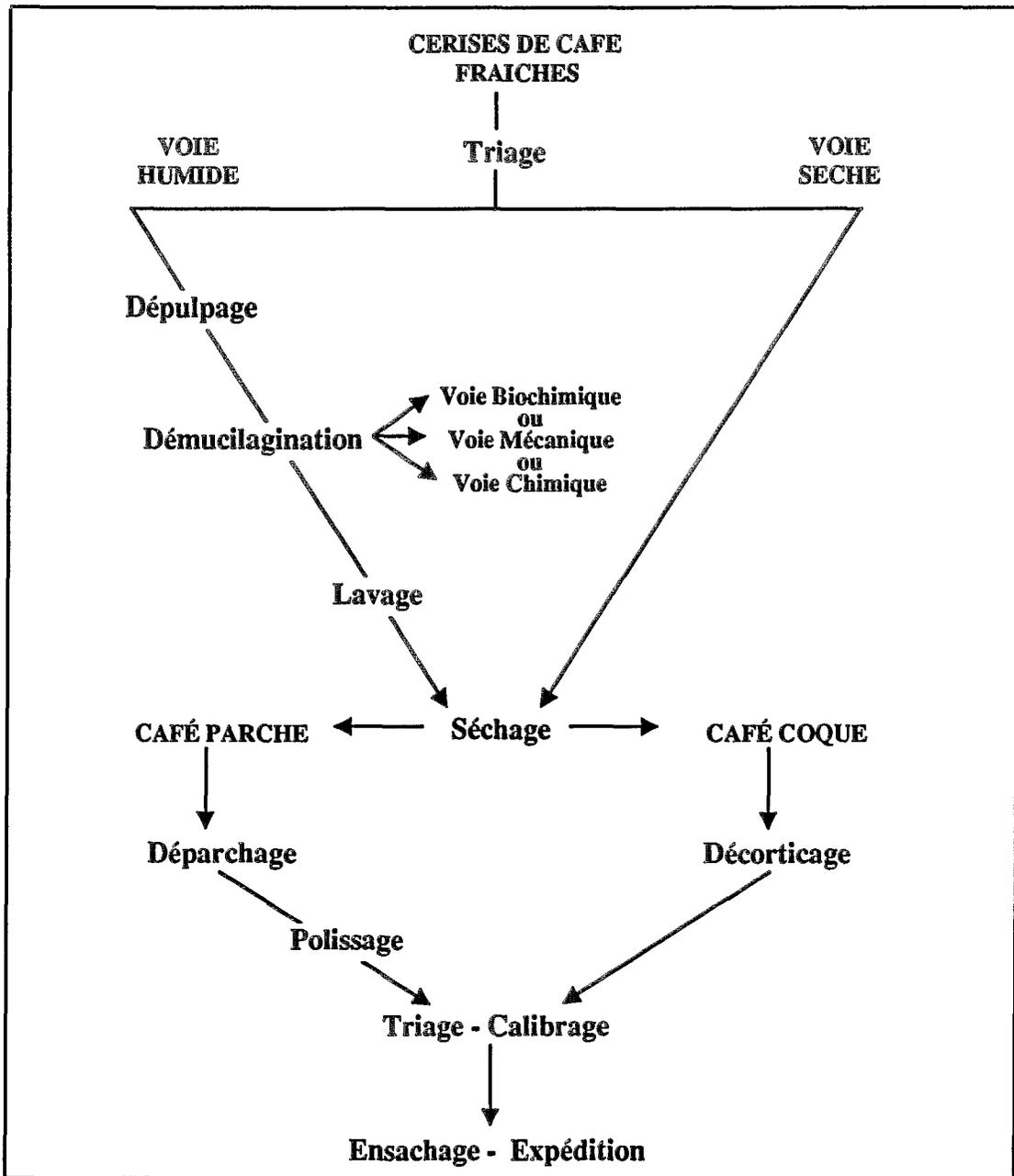
Les cafés traités par la méthode dite de la voie sèche, qualifiés de « nature » sont constitués par 80 % des cafés arabica du Brésil et presque tous les cafés robusta.

#### 2.1.3.1 - La voie sèche

Dans ce procédé, aucun lavage n'est nécessaire, mais ce mode de traitement exige plus de temps que la voie humide. Il consiste à sécher la cerise entière pour ramener sa teneur en eau de 70 à 12 % PMF.

Le séchage : Il peut s'effectuer de façon naturelle ou artificielle. Après la récolte, les cerises de café sont étendues au soleil sur des aires de séchage. Elles doivent être étalées en couche mince ( $\approx 30 \text{ kg.m}^{-2}$ ), fréquemment remuées, abritées pendant la nuit et en période de pluie (COSTE, 1989). Il est parfois difficile d'obtenir des cerises sèches à 12 % d'eau par simple séchage solaire, un séchage de finition artificiel est alors effectué à l'aide de séchoirs de type statique, rotatif ou vertical qui équipent généralement les centres de décortiquage. A l'issue du séchage, la pulpe, le mucilage et la parche constituent une coque enveloppant les graines qu'il suffit de briser pour les libérer.

Le décortiquage : Il consiste à faire éclater la coque dans des appareils à percussion. Cette opération fournit un des résidus du café le plus important en quantité : les coques.



**Figure 2.8 : Opérations successives dans le traitement des cerises de café par voie humide et par voie sèche (WILBAUX, 1956)**

### 2.1.3.2 - La voie humide

Le traitement par voie humide conduit la cerise fraîche au café « parche sec ». Il est effectué dans des centres de dépulpage. Les cerises récoltées sont amenées au plus tôt dans le centre de traitement, où elles subiront les opérations technologiques suivantes :

La réception : Les cerises sont versées dans une cuve munie d'un siphon. Les cerises flottantes, qui représentent généralement 15 % des lots, sont récupérées et seront traitées séparément par voie sèche. Les cerises les plus lourdes, passant par le siphon, sont transférées vers les dépulpeurs dans un courant d'eau.

Le dépulpage : Cette opération a pour but d'éliminer la pulpe. Les cerises fraîches et nettoyées (séparées des débris végétaux et des matières étrangères collectées au moment de la cueillette), sont passées dans des dépulpeurs dont les cylindres ou disques, pourvus d'aspérités, déchiquettent la pulpe et séparent les grains. Un courant d'eau facilite l'évacuation de la pulpe. Il a été estimé à  $40 \text{ m}^3 \cdot \text{t}^{-1}$  de café marchand la quantité d'eau nécessaire pour la réception, le transport hydraulique des cerises aux dépulpeurs, le dépulpage, l'évacuation des pulpes, le triage et le repassage des cerises non dépulpees (BRESSANI, 1978a). Ce chiffre, probablement réduit de nos jours, montre cependant l'importance des eaux résiduaires du traitement du café et annonce déjà le problème de valorisation des divers résidus du café. Les eaux issues de ce traitement entraînent environ 30 % de la Matière Organique (MO) de la pulpe et leur charge polluante correspond à une Demande Chimique en Oxygène (DCO) comprise entre 9 et  $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

La démulcination : Une partie du mésocarpe mucilagineux adhère encore à la parche après dépulpage. Le café parche doit en être totalement débarrassé car riche en pectines et en sucres, il pourrait provoquer des fermentations indésirables pendant le séchage. Le mucilage est éliminé par l'une des techniques suivantes :

- *Action biochimique* : C'est l'hydrolyse de la pectine, par les pectinases endogènes du fruit et de la microflore, en acide pectinique, qui conduit à l'élimination des propriétés gélifiantes de la pectine.
- *Action chimique* : On utilise des solvants à base d'acides avec une agitation mécanique forte.
- *Action mécanique* : Par des machines « démulcineuses » qui nécessitent une grande quantité d'eau et d'énergie.

La voie biochimique est la méthode la plus largement utilisée. Cette opération est généralement conduite dans des bacs en ciment où le café est amené par transport hydraulique. La durée du traitement varie selon les conditions locales. L'hydrolyse du mucilage est provoquée par des pectinases présentes dans le fruit, et accélérée par la présence de microorganismes. Au cours de la « fermentation », le pH diminue de 6.5-6.8 à 4.5-4.8. L'extraction des composés phénoliques, de diterpènes en particulier, permet une diminution de la dureté et de l'amertume. La fermentation rend le produit fini plus acide, ce qui est, jusqu'à un certain seuil, un critère de qualité.

Le lavage : Il a pour but d'éliminer les produits formés au cours de la fermentation, les débris de mucilage, une partie des composés phénoliques, etc.... Le café est poussé et brassé à contre-courant dans des laveurs, ou traité dans de grandes centrifugeuses. Les eaux résiduaires de ce lavage représentent des volumes très importantes et contiennent une DCO de 5 à  $6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Le séchage : Après le lavage, le grain en parche contient 50 à 60 % d'eau et s'altérerait s'il était stocké en l'état. Le séchage peut se faire de façon naturelle par étallement sur des aires cimentées, ou artificielle dans des séchoirs rotatifs, de type tunnel par exemple, jusqu'à une humidité de 11 à 12 % (café parche).

Les techniques de séchage solaire ou artificiel sont analogues à celles utilisées dans le traitement par voie sèche. Cependant, dans le cas du séchage artificiel, il est indispensable de sécher le café parche dans des conditions assez douces : la température de l'air séchant est voisine de 60 °C et la vitesse de l'air est inférieure à 1 m.s<sup>-1</sup>. On limite ainsi la formation de produits indésirables.

### 2.1.3.3 - Les opérations communes aux deux voies

Ces opérations sont souvent regroupées dans des usines de conditionnement qui reçoivent le café coque ou le café parche et produisent le « café vert » ou le « café or ».

Le nettoyage : Les cafés en parche, et surtout en coques, contiennent beaucoup d'impuretés : poussières, cailloux, autres matières étrangères. Ces impuretés seront éliminées à l'aide de nettoyeurs-séparateurs qui combinent les effets du criblage et de la ventilation.

Le reséchage : Le reséchage est souvent nécessaire pour les produits ayant subi un séchage solaire sur les lieux de la récolte. Leur teneur en eau est souvent supérieure à 12 %, limite maximum à respecter pour assurer une bonne conservation. On utilise généralement des séchoirs industriels horizontaux ou verticaux.

Le décorticage - Le départage : Le café vert est obtenu après décorticage du café coque ou départage du café parche. Le principe des départeurs est basé sur une percussion réglée de façon à éclater la petite noix fragile à laquelle le grain est attaché par une fine lamelle tout le long du sillon, sans briser le grain lui-même. L'élimination de la pellicule est ensuite effectuée par des polisseuses. Ces deux opérations peuvent être effectuées simultanément.

Le classement granulométrique : Le café vert « tout-venant » est classé par grade à l'aide de calibreurs à tamis plans ou à tambours rotatifs.

Le triage densimétrique : Ce triage pneumatique permet d'éliminer les poussières, les fragments légers, les grains de café légers, piqués ou malformés. Il existe deux types d'appareils : le « catador » où la séparation se fait dans un courant d'air ascendant ; la table densimétrique à air pulsé.

Le triage colorimétrique : Son but est d'éliminer en particulier les grains de café noirs qui constituent un grave défaut, car ils donnent un goût âcre au produit final, et de rejeter les grains de café de couleur havane souvent générateurs de goûts puants, défauts rédhibitoires. Traditionnellement, ce triage s'effectuait manuellement, mais les trieuses électroniques sont de plus en plus souvent utilisées : des cellules photoélectriques détectent les défauts, les grains de café défectueux sont éjectés par une soufflerie.

L'ensachage : Le « café vert » marchand ainsi obtenu est ensuite mis en sac de 60 kg et exporté vers les pays consommateurs, où a lieu généralement l'opération de torréfaction.

#### 2.1.3.4 - Le choix entre ces deux méthodes

Le type de procédé auquel est soumis le fruit du café après sa récolte dépend en grande partie de l'espèce, de la variété du café cultivé, de la disponibilité en eau et, surtout, du type de récolte pratiqué.

Le plus souvent, les cafés arabica récoltés rationnellement (récolte manuelle du fruit mur et sain) sont traités par la voie humide et sont à l'origine de boissons de haute qualité. Les cafés arabica et robusta récoltés indifféremment (fruit murs, verts, tâchés, secs sur l'arbre, recueillis sur le sol, etc...) sont traités par la voie sèche (séchés avec la pulpe) et donnent des boissons de qualité moyenne et basse respectivement.

La voie sèche est plus pratique et plus économique, mais porte préjudice à la qualité du café. Elle produit moins de déchets que la voie humide et apparaît plus respectueuse de l'environnement. Cependant, si les déchets secs ne sont pas utilisés immédiatement, ils se réhumidifient rapidement (pluie, humidité ambiante) et deviennent une sérieuse source de pollution environnementale.

La voie humide demande davantage d'installations et d'investissements, mais elle donne des cafés plus appréciés (aspect, couleur et goût). Ainsi, le recours à cette dernière voie est de règle pour les cafés arabica de choix (Amérique Centrale, Colombie, etc...).

#### 2.1.3.5 - Le procédé semi-humide

Tout le café produit au Mexique (en moyenne 5 millions de sacs) est transformé par voie humide et génère une pollution organique évaluée à 13,2 millions de m<sup>3</sup> contenant 42 000 tonnes de DCO, soit environ 280 tonnes.j<sup>-1</sup>, l'équivalent des effluents quotidiens d'une ville de 5,6 millions d'habitants (CASTILLO et coll., 1993). En Colombie, la capacité polluante de la matière organique de trois kilogrammes de fruits de café mûrs au cours du processus classique de traitement par voie humide est équivalente à celle d'un habitant par jour et produit 136,5 litres d'eaux résiduelles domestiques (ZULUAGA, 1989). Il est possible d'économiser l'eau lors du dépulpage sans porter préjudice à la qualité du café. Au cours de cette étape, l'eau joue deux rôles : lubrification des disques, et évacuation hydraulique de la pulpe. Cette dernière fonction nécessite beaucoup d'eau. Trois solutions sont proposées par BAILLY et coll. (1992) :

- changer la technologie de dépulpage en utilisant par exemple un dépulpeur vertical sans eau (ZULUAGA et coll., 1991). Cette technique mise au point au Centre de Recherches de CENICAFÉ à Manizales en Colombie, associée à un transport mécanique des grains et de la pulpe, permet de diminuer la quantité d'eau nécessaire au traitement des cerises de café de 70 à 75 %. En Inde, la consommation totale en eau a été réduite de 90 % (de 80 000 à 8 000 litres par tonne de café parche lavé) grâce à l'utilisation d'une machine capable de dépulper et de laver simultanément avec peu d'eau (ANANDA ALWAR et coll., 1990) ;

- entraîner les cerises jusqu'au dépulpeur puis évacuer la pulpe par voie mécanique sur des rails grâce, par exemple, à un système de vis sans fin (ZULUAGA et coll., 1991) ;

- recycler l'eau de dépulpage. Cette technique, conseillée au Kenya (FINNEY, 1989), a permis de réduire la consommation d'eau 11,6 à 7,5 litres par kilogramme de cerises.

#### 2.1.4 - Les résidus du traitement du café

Lors de la préparation de la boisson café, seulement 5,8 % du poids de la cerise fraîche est mis à profit (Figure 2.9) ; les 94,2 % restant, constitués par l'eau et les sous-produits du procédé, sont encore peu utilisés à ce jour et deviennent une source de pollution du milieu ambiant (CALLE, 1977 ; CLAUDE, 1979 ; BRAHAM et BRESSANI, 1978 ; BRESSANI, 1978b ; ADAMS et DOUGAN, 1981 ; ROLZ et coll., 1982 ; VERNET, 1987 ; ZULUAGA, 1989).

De 100 g PMF de cerises de café, environ 29 % de son poids sec représente la pulpe de café, 12 % la coquille de la cerise, environ 4 % le mucilage et 55 % les grains de café (BRESSANI, 1978a). Voici quelques données sur les rendements des différents traitements :

100 kg de cerises mures de café *Canephora (Robusta)* donnent environ :

- par la voie humide : 74 kg de café dépulpe	- par la voie sèche : 40 à 45 kg de cerises sèches
52 kg de café lavé	22 kg de café marchand
49 kg de café égoutté	
44 kg de café préséché	- les sous-produits : 56 à 60 kg de pulpe fraîche
26 kg de café parche	12 à 15 kg de pulpe sèche
22 kg de café marchand	3 à 5 kg de parche
	20 kg de coques

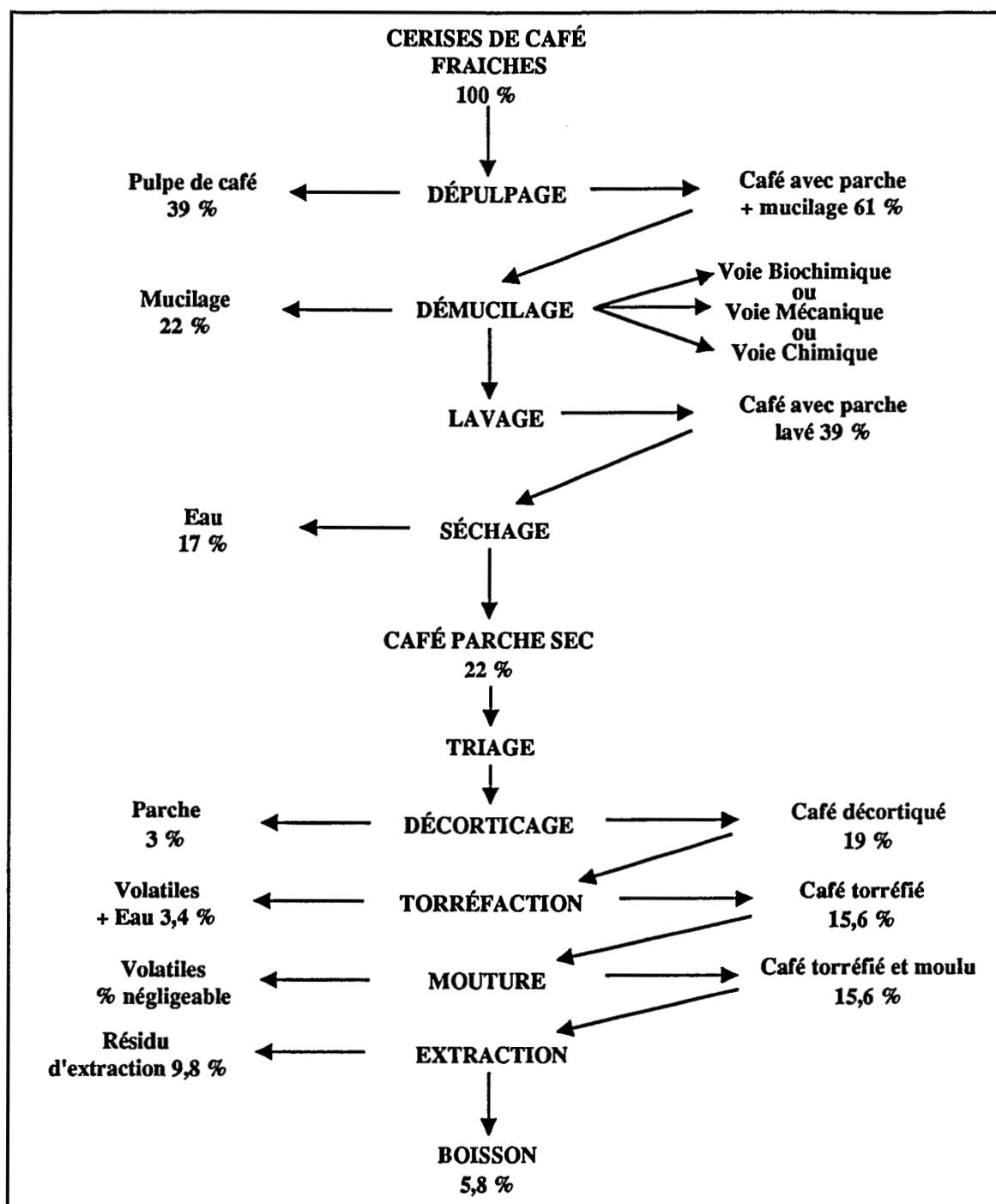
100 kg de cerises mûres de café arabica par la voie humide donnent :

39 kg de pulpe fraîche ou 16 kg de pulpe séchée  
22 kg de mucilage  
39 kg de café parche humide ( $\approx$  20 % d'humidité)

100 kg de café parche humide donnent environ :

79 kg de café parche sec  
54 kg de café marchand sec

Quelque soit le traitement appliqué, le rendement final moyen en café marchand est d'environ 20 %. Ce pourcentage peut être très fluctuant d'une usine à une autre (COSTE, 1989).



**Figure 2.9 : Répartition en pourcentage des macrocomposants obtenus lors du traitement par la voie humide des cerises de café (ZULLAGA, 1981)**

1 kg de cerises de café traité par la voie sèche fournit 200 g de coques (COSTE, 1989), qui constituent 30 à 40 % de la cerise fraîche. Des essais d'utilisation des coques et des parches en alimentation animale ont montré qu'une ration alimentaire contenant entre 10 à 20 % de ces déchets n'affecte pas la digestibilité des aliments. Le compostage de ces déchets permet d'obtenir des engrais qui améliorent les teneurs en carbone et en azote organique des sols. On peut également utiliser les coques pour en extraire la caféine, les coques contiennent en effet de 0,4 à 0,7 % de cet alcaloïde. Mais l'utilisation qui semble actuellement la plus intéressante au plan économique est la combustion directe. Le pouvoir calorifique élevé de ces

produits (3 600 kcal.kg<sup>-1</sup> de coque) permet une valorisation rentable par combustion, lorsque les déchets sont exploités sur le lieu même de leur production. Cependant, la combustion de ce matériel produit des gaz et des vapeurs corrosives qui dégradent les chaufferies et contaminent les produits. C'est pourquoi on utilise ce substrat pour un chauffage indirect. Par ailleurs, les coques de café séchées peuvent devenir un produit polluant si elles se réhumidifient accidentellement.

La voie humide dégage des volumes importants de déchets dont les plus importants sont la pulpe (39 % du poids de fruit frais) et le mucilage (22 %) (ZULUAGA, 1981). Il existe de nombreuses possibilités pour valoriser ces sous-produits. Elles sont présentées dans la figure 2.10 en ce qui concerne la pulpe et dans la figure 2.11 pour le mucilage.

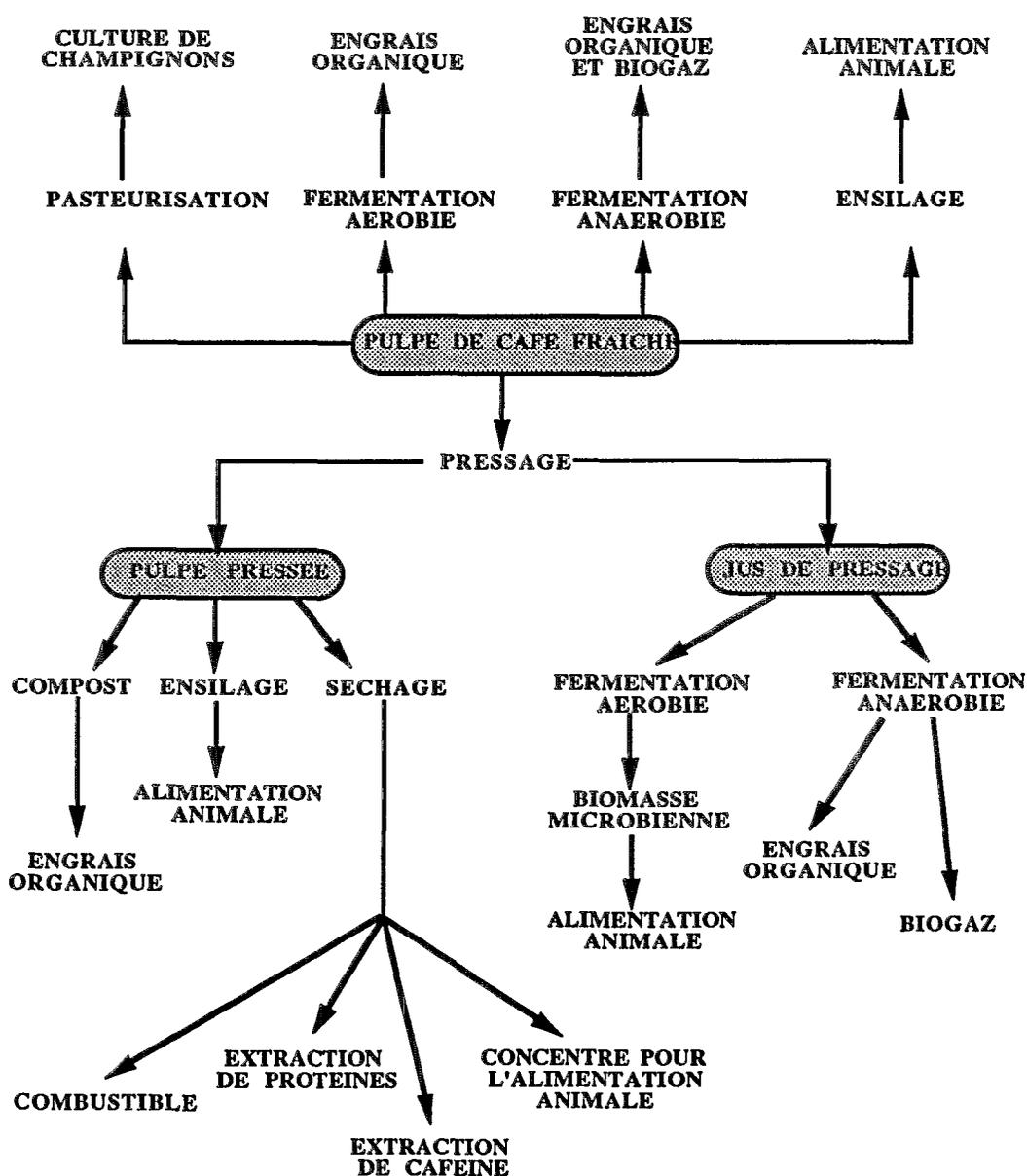
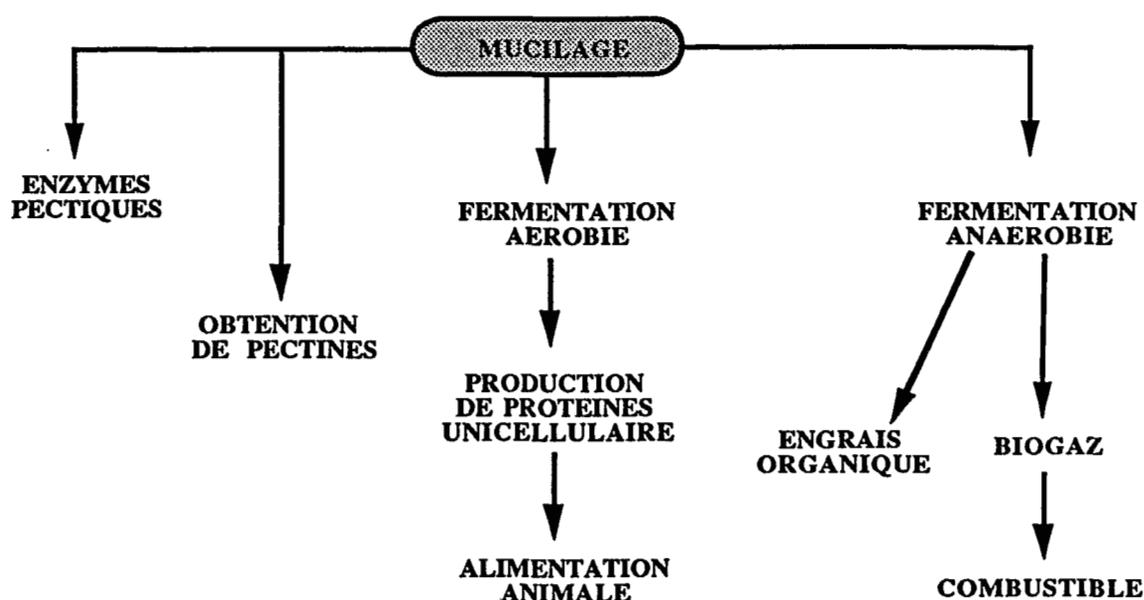


Figure 2.10 : Possibilités de valorisation de la pulpe de café (SANCHEZ et coll., 1985)



**Figure 2.11 : Possibilités de valorisation du mucilage (SANCHEZ et coll., 1985)**

L'important volume des résidus de traitement de café a guidé de nombreuses recherches sur leurs utilisations possibles (Tableau 2.2). L'utilisation de ces sous-produits reste soumise à une série de facteurs comme les quantités produites, le type de traitement appliqué, leurs distributions saisonnières et régionales, leur taux d'humidité, leur stockage et leur préservation, l'importance commerciale des produits obtenus et leur compétitivité avec d'autres produits. Plusieurs de ces facteurs limitent l'utilisation industrielle des sous-produits du café (ZULUAGA, 1989) :

- le taux d'humidité important des sous-produits, qui rend anti-économique leur transport ou leur déshydratation, les structures de séchage étant utilisées en priorité pour le grain ;
- le bas prix des produits actuellement obtenus ;
- le fait que, dans de nombreux pays, la production de café provient, en grande majorité, de petites exploitations, ce qui nécessite leur transport vers des centres plus importants.

Dans les publications sur l'utilisation industrielle des sous-produits du café, la constante est souvent l'absence d'étude économique de faisabilité. Il est nécessaire aussi d'estimer les bienfaits, du point de vue environnemental, de la transformation de ces sous-produits, cette opération évitant leur évolution comme sources de pollution.

Actuellement, c'est la biotechnologie qui ouvre le plus de perspectives pour l'utilisation des sous-produits agroindustriels, de façon rentable, en permettant l'obtention de produits finaux à haute valeur ajoutée (enzymes ou métabolites secondaires). Il semble ainsi possible d'obtenir à court terme des utilisations concrètes au niveau industriel des sous-produits du traitement du café (ROUSSOS et coll., 1993a).

**Tableau 2.2 : Liste des différents sujets de recherche concernant les possibilités d'utilisations des sous-produits issus de la transformation industrielle du café.**

SUJETS D'ETUDES	AUTEURS
Alimentation des ruminants	CABEZAS et coll., 1978
Alimentation des porcs	JARQUIN, 1978
Alimentation animale	BRAHAM, 1978
Ensilage de la pulpe	MURILLO, 1978
Séchage des sous-produits	MOLINA, 1978
Traitements chimiques	GOMEZ-BRENES, 1978
Valorisation du jus de pulpe pressée	DE LEON et coll., 1980
Fermentation anaérobie de la pulpe	BLANES, 1982
Amélioration de la valeur nutritive de la pulpe	PEÑALOZA et coll., 1985
Production de champignons comestibles sur pulpe	MARTINEZ-CARRERA et coll., 1989
Production d'enzymes à partir de pulpe	FAVELA et coll., 1989
Traitements des eaux résiduelles	MORALES-OLGUIN, 1989
Traitements des eaux résiduelles	BAILLY et coll., 1992
Détoxication de la pulpe par des champignons filamenteux	AQUIAHUALT et coll., 1988
Détoxication de la pulpe par des champignons filamenteux	ROUSSOS et coll., 1991
Production de probiotiques à partir de la pulpe	TAPIA et coll., 1989
Lombricompost à partir de la pulpe	DAVILA et ARANGO, 1991
Méthanisation des résidus de torréfaction	KOSTENBERG et MARCHAIM, 1993

## 2.2 - La pulpe de café

La pulpe de café est la partie charnue qui se trouve entre l'écorce et les grains, appelée aussi mésocarpe. Elle est formée d'une couche de cellules spongieuses d'une épaisseur approximative de 5 mm (ZULUAGA, 1989). Nous nous intéresserons plus particulièrement, au cours de ce travail, à la pulpe issue du traitement par voie humide de la cerise de café de type arabica.

Rappelons les trois facteurs qui justifient l'étude de ce substrat :

- la grande quantité de pulpe disponible dans les pays producteurs ;
- les problèmes de pollution (Figure 2.12) engendrés par la production élevée de ce sous-produit (ZULUAGA, 1989) ;
- la possibilité, d'après sa composition chimique, d'utiliser la pulpe de café comme matière première pour l'obtention de différents produits.

D'autres facteurs, par contre, limitent l'utilisation de ce sous-produit agricole :

- le taux d'humidité élevé de 80 à 85 % (BRESSANI et coll., 1972) ;
- la nature saisonnière de la production (disponibilité 3 à 5 mois par an) ;
- la présence de substances ayant un effet antiphysiologique, telles que la caféine et les composés phénoliques indésirables en alimentation animale.



Figure 2.12 : Aire de stockage de la pulpe de café en Colombie

### 2.2.1 - La composition chimique de la pulpe de café

La composition chimique de la pulpe de café a été déterminée par plusieurs auteurs. Elle diffère suivant la variété du caféier, la maturité du fruit, le type de traitement appliqué et le lieu de production.

Le tableau 2.3 présente une synthèse des résultats obtenus sur de la pulpe de café fraîche et déshydratée. On note la part importante constituée par les hydrates de carbone, les fibres, les cendres et les protéines.

Tableau 2.3 : Composition chimique de la pulpe de café (% PMS)  
\* ELIAS (1978) ; \*\* ZULUAGA et coll., (1975)

	Pulpe fraîche *	Pulpe Déshydratée		
		*	**	Autres auteurs
Humidité	76,70	12,60	6,93	
Matière sèche	23,30	87,40	93,07	
Lipides	0,48	2,50	2,50	2,30 à 2,50 JAFFE et ORTIZ, 1952
Fibres	3,40	21,00	15,10	13,20 à 27,60 AGUIRRE, 1966 18,10 JAFFE et ORTIZ, 1952
Protéine (N*6,25)	2,10	11,20	8,25	9,20 AGUIRRE, 1966
Cendres	1,50	8,30	8,12	
Hydrates de carbone	15,80	44,40	59,10	43,00 JAFFE et ORTIZ, 1952 57,80 à 66,10 AGUIRRE, 1966

Le tableau 2.4 présente la composition en acides aminés essentiels et non-essentiels des protéines de la pulpe de café, en comparaison avec d'autres sources importantes de protéines végétales.

**Tableau 2.4 : Composition en acides aminés des protéines de la pulpe de café (g/16N), comparaison avec d'autres sources de protéines végétales (BRESSANI et coll., 1972)**

Acides Aminés	Pulpe de Café	Mais	Farine de Soja	Farine de graine de coton
Lysine	6,8	1,7	6,3	4,3
Histidine	3,9	2,8	2,4	2,6
Arginine	4,9	3,1	7,2	11,2
Thréonine	4,6	3,3	3,9	3,5
Cystéine	1,0	1,0	1,8	1,6
Méthionine	1,3	1,6	1,3	1,4
Valine	7,4	5,0	5,2	4,9
Isoleucine	4,2	4,3	5,4	3,8
Leucine	7,7	16,7	7,7	5,9
Tyrosine	3,6	5,0	3,2	2,7
Phénylalanine	4,9	5,7	4,9	5,2
Hydroxyproline	0,5	--	--	--
Acide aspartique	8,7	--	--	--
Sérine	6,3	--	--	--
Acide glutamique	10,8	--	--	--
Proline	6,8	--	--	--
Glycine	6,7	--	--	--
Alanine	5,4	--	--	--

La composition en acides aminés de la pulpe de café est très similaire à celle des farines de soja et de coton, mais elle contient plus de valine et de lysine et moins de leucine, de tyrosine et de phénylalanine que la farine de maïs. Les acides aminés essentiels les plus abondants dans la pulpe de café sont : la lysine, la thréonine, la tyrosine, la valine et la phénylalanine et en moindre importance : la méthionine et l'isoleucine. Ces résultats sont en accord avec ceux de JARQUIN et coll. (1973). Il sera important de tenir compte de ces informations pour la formulation d'aliments concentrés pour l'alimentation animale.

BRESSANI et coll. (1972) notent que 40 % de l'azote total de la pulpe de café, déterminé par la méthode de Kjeldhal, est de l'azote non protéique contenu dans la caféine, la trigonelline, la niacine, les purines, les pyrimidines, l'azote inorganique et d'autres fractions qui ne sont pas identifiées. Par conséquent, la faible concentration en acides aminés déterminée par d'autres auteurs peut venir du fait que seulement 60 % de l'azote provient des protéines.

Les autres composés organiques présents dans la pulpe de café (caféine, composés phénoliques, sucres, substances pectiques) sont donnés dans le tableau 2.5.

**Tableau 2.5 : Les autres composés organiques de la pulpe de café**

en % de matière sèche	BRESSANI et coll., 1972	Autres Auteurs
Caféine	1,30	0,51 % (JAFFE et ORTIZ, 1952) 0,75 % (ZULUAGA et coll., 1975) 1,14 % (TAUK, 1986)
Tanins	1,80 à 8,56	4,50 % (AGUIRRE, 1966) 1,44 % (JAFFE et ORTIZ, 1952) 2,40 % (MOLINA et coll., 1974b) 3,70 % (ZULUAGA et coll., 1975)
Acide chlorogénique	2,60	2,71 % (MOLINA et coll., 1974b) 2,30 % (BRESSANI et ELIAS, 1976)
Acide caféique total	1,60	0,31 % (MOLINA et coll., 1974b) 1,60 % (BRESSANI et ELIAS, 1976)
Substance pectique totale	6,50	
Sucres réducteurs	12,40	
Sucres non réducteurs	2,00	

On observe un taux non négligeable de caféine, de tanins, d'acide chlorogénique et d'acide caféique. Ces composés sont responsables de la toxicité connue de la pulpe de café (BRESSANI, 1978c).

Le tableau 2.6 résume les valeurs moyennes en composés minéraux de la fraction « cendres » de la pulpe de café. La concentration importante en potassium peut constituer un des facteurs antinutritionnels en alimentation animale (JARQUIN et coll., 1973 ; CAMPABADAL, 1987). On trouve aussi 11,1 % d'acide salicilique dans les cendres (AGUIRRE, 1966)

Composés		Valeurs
Cendres	% MS	8,3
Calcium	% MS	0,55
Phosphore	% MS	0,12
Fer	% MS	0,02
Sodium	% MS	0,1
Potassium	% MS	1,76
Magnésium		Traces
Zinc	ppm	4
Cuivre	ppm	5
Manganèse	ppm	6,25
Bore	ppm	26

**Tableau 2.6 : Cendres et composés minéraux de la pulpe de café (BRESSANI et coll., 1972)**

WILBAUX (1956) donne les chiffres suivants pour les principaux constituants de la fraction hydrate de carbone (% PMS) : cellulose 27,65 ; sucres réducteurs 12,40 ; sucres non réducteurs 2,02 ; substances pectiques totales 6,52.

Le tableau 2.7 exprime les résultats du fractionnement de la paroi cellulaire et des polysaccharides de la pulpe de café. Le contenu cellulaire de 63 % suggère que ce matériel

contient des niveaux relativement élevés de nutriments. Il est supérieur à celui de la peau des agrumes, matériel très utilisé dans l'alimentation animale. Les valeurs de lignocellulose, de cellulose et de lignine confirment que ce matériel est supérieur à d'autres produits utilisés dans l'alimentation animale. Il faut noter qu'environ 3 % des protéines se trouvant sous forme lignifiée, sont probablement non disponibles pour l'animal (MURILLO et coll., 1977). D'autre part, le taux important de fibres peut constituer un obstacle à son utilisation directe dans l'alimentation des animaux monogastriques.

Composés	en % PMS
Contenu cellulaire	63,20
Fibre détergente neutre	36,80
Fibre détergente acide	34,50
Hémicellulose	2,30
Cellulose	17,70
Lignine	17,50
Protéine lignifiée	3,00
Protéine "cru"	10,10
Cendres insolubles	0,40

**Tableau 2.7 : Constituants des parois cellulaires et des polysaccharides de la pulpe de café (g %) (ELLAS, 1978)**

L'analyse des sucres de la pulpe de café par chromatographie liquide montre qu'elle contient 22,65 % de sucres libres (ZULUAGA, 1981). Leur nature et leur proportion respectives sont données dans le tableau 2.8. L'accroissement de 4 % en teneur totale des sucres libres entre la pulpe lyophilisée et la pulpe séchée au soleil peut s'expliquer par l'hydrolyse des glycosides et des polysaccharides pendant le séchage au soleil. Leur étude quantitative et qualitative est importante si l'on considère que la pulpe, une fois pressée, fournit un jus utilisable comme milieu de culture pour des champignons filamenteux (GOPALAKRISHNA RAO et NATARAJAN, 1974).

**Tableau 2.8 : Composition en sucres de la pulpe de café (ZULUAGA, 1981)**

SUCRES	Pulpe lyophilisée		Pulpe séchée au soleil	
	mg/100mg	% du total	mg/100mg	% du total
$\alpha + \beta$ -D-Fructose	9,92	43,80	15,20	57,10
D-Galactose	2,40	10,60	1,88	7,00
$\alpha$ -D-Glucose	3,42	15,10	4,52	17,00
$\beta$ -D-Glucose	3,42	15,10	3,11	11,70
Inositol	0,28	1,20	0,10	0,40
Saccharose	3,21	14,20	1,83	6,80
<b>TOTAL</b>	<b>22,65</b>	<b>100,00</b>	<b>26,64</b>	<b>100,00</b>

Le D-fructose (anomère  $\alpha + \beta$ ) constitue approximativement 50 % des sucres libres et cette concentration augmente pendant le séchage au soleil. Le deuxième sucre important est le

D-glucose (anomère  $\alpha + \beta$ ) qui représente 30 % du total dans la pulpe lyophilisée. Les 20 % restants sont constitués par le saccharose et le galactose. La concentration de saccharose diminue de moitié pendant le séchage au soleil. Le taux en inositol est pratiquement négligeable.

En conclusion, on peut remarquer que dans la pulpe de café se trouvent des substances chimiques attractives pour l'alimentation animale (sucres libres, protéines, hémicellulose, cellulose) ; cependant elles sont étroitement liées à d'autres substances (caféine et composés phénoliques) qui peuvent être toxiques pour certains animaux (poulets, porcs, bovins).

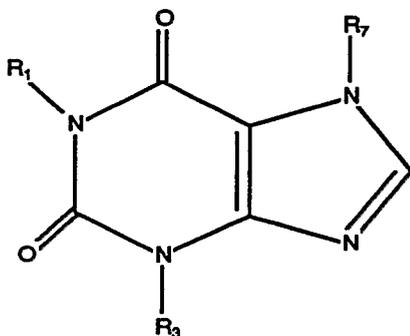
### 2.2.2 - Les facteurs toxiques dans la pulpe de café

La limitation principale à l'utilisation de la pulpe de café comme substrat pour l'alimentation animale réside dans la présence de composés toxiques tels que la caféine (0,6 à 1,3 % PMS), les phénols libres (l'acide chlorogénique : 0,18 à 3,16 % PMS ; l'acide caféique : 0,28 à 2,58 % PMS ; l'acide tannique : 2,30 à 5,5 % PMS), les phénols polymériques (c'est-à-dire les tanins hydrolysables et les tanins condensés) et la forte concentration de potassium (BRESSANI, 1978c).

Toutes ces substances peuvent directement ou indirectement avoir un effet toxique ou antiphysiologique. Il est possible que la pulpe de café contienne d'autres substances responsables des effets observés chez les animaux par action individuelle ou par une action de synergie avec les composés mentionnés.

#### 2.2.2.1 - La caféine

La caféine est une purine appartenant à la famille des alcaloïdes. C'est en fait le nom générique de la 1-3-7-triméthylxanthine. Sa formule chimique est :  $C_8H_{10}N_4O_2$ . Son poids moléculaire est de  $194,2 \text{ g.mol}^{-1}$  (WINDHOLZ et coll., 1983). La figure 2.13 présente les différents dérivés méthylés de la xanthine, dont la caféine.



	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>
CAFEINE	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
THEOPHYLLINE	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
PARAXANTHINE	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
THEOBROMINE	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
1-METHYLYXANTHINE	CH <sub>3</sub>	H	H
3-METHYLYXANTHINE	H	CH <sub>3</sub>	H
7-METHYLYXANTHINE	H	H	CH <sub>3</sub>
XANTHINE	H	H	H

Figure 2.13 : Représentation chimique de la xanthine et de ses dérivés méthylés

La caféine est une substance cristalline, sans arôme, dont la saveur est légèrement amère. Sa présence est signalée dans plus de 50 espèces végétales. Les plus connues sont le caféier (graines 0,6 à 2,7 % PMS et feuilles) ; le cacaoyer (fèves) ; le kolatier (noix 2 à 3 %) ; le thé (feuilles 1 à 4 %) ; le maté (feuilles 1 à 4 %) ; le guarana (fruit) (COSTE, 1989). On trouve souvent d'autres méthyl-xanthines (par exemple la théobromine et la théophylline) dans ces mêmes plantes, parfois en proportion supérieure (la théophylline dans le thé ou la théobromine dans le cacao) (SUZUKI et WALLER, 1988).

#### 2.2.2.1.1 - Les effets physiologiques de la caféine

PUTRAMENT et coll. (1972) ont démontré que la caféine, en concentration supérieure à 0,1 %, inhibe de manière réversible la croissance d'*Escherichia coli* et de *Saccharomyces cerevisiae* en bloquant rapidement la synthèse de l'ARN et des protéines. D'autres auteurs (HARM, 1967 ; KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971 ; MIDDLEHOVEN et BAKKER, 1982) ont montré le rôle mutagène de la caféine chez les microorganismes.

La concentration moyenne en caféine de la pulpe de café varie de 0,6 à 1,3 % PMS (BRESSANI et coll., 1972). Chez des animaux de laboratoire, les DL50 vont de 127 mg.kg<sup>-1</sup> chez la souris mâle à 355 mg.kg<sup>-1</sup> chez le rat mâle (WINDHOLZ et coll., 1983). La dose létale estimée pour l'homme est de l'ordre de 10 g soit environ 140 mg.kg<sup>-1</sup>.

Trois facteurs semblent importants dans les relations caféine-pulpe de café-alimentation chez différents animaux :

- la concentration relativement élevée d'azote dans la caféine ;
- l'effet connu de stimulant physique (RALL, 1980 ; LADER et BRUCE, 1986) ;
- l'effet diurétique (ARNAUD, 1987).

La caféine contient 26,38 % d'azote. Si l'on considère que la valeur moyenne en caféine dans la pulpe est de 1 % (ELIAS, 1978), l'azote provenant de celle-ci représente alors 0,26 %, ce qui donne une valeur moyenne de protéine (Nx6,25) égale à 1,6 %, soit 15 % du taux de protéines (Nx6,25) total.

L'effet diurétique de la caféine contenue dans la pulpe de café pourrait expliquer les diminutions de rétention et la perte par l'urine de l'azote. De plus, l'augmentation en acides gras chez les moutons alimentés avec de la pulpe de café (BRAHAM et coll., 1973) pourrait être attribuée à l'action lipolytique de la caféine, comme cela avait été démontré par BELLET et coll. (1965) et HAWKINGS et DAVIS (1970).

Les effets de la caféine dans l'alimentation animale ont été étudiés par de nombreux auteurs (BRAHAM et coll., 1973 ; JARQUIN et coll., 1973 ; VARGAS, 1974 ; CABEZAS et coll., 1974 et 1976 ; FLORES RECINOS, 1976). La consommation par des ruminants de grandes quantités de pulpe de café provoque des dysfonctionnements physiologiques tels que :

le tympanisme, l'inflammation des extrémités, la chute des poils, des problèmes de peau ainsi qu'une augmentation de la sécrétion urinaire. Des pertes de poids ont été enregistrées chez des ruminants dont la ration alimentaire comportait 25 % de pulpe de café.

#### **2.2.2.1.2 - La dégradation de la caféine**

Au cours des dernières années, plusieurs études ont été menées, avec pour objectif la diminution, voire l'élimination, des composés toxiques de la pulpe de café. Diverses méthodes physiques, chimiques et biologiques ont été proposées.

Méthodes physiques et chimiques : Les principales sont la déshydratation, l'extraction par des solvants, la macération avec des acides ou des traitements chimiques à l'hydroxyde de calcium ou le métabisulfite de sodium (BRESSANI et coll., 1972). Ces techniques sont employées pour la décaféination du café, mais celles-ci sont dangereuses car elles peuvent présenter des traces de solvants. De plus, ces traitements entraînent une perte de saveur des produits originaux. Enfin, ces techniques se révèlent coûteuses.

Méthodes biologiques : Ces techniques de dégradation par voie microbienne ont récemment intéressé de nombreux chercheurs, car elles se présentent comme une alternative intéressante sur le plan écologique. Parmi elles :

*La dégradation de la caféine par des bactéries* : certaines souches de *Pseudomonas putida* sont capables d'assimiler la caféine en l'utilisant comme seule source de carbone et d'azote (WOOLFOLK, 1975 ; BLECHER et LINGENS, 1977). Si certaines variétés ne peuvent se développer sur des milieux contenant plus de 5,5 g.l<sup>-1</sup> de caféine (BLECHER et LINGENS, 1977), d'autres ont montré une aptitude à résister à des teneurs de 20 g.l<sup>-1</sup> (MIDDELHOVEN et BAKKER, 1982).

*La dégradation de la caféine par des champignons filamenteux* sera traitée ultérieurement dans cette étude bibliographique (§ 2.4).

#### **2.2.2.2 - Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques appelés aussi polyphénols, sont présents dans tout le monde végétal et comprennent un groupe hétérogène de substances, certaines avec des structures chimiques relativement simples dont les plus importantes sont les anthocyanes (pigments rouges et bleus des fleurs et des fruits), les flavones et leurs dérivés (pigments jaunes) ; on peut ajouter les acides-phénols, dont la présence constante dans les plantes a été reconnue, ainsi que d'autres beaucoup plus complexes comme les tanins et la lignine (RIBEREAU-GAYON, 1968).

Dans le grain de café un taux élevé de ces composés et en particulier en acide chlorogénique (4 à 8 % PMS) a été déterminé (CLIFFORD, 1985). Des études sur les composés phénoliques de la pulpe de café ont été réalisées directement ou indirectement. Quelques résultats sont présentés ci-après :

Pour les acides chlorogéniques : 2,71 % (MOLINA et coll., 1974b)  
2,30 % (BRESSANI et ELIAS, 1976).

Pour les acides caféiques : 0,31 % (MOLINA et coll., 1974b)  
1,60 % (BRESSANI et ELIAS, 1976).

Pour les tanins : 4,50 % (AGUIRRE, 1966),  
1,44 % (JAFTE et ORTIZ, 1952)  
2,40 % (MOLINA et coll., 1974b)  
3,70 % (ZULUAGA et coll., 1975).

ZULUAGA (1981) a analysé deux échantillons de café arabica séchés l'un par lyophilisation, l'autre par exposition au soleil. La détermination quantitative des différentes classes de composés phénoliques a permis de constater l'absence de tanins dans la pulpe fraîche (lyophilisée) et une teneur de 2 % dans la pulpe séchée au soleil ; 21 % de ces derniers sont des tanins hydrolysables et le reste est constitué de tanins condensés (Tableau 2.9).

**Tableau 2.9 : Composition en composés phénoliques de la pulpe de café.**  
Dosage par Folin-Ciocalteu après passage sur PVP (ZULUAGA, 1981)  
Les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique pour 100 mg de pulpe sèche

Pulpe	Phénols Totaux	Fraction non tanins			Fraction tanin		
		Phénols Simples	Flavo- noïdes	Total	Conden- sés	Hydroly- sables	Total
Lyophilisée	6,29	2,28	4,01	6,29	0	0	0
Séchée au soleil	6,62	1,72	2,83	4,55	1,64	0,43	2,07

La formation de tanins commence quelques heures après la récolte et s'accélère en présence d'eau et de chaleur. On observe alors une augmentation du taux de tanins condensés par polymérisation des anthocyanidines.

Des travaux plus récents ont été effectués par RAMIREZ-MARTINEZ (1988). Les résultats, obtenus par chromatographie liquide haute pression (HPLC) sont donnés dans le tableau 2.10.

**Tableau 2.10 : Valeurs moyennes des composés phénoliques de la pulpe de café fraîche RAMIREZ-MARTINEZ (1988)**

Composés phénoliques	Moyenne % PMS	% Total
Acide protocatechique	0,02	1,65
Catechine	0,03	2,44
Acide chlorogénique	0,53	41,67
Epicatéchine	0,27	21,23
Acide férulique	0,01	0,79
Acide chlorogénique I	0,07	5,50
Acide chlorogénique II	0,25	19,65
Acide chlorogénique III	0,06	4,72
Rutine	0,03	2,36
<b>Total</b>	<b>1,27</b>	<b>100,00</b>

Ces études ont été réalisées à partir de pulpe fraîche et de pulpe déshydratée de douze cultivars différents ; elles démontrent que la majorité (plus de 80 %) des composés phénoliques de la pulpe de café sont des acides chlorogéniques et des acides isochlorogéniques. CLIFFORD et RAMIREZ-MARTINEZ (1991) confirment ces résultats. D'autre part, la concentration totale en acide chlorogénique varie de 0,4 à 1,6 % PMS (RAMIREZ-MARTINEZ et CLIFFORD, 1990) ; ces valeurs sont légèrement inférieures à celles obtenues dans les études antérieures et déterminées par d'autres techniques de dosages.

BRESSANI (1978c), résume la possible action des phénols libres comme une interférence avec la digestibilité des protéines. Les études réalisées par VELEZ et coll. (1985) confirment que les composés phénoliques de la pulpe de café ont la capacité de se lier aux protéines, l'interaction maximale étant observée à pH 5. D'autre part, il est possible aussi que les composés phénoliques interfèrent avec l'utilisation de la thiamine et d'autres nutriments (SOMOGYI et NAGELI, 1976). DE ROZO et coll. (1985) ont démontré que les composés phénoliques diminuent considérablement la capacité d'absorption du fer, même pour des quantités correspondant à une ration alimentaire ne contenant que 10 % de pulpe de café.

### **2.2.2.3 - Le potassium et l'acide salicilique**

Les concentrations moyennes en potassium dans la pulpe de café sont élevées, voisines de 3,20 % PMS (ZULUAGA, 1989). Ces concentrations peuvent représenter un obstacle à l'utilisation de la pulpe de café pour l'alimentation de certains animaux, en modifiant l'équilibre ionique des tissus (VARGAS, 1974). D'autres auteurs ont déterminé 11,1 % d'acide salicilique dans la pulpe de café (AGUIRRE, 1966), ce qui en limite également l'utilisation.

### **2.2.3 - Les utilisations de la pulpe de café**

Le principal sujet de recherche sur la valorisation et l'utilisation de la pulpe de café est l'obtention d'un produit apte à la consommation animale sous forme d'ensilage ou de produit séché (BRESSANI et coll, 1974).

La pulpe de café peut également servir de substrat pour l'extraction de la caféine, les résidus de cette technique étant utilisés en alimentation animale. De nombreuses autres utilisations sont envisageables : extraction et/ou production de protéines, de substances pectiques, d'enzymes pectinolytiques, production de mélasses, d'alcool, de vinaigre, de fertilisants organiques, de biogaz. La pulpe de café peut aussi être un substrat utilisable pour la production de champignons comestibles ainsi que pour la lombriculture (Tableau 2.11).

#### **2.2.3.1 - En alimentation animale**

La pulpe séchée contient environ 10 % de protéines et moins de 25 % de fibres, facteurs intéressants pour l'alimentation animale. Cependant, la pulpe présente plusieurs inconvénients : sa faible appétence ne permet qu'une substitution partielle dans la ration

Tableau 2.11 : Inventaire des différentes possibilités d'utilisations de la pulpe de café

UTILISATIONS		AUTEURS
Alimentation animale	Général	BRAHAM et BRESSANI, 1978
	Général	CASSAIGNE MENDOZA, 1989
Incorporation directe	Ruminants	JARQUIN et coll., 1973
	Taureaux	RUIZ et RUIZ, 1977
	Vaches laitières	CABEZAS et coll., 1978
	Veaux	CABEZAS et coll., 1976
	Veaux	VARGAS et coll., 1982
	Porcs	JARQUIN et coll., 1974
	Porcs	JARQUIN et coll., 1977
	Porcs	JARQUIN et BRESSANI, 1977
	Rats et Poulets	BRESSANI et coll., 1973
	Poules pondeuses et Coqs	AX et LODGE, 1976
	Poules pondeuses et Coqs	VOHARA et coll., 1966
	Poissons <i>Tilapia aurea</i>	GARCIA et BAYNES, 1974
	Poissons Carpe	CHRISTENSEN, 1981
	Incorporation indirecte	Jus de pulpe enrichi
Résidu d'extraction		GOMEZ-BRENES, 1978
Résidu de pressage		GOMEZ-BRENES, 1978
Pulpe de café Ensilée		ADAMS et DOUGAN, 1981
Pulpe de café Ensilée		MURILLO, 1978
Pulpe de café Ensilée		BRESSANI et coll., 1974
Pulpe de café Ensilée		CABEZAS et coll., 1978
Pulpe de café Ensilée		JARQUIN, 1978
	Pulpe de café Ensilée	CALLE, 1977
Engrais organique		PEÑALOZA, 1981
		LARDES, 1984
		GOMEZ, 1978 a et b
		ARCILA, 1979
		TAUK, 1986
		BRESSANI et coll., 1972
		SUAREZ DE CASTRO, 1960
Production de Biogaz		CALLE, 1957
		HUTCHINSON, 1958
		CALLE, 1974a
		MORALES et CHACON, 1981
		BLANES, 1982
Production de Microorganismes	Levures <i>Torulopsis utilis</i>	CALLE, 1954
		CALLE, 1974b
	<i>Candida utilis</i>	CALLE, 1977
	Champignons filamenteux	PEÑALOZA, 1981
	Champignons filamenteux	AQUIAHUATL et coll., 1988
Production d'Enzymes	Pectinases, cellulases	ROUSSOS, 1985
	Pectinases, cellulases	FAVELA et coll., 1989
	Pectinases, cellulases	BOCCAS et coll., 1994
	Pectinases, cellulases	CORZO et coll., 1986
Production de Probiotiques		TAPIA et coll., 1989
Champignons comestibles	Pleurotes	GUZMAN et MARTINEZ-CARRERA, 1985
	Pleurotes	ROLZ et coll., 1988a et b
	Pleurotes	MARTINEZ-CARRERA et coll., 1989
Lombriculture	Lombric	DAVILA et ARANGO, 1991
	Lombricompost	SALAZAR et MESTRE, 1991
Extraction de caféine		MOLINA et coll., 1974a
		CUEVAS, 1976
		CLARKE et MACRAE, 1985

normale ; d'autre part sa teneur élevée en fibre et en lignine et son activité antiphysiologique diminuent fortement sa digestibilité, surtout chez les monogastriques. Cette toxicité, qui se traduit par une perte de poids, une inflammation cutanée ou une chute de poils serait attribuée à la caféine, aux tanins, aux acides chlorogéniques et caféïques et au taux de potassium. Les animaux refusent de consommer la pulpe de café lorsqu'elle représente la part principale de la ration alimentaire (CABEZAS et coll., 1976). A l'heure actuelle, elle est parfois incorporée dans la ration à raison de 30 % pour les poissons (GARCIA et BAYNES, 1974 ; CHRISTENSEN, 1981), de 20 à 30 % pour les bovins (CABEZAS et coll., 1978), 16 % pour les porcs (JARQUIN et BRESSANI, 1977) et 10 % pour les poulets (BRESSANI et coll., 1973).

La valorisation de la pulpe de café en tant qu'aliment pour les animaux peut se faire sous deux formes :

- par addition directe à la ration alimentaire ;
- par addition indirecte, c'est-à-dire après transformation du résidu.

L'intérêt de la pulpe fraîche incorporée directement dans l'alimentation animale est plus ou moins discuté. En effet, son utilisation présente certaines limites telles que sa disponibilité saisonnière et sa qualité médiocre due aux composés toxiques. Son niveau optimal d'incorporation dans la ration est d'environ 15 %. A ce pourcentage, aucun effet physiologique négatif n'est observé sur les ruminants (GOPALAKRISHNA RAO et NATARAJAN, 1974).

La pulpe de café contient 80 à 85 % d'humidité (BRESSANI et coll., 1972) mais il a été montré qu'après une opération de pressage, on peut réduire l'humidité à 55 - 60 % (MOLINA, 1978). Il est possible de produire des protéines fongiques à partir du jus de pulpe résultant de cette opération (DE LEON et coll., 1980). Le milieu de culture après la croissance peut être concentré afin d'obtenir une mélasse enrichie en protéines, utilisable en alimentation animale. On peut aussi extraire de la pulpe, à l'aide d'eau ou de solvants organiques, la caféine et d'autres substances valorisables (sucres, enzymes). Le résidu de pressage ou d'extraction de la pulpe fraîche peut être séché ou ensilé, et incorporé aux rations alimentaire animales (GOMEZ-BRENES, 1978).

L'ensilage est un procédé de "transformation" de la pulpe. Il s'applique également au tourteau de pulpe. La pulpe de café ensilée est supérieure à la pulpe sèche pour ce qui concerne sa valeur nutritionnelle, mais sa digestibilité *in vitro* est inférieure. L'amélioration de l'acceptabilité de la pulpe après ensilage semble être due à la diminution des teneurs en caféine et en tanins, entraînés par les produits de drainage (ADAMS et DOUGAN, 1981) ou dégradés par les bactéries lactiques (DE MENEZES et coll., 1993 ; PORRES et coll., 1993). La disponibilité des protéines reste cependant affectée par la présence d'un fort taux d'azote lignifié. L'utilisation de la pulpe de café ensilée est acceptable dans une proportion de 20 % de la ration alimentaire des ruminants et des porcs (BRESSANI et coll., 1974 ; CABEZAS et coll., 1978 ; JARQUIN, 1978).

### **2.2.3.2 - Comme engrais organique**

Les teneurs élevées en azote, phosphore, potassium et en matière organique permettent l'utilisation de la pulpe comme engrais et conditionneur de sol. Les résultats de différents essais ont montré que la pulpe de café est un bon fertilisant organique, particulièrement pour les plantations de café. Cette alternative utilisée à une petite échelle sur les lieux mêmes de production présente néanmoins deux inconvénients majeurs : la teneur en eau de la pulpe fraîche et le coût de la main d'oeuvre (PEÑALOZA, 1981). Il semble qu'un compostage de la pulpe soit nécessaire pour éviter une fermentation exothermique des pulpes fraîches aux pieds des plants (GOMEZ, 1978a). Ce produit biodégradable (65 % environ de matière organique) n'entre pas en compétition avec les microorganismes du sol lors de son application. Son action est immédiate et peut durer trois ans (GOMEZ, 1978b).

Dans la majorité des fermes colombiennes, la pulpe est accumulée dans des fosses pendant 5 à 6 mois. Il s'y produit une dégradation biologique naturelle équivalente à un compostage. Cependant, la lenteur du processus et la quantité de pulpe à traiter impliquent de grands espaces, ce qui rend le procédé coûteux (ARCILA, 1979).

TAUK (1986) a réalisé des études sur le compostage de la pulpe fraîche ou pressée avec addition de microorganismes endogènes à 45 °C. L'engrais obtenu avec addition de microorganismes est de meilleure qualité que celui obtenu avec de la pulpe non traitée.

### **2.2.3.3 - Comme substrat pour la production de biogaz**

Des études sur la fermentation anaérobie avec production de méthane ont été réalisées avec de la pulpe de café depuis de nombreuses années (CALLE, 1957 ; HUTCHINSON, 1958 ; CALLE, 1974a). Ces travaux ont eu l'avantage de suggérer des solutions technologiques simples, adaptées à des installations de petite taille.

D'autres études menées par MORALES et CHACON (1981) et BLANES (1982) ont démontré que la fermentation méthanique s'effectue naturellement dès que la pulpe de café est mise à l'abri de l'air. Ce résultat suggère l'existence de germes méthanogènes dans le milieu ambiant. Les résultats obtenus donnent des taux de 65 à 70 % de méthane. La production de gaz par kg de matière sèche est de 240 litres avec un temps de rétention assez long (40 jours). Les auteurs recommandent cependant, de prétraiter la pulpe par aération ou ensilage, et de disposer d'un bon ferment au début de l'opération.

Il est possible que les substances toxiques comme les tanins, la caféine, l'acide chlorogénique ou l'acide caféique soient les causes d'un arrêt de la production de biogaz et de la diminution du pH (MORALES et CHACON, 1981).

### **2.2.3.4 - Comme substrat pour la production de microorganismes et d'enzymes**

La pulpe de café est un substrat riche en hydrates de carbone. CALLE (1954) l'a utilisée comme milieu de base pour la production de levures (*Torulopsis utilis*) et pour la culture

de microorganismes comme *Aspergillus oryzae*, *Bacillus megatherium* et *Saccharomyces cerevisiae* (CALLE, 1974b). La production de *Candida utilis* selon un procédé semi-continu est décrit par CALLE (1977). PEÑALOZA (1981) utilise la pulpe de café comme substrat pour des FMS avec *Aspergillus niger*, *Penicillium crustosum* et *Trichoderma harzianum*, et note une augmentation du taux protéique dans le produit fermenté.

Les matières pectiques totales représentent 5,2 à 6 % du poids de matière sèche de la pulpe et 33 % dans le mucilage de *C. arabica*, alors que les plus grandes sources de pectines industrielles (les agrumes) contiennent entre 1,5 et 3,5 % (CALLE, 1977). La pulpe et le mucilage seraient donc des sources pectiques intéressantes. La pulpe de café contient également des quantités non négligeables de celluloses et d'hémicellulose (Tableau 2.7). Elle présente donc un intérêt certain pour la production d'enzymes inductibles comme les pectinases et les cellulases (ROUSSOS, 1985 ; FAVELA et coll., 1989 ; BOCCAS et coll., 1994). Cependant, l'extraction d'enzymes pectiques des eaux et des jus résiduels du traitement du café ou de la pulpe donne une activité enzymatique qui reste inférieure à celle des préparations commerciales. D'où la nécessité de concentrer ces enzymes par saturation au sulfate d'ammonium (VERNET, 1987).

La UAM et l'ORSTOM ont développé une nouvelle technique qui fait appel à la culture sur milieu solide pour la production de biomasse et d'enzymes telles que les cellulases et les pectinases (CORZO et coll., 1986). Cette technique permet également l'utilisation de la pulpe de café comme substrat pour la culture de champignons filamenteux et la production de probiotiques (AQUIAHUATL et coll., 1988 ; FAVELA et coll., 1989 ; TAPIA et coll., 1989).

#### **2.2.3.5 - Comme substrat pour la production de champignons comestibles**

Des études sur la production de champignons comestibles (*Pleurotus ostreatus*) ont donné des résultats relativement satisfaisants. Un procédé semi-industriel avec une capacité à traiter une tonne de pulpe de café par jour, donne une production journalière approximative de 150 kg de champignons frais, soit une production mensuelle de 4,5 tonnes (GUZMAN et MARTINEZ-CARRERA, 1985 ; ROLZ et coll., 1988b ; MARTINEZ-CARRERA et coll., 1989). La pulpe résiduelle, après la culture du champignon, peut être utilisée comme aliment animal ou comme fertilisant (MARTINEZ-CARRERA et coll., 1989).

#### **2.2.3.6 - Comme substrat pour la lombriculture**

La culture de lombric (*Eisenia foetida*, Sav.) sur pulpe de café fraîche comme substrat alimentaire est une alternative d'utilisation de ce sous-produit déjà expérimentée en Colombie (DAVILA et ARANGO, 1991). Le lombric intervient dans le processus d'humification en présentant de nombreux avantages tels que la diminution du temps de décomposition de la pulpe, la diminution de son pouvoir contaminant, une mise en œuvre facile, l'obtention de produits finaux intéressants pour l'agriculture comme l'humus (de meilleure qualité que l'engrais classique obtenu directement de la pulpe, SALAZAR et MESTRE, 1991). Par ailleurs, les lombrics peuvent eux-même servir en alimentation animale (aquaculture, aviculture, etc...).

#### 2.2.4 - Des alternatives pour améliorer la qualité nutritionnelle de la pulpe de café

Diverses études ont été réalisées dans le but de diminuer, voire d'éliminer, les effets négatifs que causent certaines substances chimiques présentes dans la pulpe de café. Tous ces efforts avaient pour objectif d'obtenir un matériel détoxiqué pouvant être utilisé pour les animaux monogastriques et les ruminants.

GOMEZ-BRENES (1978) a effectué un traitement de la pulpe avec une solution d'hydroxyde de calcium à 1,2 et 3 %. Il a observé une diminution des tanins mais aucune évolution de la caféine, des acides chlorogénique et caféique. L'auteur conclut que le traitement alcalin n'améliore pas la valeur nutritive de la pulpe.

Des études réalisées par MURILLO et coll. (1977) sur de la pulpe de café déshydratée au soleil et traitée avec des solutions de 0,5 à 2 % de bisulfite de sodium, ont montré une diminution du contenu en fibres et en azote lignifié. Les auteurs concluent que cette alternative donne des résultats similaires au traitement à l'hydroxyde de calcium.

MOLINA et coll. (1974a) et CUEVAS (1976) ont testé un procédé de décaféination sur la toxicité et la valeur nutritive de la pulpe de café chez des rats. Le produit décaféiné a été obtenu par extraction de la caféine avec de l'eau à 25 °C et une percolation à 94 °C. Les auteurs informent que l'extraction de la caféine a été suffisante, tant sur la pulpe fraîche que sur la pulpe déshydratée pour obtenir un matériel qualifié de détoxiqué.

Selon MURILLO (1978), compte tenu du caractère saisonnier de la production de la pulpe de café, l'ensilage offre des perspectives intéressantes pour une utilisation ultérieure du substrat. Les silos en fosses permettent d'obtenir des produits appauvris en caféine et en tanins, car une partie de ces composés solubles sont évacués dans le liquide de drainage. Un autre intérêt de l'ensilage est qu'il offre la possibilité de stocker la pulpe pendant la période de traitement du grain, et de la sécher sur les aires de séchage lorsque celles-ci sont à nouveau disponibles.

VILLAGRAN (1981) a réalisé une étude utilisant la pulpe de café ensilée. Il a testé ce substrat comme milieu de culture pour des microorganismes comme les levures du genre *Saccharomyces sp.* Il a établi une corrélation significative entre la croissance des levures capables d'utiliser la caféine comme source d'azote et la diminution de cet alcaloïde dans les silos inoculés.

CALDERON (1981) a expérimenté un procédé de fermentation aérobie (compostage) et a démontré que ce procédé permet une augmentation réelle du taux de protéines disponibles dans la pulpe de café. L'auteur note que la teneur en protéines augmente avec le temps de fermentation. Ce procédé aérobie donne un meilleur rendement en protéines que le procédé d'ensilage et permet en outre une diminution significative de la concentration en caféine.

PEÑALOZA (1981) utilise un procédé de fermentation en milieu solide avec *Aspergillus niger*. Il obtient une augmentation des protéines vraies de 200 % et observe par ailleurs une diminution notable des fibres, de la cellulose, des hemicelluloses et des fibres acides détergentes. Bien que les taux en tanin et en caféine n'aient pas été affectés par la fermentation, le procédé permet d'améliorer de manière significative la qualité nutritionnelle du matériel testé sur des poulets.

AGUILAR (1983) et GUZMAN (1983) ont travaillé sur la fermentation solide de la pulpe de café avec *Aspergillus niger*, en faisant varier les niveaux de la source d'azote avec *Aspergillus niger* sans obtenir une disparition complète de la caféine.

Enfin, AQUIAHUATL et coll. (1988) ont isolé au Mexique 350 souches de champignons filamenteux de l'écosystème caféier (sol, feuilles, fruits). Parmi elles, huit souches ont présentées une forte capacité à dégrader la caféine en milieu liquide synthétique (2 *Penicillium* et 6 *Aspergillus*). Testées en fermentation en milieu solide sur de la pulpe de café, toutes ces souches sélectionnées dégradent la caféine, à condition qu'aucune source exogène d'azote ne soit ajoutée (ROUSSOS et coll., 1989). Ces souches produisent également d'importantes quantités de pectinases (BOCCAS et coll., 1994).

### 2.3 - Les Fermentations en Milieu Solide (FMS)

D'une manière générale, on définit le milieu solide, dans le domaine des fermentations, comme un matériel humide qui n'est pas liquide, ni en suspension dans l'eau et qui permet le développement de la microflore désirée en surface, mais aussi à l'intérieur de la matrice poreuse solide, et en l'absence d'écoulements libre de liquide (LONSANE et coll., 1985 ; ORIOL, 1987). La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat humide ou d'un support inerte capable d'absorber les nutriments qui se trouvent en solution. Les niveaux d'humidité relative vont de 12 à environ 80 %. L'humidité relative dépend du niveau maximal de rétention de l'eau dans le matériel utilisé comme substrat ou support (RAIMBAULT et coll., 1989).

Les Fermentations en Milieu Solide (FMS) ne sont pas d'origine récente. L'homme les utilise depuis longtemps, aussi bien pour la préparation d'aliments fermentés ou de fromages que pour le compostage ou l'ensilage (KNAPP et HOWELL, 1980 ; RAIMBAULT, 1980 ; MOO YOUNG et coll., 1983 ; HESSELTINE, 1987).

Ces technologies, peu mises en œuvre dans les pays occidentaux, connaissent depuis quelques années un regain d'intérêt. Ainsi, les FMS sont proposées comme une alternative aux technologies actuellement employées pour l'utilisation et la valorisation des produits agricoles primaires. Ces procédés sont liés à l'utilisation d'un matériel humide grâce à l'activité de champignons, de bactéries ou de levures.

### **2.3.1 - Les avantages et les inconvénients des FMS**

Plusieurs auteurs ont établi des comparaisons entre les fermentations en milieu solide et les fermentations en milieu liquide (RAIMBAULT, 1980 ; MOO YOUNG et coll., 1983 ; LONSANE et coll., 1985 ; MUDGETT, 1986 ; HESSELTINE, 1987). Parmi les avantages des FMS, on peut citer :

- \* Simplicité du milieu de culture ; parfois il suffit seulement d'ajouter de l'eau au substrat
- \* Volume du fermenteur plus petit à quantité égale de substrat
- \* Diminution des contaminations, résultant de la faible humidité du milieu de culture
- \* Pour les fermentations traditionnelles, la microflore du support sert d'inoculum
- \* Faible demande en énergie
- \* Aération facilitée par la porosité du matériel solide utilisé
- \* Conditions de culture proches de celles des milieux naturels
- \* Utilisation directe des produits fermentés
- \* Extraction facilitée par la concentration élevée des produits
- \* Réduction du coût opératoire lors de la récupération des métabolites
- \* Peu d'effluents liquides à traiter
- \* Peu de contrôle du processus
- \* Rendements élevés

Par ailleurs, les FMS présentent aussi quelques inconvénients :

- \* Problèmes de transfert de chaleur (risque d'une élévation excessive de la température) et de masse (problèmes de perte d'humidité pour des fermentations de longue durée)
- \* Rôle essentiel de l'humidité et de l'activité de l'eau
- \* Régulation difficile des paramètres de culture (pH, humidité, ....)
- \* Nécessité, dans de nombreux cas, d'un prétraitement du substrat ou du support
- \* Demande un inoculum important lorsqu'on n'utilise pas la microflore naturelle
- \* Possibilité de contamination par l'air ambiant au moment de l'inoculation
- \* Estimation de la biomasse difficile

### **2.3.2 - Les applications des FMS**

De nombreuses fermentations alimentaires et agricoles basées sur le principe des FMS sont pratiquées traditionnellement depuis longtemps dans le monde entier. La diversité des aliments et des boissons préparés en utilisant cette technique, dans les pays orientaux, africains et latino-américains n'est pas encore parfaitement connue. Quelques exemples donnés dans le tableau 2.12 montrent la diversité des applications des FMS. Nous détaillerons ici plus particulièrement l'enrichissement en protéines, la valorisation des déchets agricoles par ensilage ou compostage et la dégradation des composés toxiques.

#### **2.3.2.1 - L'enrichissement protéique**

Les techniques de FMS ont été utilisées par de nombreux auteurs, pour l'enrichissement en protéines de substrats à forte teneur en amidon, en cellulose ou en pectine tels que le blé, le

riz, le maïs ou le manioc (RAIMBAULT, 1980 ; SENEZ et coll., 1980 ; LAUKEVICS et coll., 1984 ; CZAJKOWSKA et ILNICKA-OLEJNICZAK, 1988), mais aussi sur des substrats lignocellulosiques tels que la luzerne (BAJRACHARYA et MUDGETT, 1979), la pulpe de betterave (GRAJEK, 1988 ; DURAND et CHEREAU, 1988), la pulpe de café (PEÑALOZA, 1981), les écorces d'agrumes (LEQUERICA et LAFUENTE, 1977 ; VACCARINO et coll., 1989).

**Tableau 2.12 : Quelques domaines d'applications des Fermentations en Milieu Solide**

Domaines d'application	Produits	Microorganismes	Références
Aliments fermentés	Fromages	<i>Penicillium</i> spp	LARROCHE et GROS, 1989
	Koji	<i>Aspergillus orizae</i>	RAIMBAULT, 1980
	Pozol	<i>Lactobacillus</i> spp et levures	SAUCEDO-CASTANEDA, 1987
	Cacao	Levures et <i>Acetobacter</i> spp	SANCHEZ, 1983
Aliments fermentés enrichis en protéines (AFEP)	Canne à sucre	<i>Aspergillus terreus</i>	GONZALEZ-BLANCO et coll., 1990
	Manioc	<i>Aspergillus niger</i>	RAIMBAULT, 1980
Production d'enzymes	Amylases	<i>Aspergillus</i>	ORIOLE et coll., 1988
	Protéases	<i>Aspergillus</i>	FUKUSHIMA, 1982
	Cellulases	<i>Trichoderma</i>	ROUSSOS, 1985
	Pectinases	<i>Aspergillus</i>	DUFOUR, 1990
Métabolites secondaires	Arômes	<i>Penicillium</i> <i>Ceratocystis</i>	REVAH et LEBEAULT, 1988 CHRISTEN et RAIMBAULT, 1991
	Pénicilline	<i>Penicillium</i>	BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1988
	Tétracycline	<i>Streptomyces</i>	YANG et LING, 1989
	Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i>	BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1990
	Alcaloïdes	<i>Claviceps</i>	TREJO-HERNANDEZ, 1992
Acides organiques	Acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>	HANG et WOODAMS, 1987
	Acide gallique	<i>Aspergillus niger</i>	RAIMBAULT, 1980
	Acide gibérellique	<i>Giberella fujikori</i>	KUMAR et LONSANE, 1987a, b
	Acide lactique	<i>Rhizopus</i>	SOCCOL, 1992
Production d'alcool	Ethanol	<i>Saccharomyces</i> spp	GIBBONS et WETSBY, 1988
	Ethanol	<i>Schwanniomyces</i>	SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991
Production de spores	Inoculum	<i>Penicillium</i> spp	LARROCHE et coll., 1986
	Lutte biologique	<i>Trichoderma</i>	ROUSSOS, 1985
Compostage	Compost	Flore mixte	AIDOO et coll., 1982
Ensilage	Ensilage	<i>Lactobacillus</i> spp	SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990a, c
Champignons supérieurs	Pleurotus	<i>Pleurotus</i> spp	ZADRAZIL, 1975
Filtres Biologiques	Eaux traitées	Flore mixte	AIDOO et coll., 1982
Valorisation des déchets	Aliments pour bétail	Flore mixte	RHODES et NORTON, 1975

Les travaux les plus importants sont sans conteste ceux de RAIMBAULT, qui a étudié et réalisé à l'échelle pilote la fermentation du manioc par une souche d'*Aspergillus niger*, à l'occasion d'une collaboration entre l'IRCHA et l'ORSTOM. Une étude bibliographique complète a été réalisée par cet auteur (RAIMBAULT, 1980) et complétée par ORIOL (1987). Du fait de la mauvaise digestibilité des protéines fongiques ou bactériennes par les animaux supérieurs, du faible taux protéique de certains microorganismes, mais surtout du fait de la conjoncture économique actuelle, les protéines microbiennes ne sont pas concurrentielles vis-à-vis des protéines de soja (ROUSSOS et coll., 1994b). Peu d'équipes travaillent encore sur ce sujet.

Aujourd'hui, la production d'aliments fermentés enrichis en protéines (AFEP) a laissé place à la biosynthèse de métabolites ou d'enzymes par les microorganismes cultivés en milieu solide sur support. Parmi les nombreux travaux réalisés dans ce domaine, on peut citer ceux de ROUSSOS (1985) sur la production de cellulases, de SOCCOL (1992) sur la production d'acide lactique ; de TREJO-HERNANDEZ (1992) sur la production d'alcaloïdes.

### **2.3.2.2 - Le compostage et l'ensilage : valorisation des déchets agricoles**

Le compostage est un autre exemple de FMS, au cours de laquelle se succèdent plusieurs populations de microorganismes. Les bactéries mésophiles consomment les sucres directement fermentescibles et provoquent un accroissement de la température atteignant 60 à 70 °C ; on observe une augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> accompagnée d'une baisse de la teneur en O<sub>2</sub> et d'une apparition d'ammoniaque dans le milieu. Puis les autres microorganismes (champignons thermophiles) dégradent les sucres les plus difficilement assimilables (lignocellulose) alors que la température continue d'augmenter jusqu'à 71-77 °C. Les bactéries pathogènes sont détruites et le compost stabilisé à cette température. Ces composts sont ensuite utilisés pour la fertilisation des sols, mais aussi comme substrats préférentiels de la culture des champignons de couche (MOO-YOUNG et coll., 1983).

L'ensilage est également une fermentation solide. Il se réalise à température ambiante dans des conditions anaérobies, en présence de bactéries lactiques qui produisent de l'acide lactique. L'acidification rapide du milieu stoppe le développement des microorganismes putréfiants et l'anaérobiose interdit la croissance des champignons (MOO-YOUNG et coll., 1983). En alimentation humaine, cette FMS est mise à profit lors de l'élaboration de la choucroute par exemple (UNTEREINER, 1989), du rouissage du manioc, étape de base pour la fabrication de nombreux aliments tropicaux (GIRAUD, 1993 ; BRAUMANN et coll., 1992). Pour l'alimentation animale, les techniques d'ensilage sont développées empiriquement depuis des siècles pour le stockage et la conservation des principales caractéristiques des produits. Ce volet sera plus particulièrement approfondi dans le chapitre 2.5.

### 2.3.2.3 - La dégradation de composés toxiques

L'objectif de nombreuses FMS alimentaires traditionnelles n'est pas d'augmenter la quantité de protéines *de novo* dans les aliments, mais d'améliorer les possibilités de conservation, de changer leurs propriétés physiques ou organoleptiques. D'autre part, ces fermentations permettent d'éliminer des facteurs antinutritionnels ou antiphysiologiques, en augmentant considérablement la digestibilité de certains produits végétaux comme dans le cas des graines de soja (HESSELTINE, 1977a et b). De même, la détoxification du manioc, au cours des transformations alimentaires, est due à l'action combinée de différents phénomènes enzymatiques, microbiologiques et physiques (GIRAUD, 1993).

Parmi les composés toxiques de la pulpe de café, la caféine prédomine pour sa toxicité vis-à-vis de l'alimentation animale (BRESSANI, 1978c). L'ORSTOM et la UAM d'Iztapalapa à Mexico ont initié une série de recherches visant à utiliser les FMS comme alternatives pour améliorer la qualité nutritionnelle de la pulpe de café, en utilisant des souches de champignons filamenteux sélectionnées non pour leur capacité à synthétiser des protéines, mais pour leur potentialité à dégrader des substances toxiques spécifiques (AQUIAHUATL et coll., 1988 ; ROUSSOS et coll., 1989). Les résultats de ces études seront détaillées au chapitre 2.4.

### 2.3.3 - Les principaux paramètres des FMS

La culture de microorganismes sur un milieu solide et humide implique la maîtrise d'un certains nombres de paramètres. Après avoir considéré les microorganismes et la nature des substrats, nous présenterons plus particulièrement la relation entre l'activité de l'eau et l'humidité, l'aération dans le cas des fermentations aérobies, le contrôle du pH et de la température. Enfin, nous étudierons les méthodes utilisées pour l'estimation de la biomasse.

#### 2.3.3.1 - Les microorganismes

Les microorganismes utilisés en FMS peuvent être divisés en deux groupes. Le premier concerne les microorganismes de la microflore naturelle (endogène) du substrat, le second, la culture pure ou mixte inoculée. Les procédés de compostage et d'ensilage utilisent généralement l'ensemencement naturel comme inoculum. Les cultures pures sont largement utilisées pour la production d'aliments fermentés comme par exemple *Aspergillus oryzae* pour la production industrielle de Koji (PANDEY, 1992).

Les champignons filamenteux sont les mieux adaptés à la culture en FMS aérobie car eux seuls sont capables de se développer en l'absence d'eau libre (KARANTH, 1991). De plus, ils présentent l'avantage d'envahir le support ou substrat, par croissance apicale et ramification du mycélium, permettant ainsi l'approvisionnement en nutriments au cours de la fermentation (RAIMBAULT, 1980). A l'inverse, les bactéries et les levures ne peuvent se développer qu'à la surface et à l'intérieur des cavités de la matrice solide (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

### 2.3.3.2 - Les substrats

Dans la nature, les champignons filamenteux se développent sur des matériaux solides : sur le bois, le papier, ou comme parasites des plantes dans les racines, les feuilles, les tiges ou les fleurs. Ils sont capables d'envahir la surface et de pénétrer dans les espaces inter-cellulaires et intra-cellulaires pour se procurer les nutriments nécessaires à leur développement. Pour comprendre la croissance d'un microorganisme sur matériau solide, il est indispensable de considérer la nature du substrat, le microorganisme et le mécanisme de dégradation généralement réalisé par un système enzymatique. Il est également indispensable de travailler avec une granulométrie du substrat bien déterminée, de manière à faciliter l'aération, principal facteur limitant en FMS aérobie.

### 2.3.3.3 - L'activité de l'eau et l'humidité

L'eau a plusieurs rôles : elle intervient dans la constitution des microorganismes, elle sert à véhiculer enzymes, nutriments et métabolites, et elle intervient dans la solubilisation de l'oxygène gazeux (ORIOLE, 1987). Une humidité élevée dans le substrat entraîne une diminution de la porosité de la matrice solide, une faible diffusion de l'oxygène, une réduction du volume accessible aux gaz, ainsi que des risques de contaminations bactériennes. Par contre, une faible humidité aboutit à une croissance limitée et diminue l'accessibilité du substrat (MISRA, 1991). Par ailleurs, des changements s'opèrent au cours de la fermentation. Ils sont dus à l'évaporation et à la libération d'eau issue du métabolisme des microorganismes (LONSANE et coll., 1985).

Selon DOELLE (1985), l'exigence en eau des microorganismes peut être exprimée quantitativement en se référant à l'activité de l'eau ( $a_w$ ). Le rapport sigmoïde (isothermes de sorption) entre la quantité d'eau (humidité) et l'activité de l'eau définit trois régions de disponibilité de l'eau pour les microorganismes : une première zone dans laquelle la disponibilité est quasi-nulle ( $0 \leq a_w \leq 0,2$ ), une seconde à disponibilité intermédiaire ( $0,2 \leq a_w \leq 0,6$ ) et une dernière zone où l'eau libre ( $0,6 \leq a_w \leq 0,99$ ) autorise la croissance (ORIOLE, 1987). C'est dans cette dernière région (humidité  $\geq 50\%$ ) que le développement microbien est possible en FMS. D'une manière générale, les exigences en eau libre des bactéries ( $0,85 \leq a_w \leq 0,99$ ) sont bien supérieures à celles des levures ( $0,75 \leq a_w \leq 0,9$ ) et des champignons ( $0,60 \leq a_w \leq 0,9$ ).

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'importance de l'eau pour le métabolisme des microorganismes en FMS (RAIMBAULT, 1980 ; GERVAIS et coll., 1988 ; ORIOLE et coll., 1988 ; GERVAIS et SARRETTE, 1990). Dans la plupart des cas, l'augmentation de l'humidité du substrat provoque une augmentation du taux spécifique de croissance ( $\mu$ ), de la biomasse et de la synthèse d'enzymes (NISHIO et coll., 1979 ; NARAHARA et coll., 1982 ; SATO et coll., 1983).

Prenant en compte le rôle de l'humidité, plusieurs auteurs ont conçu des procédés nouveaux qui permettent de bien contrôler l'eau au cours des FMS :

- fermenteurs agités (ARIMA, 1964 ; LINDENFELSER et CIEGLER, 1975 ; RAIMBAULT, 1980 ; DURAND et CHEREAU, 1988)
- fermenteurs statiques (RAIMBAULT, 1980 ; SATO et coll., 1983 ; NARAHARA et coll., 1984 ; ROUSSOS, 1985)
- systèmes de régulation de l'humidité (GERVAIS et BAZELIN, 1986 ; BARSTOW et coll., 1988 ; RYOO et coll., 1991).

#### 2.3.3.4 - L'aération et les échanges gazeux

Le contrôle de l'environnement gazeux au cours des FMS aérobies est un facteur important pour le développement des microorganismes. Celui-ci dépend de la vitesse du flux gazeux dans la masse du produit, de la vitesse de transport de l'oxygène dans le milieu et de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> par les microorganismes (RAIMBAULT, 1980).

L'aération permet d'assurer différentes fonctions :

- l'approvisionnement en oxygène pour la croissance aérobie et le métabolisme ;
- la régulation de l'humidité ;
- la régulation de la température ;
- l'élimination de métabolites (CO<sub>2</sub>, alcools, ...).

Dans la plupart des procédés, aussi bien au niveau expérimental qu'au stade industriel, l'aération des milieux de culture se fait par injection d'air comprimé stérile à travers les fermenteurs. Pour MOO YOUNG et coll. (1983), les transferts de gaz peuvent être effectués par différents mécanismes :

- le transfert inter-particule, qui concerne les échanges de masse par convection entre la phase gazeuse et l'interphase gaz-solide.
- le transfert intra-particulaire concerne la diffusion de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> entre l'interphase solide-gaz et l'intérieur de la matrice solide.

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'effet de la composition en CO<sub>2</sub> et en O<sub>2</sub> sur le métabolisme des microorganismes cultivés en FMS. Ainsi, lors de la production d'enzymes par *Aspergillus oryzae* sur riz, l'effet positif de la pression partielle d'oxygène sur le rendement en amylases a été mesuré (BAJRACHARYA et MUDGETT, 1980). De même, NARAHARA et coll. (1982) ont obtenu des rendements supérieurs en amylases et en protéines si la pression partielle en CO<sub>2</sub> est comprise entre 2 et 5 % au cours de la phase exponentielle de croissance, et en protéases, pour une pression partielle de 5 % durant la phase stationnaire.

Le problème de l'hétérogénéité des substrats est toujours présent en FMS. Il découle de la nature des produits utilisés (fibreux ou amylacés) et peut entraîner des gradients importants

dans la composition de l'air. RATHBUN et SHULER (1983), lors de la fabrication du Tempeh, ont enregistré des pressions partielles en O<sub>2</sub> proches de 2 % et des pressions partielles en CO<sub>2</sub> pouvant atteindre 21 % dans la partie inférieure du réacteur.

Il est évident que des systèmes permettant le pilotage de l'environnement gazeux sont nécessaires afin de contrôler le métabolisme des microorganismes. Un système d'analyse automatique des gaz a été mis au point, afin de suivre en temps réel l'évolution des activités respiratoires au cours d'une fermentation (SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1992).

### 2.3.3.5 - Le contrôle de la température

Le dégagement de la chaleur produite au cours des activités métaboliques des microorganismes, provoque une élévation importante de la température au sein des fermenteurs (HESSELTINE, 1987). L'hétérogénéité du matériel solide entraîne la formation de gradients de température. La faible activité de l'eau, l'absence d'agitation lors de l'utilisation de fermenteurs statiques ou d'aération en cas d'ensilage, la faible conductivité thermique des matériaux biologiques provoquent une augmentation de la température qui nuit au développement des microorganismes (RAIMBAULT, 1980 ; MOO YOUNG et coll., 1983 ; RATHBUN et SHULER, 1983 ; HUERTA-OCHOA, 1984 ; LONSANE et coll., 1985 ; BARSTOW et coll., 1988 ; GRAJEK, 1988 ; GONZALES-BLANCO et coll., 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990b ; ROUSSOS et coll., 1993b).

Plusieurs auteurs ont proposé diverses stratégies pour la régulation de la température. La plupart d'entre eux utilisent une convection forcée d'air à travers le fermenteur, d'autres les propriétés refroidissantes de l'évaporation de l'eau pour contrôler automatiquement l'humidité et la température (GERVAIS et BAZELIN, 1986 ; BARSTOW et coll., 1988 ; DURAND et CHEREAU, 1988 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990b ; RYOO et coll., 1991).

### 2.3.3.6 - Le contrôle du pH

En FMS, la mesure du pH en continu est relativement difficile (PREBOIS et coll., 1985 ; DURAND et coll., 1988). L'hétérogénéité et la faible teneur en eau du milieu de culture sont les principaux obstacles à une mesure satisfaisante du pH. Au niveau du laboratoire, on réalise une estimation globale du pH après une mise en suspension de l'échantillon solide dans un volume d'eau 5 à 10 fois supérieur (ORIOU, 1987). Toutefois, cette méthode ne permet pas de mesurer le pH à l'intérieur de la matrice au cours de la fermentation ; elle ne tient donc pas compte des gradients de pH ponctuels résultant des réactions biologiques.

Afin d'éviter de fortes variations de pH, RAIMBAULT (1980) a préconisé l'utilisation de sels minéraux qui confèrent au milieu de culture un pouvoir tampon. Ainsi, un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée, en proportions adéquates, a permis de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance d'*Aspergillus niger*. Cette technique a été, par la suite, utilisée par différents auteurs (HUERTA-OCHOA, 1984 ; ROUSSOS, 1985 ; ORIOU, 1987 ; DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; TREJO-HERNANDEZ, 1992).

### 2.3.3.7 - La détermination de la biomasse

L'estimation de la biomasse en milieu solide, par comparaison avec le milieu submergé, est très difficile. Les méthodes de dosage couramment utilisées en fermentation liquide ne peuvent généralement pas l'être en FMS, à cause de la nature du matériel et de la capacité des microorganismes à pénétrer dans les espaces intercellulaires et intracellulaires de la matrice solide. En raison de la difficulté à séparer le mycélium du matériel solide, il est indispensable de procéder à un échantillonnage et d'appliquer diverses méthodes indirectes de dosage de la biomasse.

Certains auteurs utilisent des méthodes biochimiques permettant l'analyse de certains composants de la biomasse :

- les protéines par la méthode de LOWRY et coll. (1951) ou par la méthode de Kjeldahl après précipitation des protéines dans l'acide trichloroacétique (ORIOLE, 1987).
- les acides aminés totaux (CHAPLIN, 1976 ; PEÑALOZA et coll., 1985) et les acides nucléiques (OGUR et ROSEN, 1950 ; SOLOMON et coll., 1983) après hydrolyse acide de l'échantillon.
- la chitine par la méthode de la glucosamine d'ELSON et MORGAN (1933). Cette technique a été utilisée par TREJO-HERNANDEZ (1992) et par ROCHE et coll. (1993). On peut aussi doser la chitine après une hydrolyse acide (SMITH, 1980)
- l'ATP (COCHET et coll., 1984 ; THIERRY et CHICHEPORTICHE, 1988)
- l'azote total par CHN (DUFOR, 1990)

D'autres auteurs utilisent des méthodes physiques telles que :

- l'évolution de la pression partielle à l'intérieur du fermenteur (AURIA et coll., 1990). Ce paramètre présente une corrélation avec la croissance du champignon et peut être rapportée de façon indirecte à la biomasse produite d'*Aspergillus niger* cultivé sur amberlite.
- la respirométrie (SUGAMA et OKAZAKI, 1979 ; RAIMBAULT, 1980 ; CARRIZALES et coll., 1981 ; SATO et coll., 1983 ; SATO et YOSHIZAWA, 1988 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991). La mesure des gaz (CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>) permet de suivre en continu l'évolution de l'activité microbienne. A partir des teneurs en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>, on peut prévoir l'évolution de la croissance. La chromatographie en phase gazeuse et des analyseurs spécifiques de CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> sont utilisés pour le dosage des effluents gazeux.
- le traitement d'image (PACKER et THOMAS, 1990).

Divers modèles établissant des relations entre les résultats obtenus par ces méthodes indirectes et une évaluation de la biomasse microbienne ont été proposés (RODRIGUEZ et coll., 1991 ; AURIA et coll., 1990 et 1992 ; SOCCOL et coll., 1993).

## **2.4 - La décaféination de la pulpe de café par fermentation solide**

Parmi les composés toxiques contenus dans la pulpe de café se trouve la caféine (1 % PMS). Des travaux, financés en partie par la CEE (STD-1, projet n°418-Fr ; 106-Mex) ont été réalisés pour dégrader ce composé spécifiquement en utilisant des champignons filamenteux cultivés en milieu solide. Dans ce chapitre, nous allons regrouper toutes les informations concernant ces microorganismes et la manière dont ils ont été sélectionnés.

### **2.4.1 - Les champignons filamenteux**

Les champignons sont définis comme des organismes eucaryotes, sporogènes et non chlorophylliens, se reproduisant par voie sexuée ou asexuée. Ils jouent un rôle important dans l'écologie terrestre par leur caractère ubiquitaire et leur diversité. Ils participent largement à la biodégradation des matières organiques, mais peuvent aussi présenter un caractère pathogène pour l'homme, les animaux et, dans une plus large mesure, pour les végétaux. Ils sont cependant à la base de nombreux procédés biotechnologiques allant de la production d'aliments fermentés tels que les fromages, à celle de molécules à haute valeur ajoutée comme les vitamines, les antibiotiques ou les enzymes (ALEXOPOULOS et MIMS, 1979 ; SMITH et BERRY, 1975).

Leur développement se fait par croissance apicale : élongation des filaments à partir de leur extrémités, dans toutes les directions et de façon identique. Ce mode de croissance se traduit par la formation de colonies circulaires caractéristiques sur un milieu de culture gélosé.

Les champignons filamenteux se reproduisent principalement par la voie asexuée, soit par fragmentation de cellules somatiques, soit par production de conidies. Les conidies sont des cellules immobiles produites par divisions mitotiques spécifiques intervenant au niveau des appareils reproducteurs : les conidiophores. Elles se caractérisent par une faible teneur en eau, une absence de mouvement cytoplasmique et une activité métabolique réduite. Néanmoins, elles ne constituent pas une forme de résistance comme dans le cas des spores bactériennes, bien que l'un des facteurs inducteur de la sporulation couramment avancé soit la limitation en nutriments du milieu environnant. Placées dans des conditions favorables, elles germent en formant un tube germinatif, base du futur mycélium.

Les conidies, comme les structures reproductrices, présentent des couleurs, des tailles, des formes et des arrangements différents suivant les espèces de champignons filamenteux. Ces critères sont à la base de la classification des champignons filamenteux (AINSWORTH et coll., 1973 ; ALEXOPOULOS et MIMS, 1979 ; DOMSCH et coll., 1980).

Les champignons filamenteux sont pour la plupart des microorganismes aérobies stricts, acido-tolérants et présentant une température optimale de croissance comprise entre 10 et 35 °C. Ils peuvent assimiler une large gamme de composés organiques carbonés et azotés

grâce à leurs nombreuses enzymes extracellulaires, souvent inductibles. Ils sont capables de synthétiser leurs propres vitamines mais sont hétérotrophes pour les oligo-éléments impliqués dans des groupements prosthétiques ou dans l'activation d'enzymes. Enfin, les champignons filamenteux se caractérisent par leur aptitude à se développer sur des milieux à faibles activités de l'eau (jusqu'à 0,65).

Le genre *Aspergillus*, comme le genre *Penicillium*, fait partie des moisissures les plus couramment étudiées dans le domaine alimentaire et en pharmacologie car ils peuvent tout aussi bien présenter un intérêt dans la fabrication d'un produit donné, qu'agir comme contaminants nuisibles voire toxiques. Les *Aspergillus* et les *Penicillium* appartiennent à la famille des Eurotiaceae (ALEXOPOULOS et MIMS, 1979) et sont taxonomiquement classés de la façon suivante :

Classe des ASCOMYCETES

Sous-Classe des PLECTOMYCETIDAE

Ordre des EUROTIALES

Famille des EUROTIACEAE

#### 2.4.1.1 - Le genre *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* est caractérisé par un mycélium septé, ramifié, incolore et brillant. Chez certaines espèces, il peut devenir partiellement coloré, voire marron. L'appareil de reproduction asexué se développe à partir d'une cellule différenciée à paroi plus épaisse : la cellule pied, base du conidiophore (Figure 2.14). Ce dernier, non ramifié, septé ou non, produit à son extrémité une vésicule sphérique à allongée pouvant porter une ou deux séries de sterigmata. Les sterigmata portent les phialides à partir desquelles sont libérées les conidies. Les conidies d'*Aspergillus* ont des tailles, des formes et des couleurs très variables. L'arrangement des chaînes linéaires de conidies, la forme de la vésicule ainsi que la disposition des sterigmata déterminent l'aspect général de la tête conidienne (ou tête aspergillaire) qui peut apparaître globulaire, radiée voire cylindrique (RAPER et FENNEL, 1965).

Les champignons du genre *Aspergillus* présentent des caractéristiques intéressantes tant au niveau des utilisations alimentaires que pour la production de métabolites, de biomasse ou d'enzymes. Ils sont donc très couramment utilisés dans l'industrie aussi bien en fermentation liquide que solide (BOTTON et coll., 1985).

#### 2.4.1.2 - Le genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* est caractérisé par un mycélium septé et ramifié. Ce dernier produit des conidiophores septés ou non, pouvant être deux à trois fois ramifiés de manière symétrique ou non (Figure 2.14). La base non ramifiée des conidiophores est encore appelée stipe. Leurs extrémités sont porteuses de plusieurs phialides, généralement ampouliformes ou

cylindriques, terminées par un étranglement (PITT, 1979). Comme chez les *Aspergillus*, les phialides sont les cellules reproductrices porteuses de conidies arrangées en chaînettes. Les conidies de *Penicillium* sont généralement lisses, rondes ou ovoïdes et presque toujours pigmentées en bleu ou en vert, pouvant virer au jaune (*Penicillium chrysogenum*).

Tout comme *Aspergillus*, le genre *Penicillium* est ubiquitaire et utilisé de longue date dans l'alimentation humaine. De plus, il est très étudié pour sa capacité à produire des métabolites, des antibiotiques, ainsi que des enzymes (BOTTON et coll., 1985).

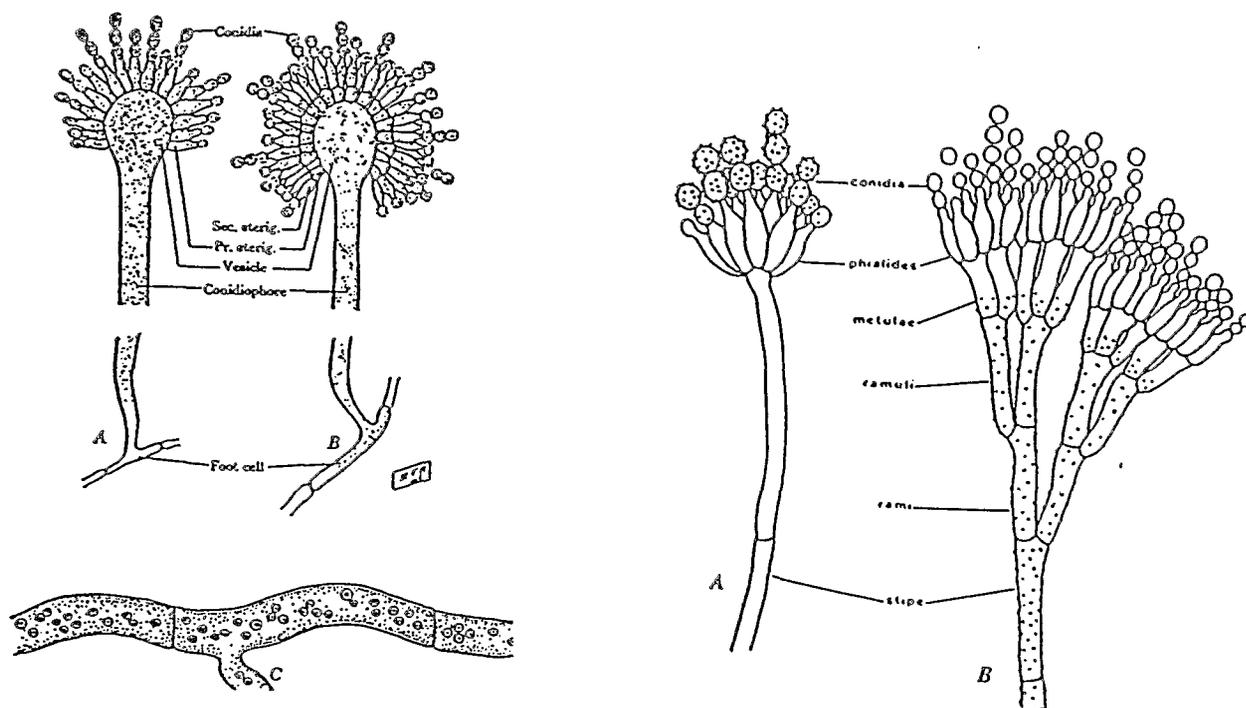


Figure 2.14 : Schémas des structures reproductrices (de la plus simple A à la plus complexe B) du genre *Aspergillus* (I) et du genre *Penicillium* (II).

#### 2.4.2 - La dégradation de la caféine par des champignons filamenteux

Les travaux de ROUSSOS (1985) présentent des champignons filamenteux capables de dégrader complètement des composés organiques. C'est le cas de composés lignocellulosiques qui sont dégradés par des microorganismes isolés du sol, du bois et des fruits. Ces microorganismes sont utilisés ultérieurement lors des FMS de la paille et du son de blé, des cossettes de betteraves et de la bagasse de canne à sucre.

KURTZMAN et SCHWIMMER (1971) ont isolé des souches de *Bacillus coagulans*, *Penicillium roqueforti* et des espèces de *Stemphyllium* qui présentent la capacité de dégrader la caféine. La caféine est utilisée comme unique source d'azote en présence de saccharose.

SCHWIMMER et KURTZMAN en 1972 utilisent *Penicillium crustosum* pour décaféiner des infusions de café contenant 0,45 à 0,60 g.l<sup>-1</sup> de caféine. AGUILAR (1983) et GUZMAN (1983) ont étudié la fermentation solide de la pulpe de café avec *Aspergillus niger* en faisant varier les niveaux de la source d'azote sans obtenir cependant une dégradation complète de la caféine de la pulpe.

Plus récemment, des recherches réalisées par l'ORSTOM et la UAM d'Iztapalapa à Mexico ont permis de sélectionner des souches de champignons filamenteux capables de dégrader la caféine (AQUIAHUATL et coll., 1988 ; ROUSSOS et coll., 1989). Le détail et les résultats de ces expériences sont présentés dans les paragraphes suivants.

#### 2.4.2.1 - L'isolement et l'identification des souches de champignons filamenteux

A partir d'un écosystème naturel mexicain, d'échantillons de terre, de feuilles de caféier et de branches décomposées, de cerises de café abîmées ou en voie de décomposition naturelle, colonisées par un mycélium de moisissures, 350 souches de champignons filamenteux ont été isolées sur des milieux où la caféine est la principale source d'azote (AQUIAHUATL et coll., 1988). Les genres principalement observés sont : *Penicillium*, *Aspergillus* mais aussi *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Trichoderma*

*Penicillium* est connu comme un genre dont certaines espèces peuvent métaboliser la caféine (KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971 ; SCHWIMMER et coll., 1971). Il en est de même pour les genres *Trichoderma* et *Aspergillus*. Quelques informations existent sur l'enrichissement protéique et la dégradation de la caféine de la pulpe de café par *Aspergillus* en FMS (PEÑALOZA, 1981 ; GUZMAN, 1983 ; AGUILAR, 1983 ; PEÑALOZA et coll., 1985 ; DE LEON, 1988). Ces genres sont particulièrement intéressants pour des opérations de détoxication.

#### 2.4.2.2 - La sélection des souches

L'objectif de cette sélection était d'obtenir les meilleurs microorganismes pour la détoxication de la pulpe de café en FMS. Un screening a été réalisé en milieu liquide, la caféine étant la seule source d'azote, le sucrose la source de carbone (AQUIAHUATL et coll., 1988), en considérant principalement l'aptitude à dégrader la caféine de chaque souche.

A partir de la collection précédente, huit souches de champignons filamenteux ont été présélectionnées pour leur haute capacité à dégrader la caféine (de 90 à 100 % en fermentation liquide) ; il s'agit de 2 *Penicillium* et de 6 *Aspergillus* (AQUIAHUATL et coll., 1988). Tous ces champignons ont été isolés initialement à 25 °C. Une étude physiologique a été réalisée sur ces huit souches de champignons (ROUSSOS et coll., 1989) en considérant cinq facteurs importants pour leur utilisation en FMS (Tableau 2.13) :

- le rendement de sporulation, car il est important de produire des ferments abondants ;
- la croissance apicale ; plus elle sera élevée, plus l'envahissement du substrat sera rapide ;

- le temps de germination ; plus celui-ci sera court, moins il existera de risques de contaminations ;
- le pH minimum de croissance ; facteur important dans le but de diminuer les contaminations possibles ;
- le taux de dégradation de la caféine ; il constitue le principal critère de sélection.

**Tableau 2.13 : Caractérisation physiologique des souches présélectionnées : rendement de sporulation ; croissance apicale ; temps de germination des souches ; pH initial des cultures ; % de dégradation de la caféine (ROUSSOS et coll., 1989).**

Résultats obtenus sur PDA d'une part et en fermentation liquide d'autre part.  
( - ) pas de croissance ; ( + ) croissance ; ( Nd ) non déterminé

SOUCHES	Rendement de Sporulation Spore.g <sup>-1</sup>	Croissance Apicale mm.h <sup>-1</sup>		Germination heures		pH initial			Dégradation Caféine % à 25 °C
		25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	2	3	4,8	
V33A25 <i>Penicillium sp</i>	9,3 10 <sup>9</sup>	0,14	0,10	11 : 30	12 : 30	-	+	+	90
V26A25 <i>Penicillium sp</i>	5,4 10 <sup>9</sup>	0,15	0,11	12 : 00	12 : 30	-	+	+	98
C23B25 <i>Aspergillus sp</i>	4,8 10 <sup>9</sup>	0,22	0,32	11 : 30	9 : 00	Nd	Nd	Nd	92
C11B25 <i>Aspergillus sp</i>	8,8 10 <sup>10</sup>	0,16	0,31	11 : 00	9 : 00	Nd	Nd	Nd	95
C28B25 <i>Aspergillus sp</i>	8,8 10 <sup>9</sup>	0,19	0,31	11 : 15	9 : 00	Nd	Nd	Nd	98
C16A25 <i>Aspergillus niger</i>	3,4 10 <sup>9</sup>	0,24	0,29	11 : 00	9 : 00	Nd	Nd	Nd	99
V12A25 <i>Aspergillus oryzae</i>	1,2 10 <sup>9</sup>	0,24	0,26	10 : 30	8 : 00	-	+	+	100
C17B25 <i>Aspergillus sp</i>	1,5 10 <sup>11</sup>	0,23	0,26	11 : 15	9 : 00	Nd	Nd	Nd	100

A partir de ces résultats et en prenant en considération les travaux effectués avec une souche de *Penicillium* pour la dégradation de la caféine (KURTZMAN et SCHWIMMER, 1971 ; SCHWIMMER et coll., 1971 ; SCHWIMMER et KURTZMAN, 1972), la souche de *Penicillium* V33A25 a été choisie pour des études visant à déterminer les conditions optimales de fermentation en milieu solide.

#### 2.4.2.3 - L'optimisation des conditions de culture de *Penicillium* V33A25 en FMS

La méthode de fermentation solide est basée sur le conditionnement de la pulpe de café, uniformément inoculée par une solution de spores de champignons filamenteux afin d'obtenir un milieu de culture solide à une humidité initiale de 72 %. Des fermenteurs de type colonne (RAIMBAULT et ALAZARD, 1980) ont été utilisés et différents facteurs de fermentation pouvant influencer la croissance ont été optimisés : la source d'azote, la température, l'humidité, l'aération, le pH et la taille de l'inoculum.

Des études antérieures utilisant *Aspergillus niger* pour l'enrichissement en protéines de la pulpe de café où le substrat était additionné d'azote minéral, ont donné des rendements satisfaisant en protéines mais sans obtenir une dégradation complète de la caféine (PEÑALOZA, 1981 ; AGUILAR, 1983 ; GUZMAN, 1983 ; PEÑALOZA et coll., 1985 ; DE LEON, 1988).

L'effet de l'addition d'azote minéral sur la croissance de *Penicillium* V33A25 et la dégradation de la caféine de la pulpe de café est présenté dans le tableau 2.14. Après 48 heures de fermentation, le champignon s'est développé abondamment surtout dans les milieux A, B, C, et moins bien dans les milieux D et E. Dans le milieu E, où aucune source d'azote minérale n'a été rajoutée, on observe une dégradation totale (100 %) de la caféine. La présence d'azote minéral dans les autres milieux de culture inhibe la dégradation de la caféine de la pulpe (ROUSSOS et coll., 1994a).

**Tableau 2.14 : Décaféination de la pulpe de café avec *Penicillium* V33A25 par fermentation solide : Effet de l'addition d'azote minéral (ROUSSOS et coll., 1994a)**

COMPOSITION			RESULTATS EN FIN DE CROISSANCE		
Milieu	Urée g.l <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> g.l <sup>-1</sup>	pH	Humidité %	Caféine %
A	3,50	7,50	7,8	73,4	100
B	1,75	3,75	8,1	78,0	100
C	0	3,75	5,3	76,6	100
D	1,75	0	8,5	74,7	100
E	0	0	8,2	75,6	0

Des cinétiques de dégradation de la caféine, de l'évolution du pH et de l'humidité pendant la fermentation solide dans des réacteurs de type colonne pour la souche *Penicillium* V33A25 sur pulpe de café ont été réalisées pendant 48 heures.

Une humidité minimale initiale de 70 % est nécessaire pour la croissance de *Penicillium* V33A25 sur pulpe de café alors qu'*Aspergillus niger*, sur des substrats amylicés, ne nécessite que 50 % d'humidité (RAIMBAULT, 1980). La pulpe de café contient 6 à 8 % de pectines ; il est possible que ces composés soient responsables de cette différence (PEÑALOZA et coll., 1985). Les spores germent après 11 heures d'incubation à 25 °C. L'inoculation homogène et abondante (2.10<sup>7</sup> spores.g<sup>-1</sup> PMS) permet d'obtenir une croissance rapide du mycélium et une colonisation complète de la surface du substrat. L'augmentation du pH après 35 heures de culture est corrélée à une diminution du taux de caféine. Après 45 heures de fermentation la caféine est complètement dégradée.

#### 2.4.2.4 - La décaféination de la pulpe de café au niveau pilote

Les résultats obtenus en laboratoire ont été confirmés au niveau pilote en utilisant un fermenteur vertical statique de type Zymotis (PREBOIS et coll., 1985 ; ROUSSOS et coll., 1993b) avec une échelle d'extrapolation de 1/1 000. Le travail a été réalisé sur des lots de 20 kg PMS de pulpe de café (ROUSSOS et coll., 1989).

Le microorganisme se développe rapidement sur le substrat. La dégradation de la caféine commence à partir de 20 heures, et après 48 heures de fermentation 73 % de la caféine de la pulpe est dégradée (Tableau 2.15).

**Tableau 2.15 : Décaféinisation de la pulpe de café avec *Penicillium V33A25* par fermentation solide au niveau pilote avec 20 kg de pulpe en Zymotis (ROUSSOS et coll., 1989)**

Temps (heures)	pH	Humidité %	% dégradation de la caféine
0	4,44	69,1	0
12	4,41	68,5	0
27	4,58	70,5	13
35	4,51	69,7	22
48	4,51	69,7	73

#### 2.4.3 - Les voies métaboliques de dégradation de la caféine

Afin d'étudier les voies métaboliques impliquées dans la dégradation de la caféine, une première étude sur *Penicillium V33A25* et *Aspergillus V12A25* a été réalisée par DENIS (1992). Cet auteur a montré que les deux champignons sont capables de dégrader la caféine contenue dans des milieux de culture synthétiques liquides en l'utilisant comme unique source d'azote. La vitesse de dégradation de la caféine ne varie pas en fonction du pH initial (compris en 4.0 et 7.0), ni de la teneur initiale en saccharose (entre 5 et 30 g.l<sup>-1</sup>). Par contre cette vitesse de dégradation double lorsque le taux d'inoculation passe de 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> conidies.ml<sup>-1</sup>.

L'analyse des surnageants par HPLC a permis de définir la théophylline comme premier et principal métabolite produit par *Penicillium V33A25* par déméthylation en position 7 de la caféine (Figure 2.14 ; page 43). Dans les cultures d'*Aspergillus niger V12A25*, la théophylline a également été identifiée comme le principal métabolite produit à partir de la caféine, mais d'autres intermédiaires ont également été détectés : la paraxanthine, la théobromine et la 3-méthylxanthine (cette dernière étant probablement issue d'une déméthylation de la théophylline en position 1). Ces travaux se poursuivent dans notre laboratoire afin de caractériser les différents systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation de la caféine.

## 2.5 - La conservation par ensilage

L'ensilage se définit comme la conservation du matériel humide (organique alimentaire) par une acidification anaérobie due à l'action de microorganismes (McCULLOUGH, 1977). Le but de l'ensilage est de minimiser les pertes en matière sèche et en valeur nutritive, mais aussi d'éviter le développement d'une population microbienne indésirable productrice de composés dont l'ingestion par l'animal aurait des conséquences néfastes sur sa santé. On attribue aussi à cette technique d'autres effets positifs, comme un meilleur équilibre des acides aminés (SHARPE, 1981).

L'ensilage fait partie des FMS. Cependant, il s'agit d'une fermentation anaérobie qui se réalise à température ambiante. Elle fait intervenir des bactéries lactiques, et plus particulièrement *Lactobacillus plantarum*, qui se développent en produisant de l'acide lactique. L'acidification rapide du milieu stoppe le développement des microorganismes putréfiants, et l'anaérobiose interdit la croissance des champignons aérobies (MOO-YOUNG et coll., 1983 ; McDONALD et coll., 1991).

Les techniques d'ensilage sont développées empiriquement depuis des siècles, pour le stockage et la conservation, dans un état voisin du frais, des produits agricoles d'origine animale ou végétale. Sur le terrain, il est possible de reconnaître les bons ensilages des mauvais grâce à leur aspect. Un bon ensilage doit conserver la couleur initiale du substrat avec une odeur fruitée et aigrelette un peu comparable à celle de la choucroute (DUTHIL, 1967). Une couleur brune, accompagnée d'une odeur de tabac ou de caramel, indique une aération excessive ; il s'agit souvent d'un ensilage non nocif mais ayant chauffé et perdu une partie de sa valeur alimentaire. Certains ensilages insuffisamment tassés prennent parfois une odeur prononcée de vinaigre : il s'agit alors d'un excès de fermentation acétique, qui peut parfois rendre le produit peu appétent voire toxique s'il est consommé en grande quantité. Il convient surtout de se méfier des ensilages de couleur vert foncé qui, au premier contact, semblent inodores : ce sont généralement des ensilages riches en acide butyrique. Il est rare de sentir nettement l'odeur de l'ammoniac, qui traduit aussi de mauvais ensilages. Sur le plan chimique, un « bon ensilage » doit donner lieu à un bulletin d'analyse indiquant (DUTHIL, 1967) :

- une teneur en matière sèche supérieure ou égale à 30 % ;
- une teneur en acide lactique supérieure à 3 % PMF ;
- un pH inférieur à 4,5 ;
- un rapport azote ammoniacal sur azote total inférieur à 10 % ;
- une teneur en acide acétique inférieure à 0,5 % PMF ;
- une teneur en acide butyrique inférieure à 0,3 % PMF.

Le véritable développement de la technique de l'ensilage date des vingt dernières années avec l'extension des cultures de maïs. La nécessité d'appliquer cette technique à d'autres produits agricoles (le prix du pétrole interdisant l'utilisation de techniques telles que la déshydratation artificielle), l'adjonction de conservateurs d'origine chimiques (acides, bactériostatiques) ou biologiques (bactéries lactiques, enzymes), ont conduit au développement de nombreuses recherches. Il existe une abondante littérature sur la conservation de produits humides par ensilage. Le tableau 2.16 donne quelques références d'auteurs qui ont étudié l'ensilage de différents substrats d'un point de vue microbiologique, technologique, énergétique ou nutritionnel.

**Tableau 2.16 : Liste d'auteurs ayant travaillé sur l'ensilage dans différents domaines**

DOMAINES	AUTEURS
Microbiologique	RUXTON et McDONALD, 1974 OHYAMA et coll., 1975a et b GRAZIA et SUZZI, 1984 MUCK, 1989 BOLSEN et coll., 1992 LIN et coll., 1992 a et b HERON et coll., 1993 NOUT et coll., 1993
Technologique	VANDERGETEN et VANSTALLEN, 1979 MEIERING, 1986 ASHBELL et WEINBERG, 1992 NEGI et coll., 1992a et b PORTER, 1992 SNYMAN et JOUBERT, 1992 BOLSEN et coll., 1993 SAVOIE et coll., 1993
Energétique	McDONALD et coll., 1973 SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990a et c
Nutritionnel	PATHAK et coll., 1974 CASTRILLON et coll., 1978 SHIMADA, 1981 MARTINSSON, 1992 DAVIES et HAIGH, 1993 JAKHMOLA et coll., 1993 KUNG et coll., 1993 MAYNE, 1993

Le processus d'ensilage peut être assimilé à un système à trois composants : substrat végétal - enzymes - bactéries, dans lequel chaque élément joue un rôle spécifique et primordial dans la réussite ou l'échec des ensilages (BERTIN et HELLINGS, 1985).

Le substrat végétal contient des sucres pariétaux (cellulose, hémicellulose, pectine) et des sucres de réserve (amidon et fructosanes principalement), dont la présence et la teneur dépendent de l'espèce végétale et des conditions culturales (Tableau 2.17).

Les enzymes végétales, parfois bactériennes et souvent fongiques, constituent un arsenal enzymatique polysaccharolytique pouvant dépolymériser la paroi végétale. Elles libèrent ainsi des glucides solubles dans la masse à ensiler. Ces glucides, de degré de polymérisation variable, pourront être métabolisés par les bactéries lactiques.

Les bactéries, qui se développent dans la masse du produit à ensiler, métabolisent les glucides solubles et produisent, dans le cas des bactéries lactiques, principalement de l'acide lactique, conservateur naturel de l'ensilage mais aussi des bactériocines telle que la nisine (BELIARD et coll., 1991).

**Tableau 2.17 : Teneur en glucides de réserve (% PMS) de différents végétaux**  
\* VANBELLE et coll., 1994 \*\* ZULUAGA, 1981

Glucides	Graminées *	Luzerne *	Pulpe de café **
Glucose	0,1 à 4,6 %	0,1 à 3,1 %	7,6 %
Fructose	0,1 à 2,4 %	0,1 à 3,6 %	15,2 %
Saccharose	1 à 12,2 %	0,01 à 6,9 %	1,8 %
Fructosanes	0,1 à 20,9 %	-	-
Amidon	-	0,2 à 11,2 %	-

Au cours de ce chapitre, nous présenterons les bactéries lactiques et nous ferons le point sur la microflore générale des ensilages. Nous nous intéresserons ensuite aux principaux facteurs influençant les ensilages et plus particulièrement l'anaérobiose, la teneur en MS, la teneur en sucres fermentescibles, le type de fermentation et les additifs chimiques ou biologiques. Enfin, un dernier paragraphe sera consacré à l'état des connaissances actuelles sur les ensilages de pulpe de café.

### 2.5.1 - Les bactéries lactiques

On considère généralement comme bactéries lactiques toute bactérie Gram-positif, anaérobie facultative, capable de produire de l'acide lactique D(-), L(+) ou DL, et intervenant dans une ou plusieurs applications technologiques dans les Industries Agro-Alimentaires. Cette dernière précision conduit à exclure de ce groupe des espèces bactériennes productrices d'acide lactique ayant des conséquences néfastes sur la qualité du produit tels que les Streptocoques fécaux ou les Staphylocoques (LEVEAU et BOUIX, 1980).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (DE ROISSART, 1986). A quelques exceptions près, leurs principales caractéristiques sont : Gram-positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles, ne possédant ni catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), ni nitrate-réductase, ni cytochrome oxydase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine,

ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent facilement la caséine (DELLAGLIO et coll., 1994).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant des glucides, produit soit exclusivement de l'acide lactique (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> (bactéries hétérolactiques strictes). Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique. Aucune souche du groupe lactique n'est capable de produire des acides volatils ayant plus de deux atomes de carbone.

Beaucoup de ces caractères sont typiques et servent à définir le cœur du groupe lactique que les recherches taxonomiques et phylogéniques sont en train de modifier de façon significative, soit au niveau des genres et des espèces, soit au niveau de la ligne de démarcation avec d'autres groupes de bactéries. Les connaissances actuelles permettent néanmoins d'affirmer que le groupe de bactéries lactiques *sensu stricto* est formé de bactéries en forme de bacille : *Lactobacillus* et *Carnobacterium*, et de bactéries en forme de coque : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* et *Atopobium*.

Les bactéries lactiques constituent un groupe de microorganismes particulièrement exigeants. En effet, outre la présence d'un sucre fermentescible, elles ont également besoin pour se développer de plusieurs acides aminés et de vitamines, propres à chaque espèce. La présence d'oligo-éléments permet d'activer la multiplication cellulaire des bactéries lactiques. Pour la croissance des lactobacilles, la leucine, la valine, l'acide glutamique, l'arginine, la tyrosine et le tryptophane sont cités comme étant indispensables ; le pantothénate et la niacine sont des vitamines nécessaires ainsi des quantités non négligeables de Mn<sup>2+</sup> et de Fe<sup>2+</sup> (LESDEMA et coll., 1977).

Les bactéries lactiques peuvent aussi exercer une activité inhibitrice sur le développement de microorganismes indésirables et pathogènes grâce à la production d'acides organiques (l'acide lactique en particulier), de peroxyde d'hydrogène ou d'inhibiteurs spécifiques telles que les bactériocines (BELIARD et THUAULT, 1989 ; BELIARD et coll., 1991).

### 2.5.2 - La microflore des ensilages

La réussite d'un ensilage dépend de la présence d'une microflore adéquate, d'une diminution rapide du pH et d'une production élevée en acide lactique pour conserver le matériel en bloquant l'activité des enzymes intracellulaires et en inhibant le développement de microorganismes endogènes indésirables (LESINS et SCHULZ, 1968 ; McDONALD et coll., 1991).

Les microorganismes qui jouent un rôle important dans la réussite d'un ensilage sont les bactéries lactiques. La caractérisation et l'isolement des bactéries dominantes au cours de la fermentation ont été étudiés par plusieurs auteurs (STIRLING et WHITTENBURY, 1963 ; WHITTENBURY, 1968 ; GOUET, 1979).

NILSON (1956) a découvert que les bactéries lactiques les plus importantes sont les streptocoques et les lactobacilles. *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus acidophilus* sont les bactéries dominantes de la microflore homofermentaire (GIBSON et coll., 1958 ; GRAZIA et SUZZI, 1984). *Lactobacillus brevis* est la souche dominante de la fermentation hétérofermentative (BECK, 1972 ; SZIGETI, 1979).

Les entérobactéries, les levures et les champignons représentent en général une part importante de la microflore initiale du matériel à ensiler (LINDGREN et coll., 1985 ; PAHLOW, 1991). Leur activité, si elle s'exprime au cours du processus d'ensilage, est néfaste. En se développant, ces microorganismes entrent en compétition avec les bactéries lactiques pour l'utilisation des sucres fermentescibles. D'autre part, les *Clostridium*, qui sont des bactéries anaérobies strictes, peuvent se multiplier rapidement dès que l'oxygène disparaît, provoquer la dégradation du matériel et produire des toxines (WOOLFORD, 1984). L'addition d'un ferment composé de bactéries lactiques homofermentaires au début de l'ensilage est une des solutions pour rendre ce groupe largement dominant, et inhiber l'action des autres microorganismes naturellement présents.

### 2.5.3 - Les facteurs intervenant dans le processus d'ensilage

Pour qu'un ensilage soit de bonne qualité, il faut que le végétal contienne assez de glucides fermentescibles, c'est-à-dire plus de 12 à 13 % de matière sèche et assez de bactéries lactiques pour fermenter les glucides c'est-à-dire  $10^5$  cellules par gramme de végétal frais (BERTIN et HELTINGS, 1985). Selon BERTIN (1986), la quantité de sucres exigée pour la réussite de l'ensilage dépend non seulement de la teneur du végétal en matière sèche et de son pouvoir tampon (teneur en protéines, en acide organiques et en cations), mais aussi des facteurs favorisant la libération rapide des sucres cellulaires (tendreté/souplesse du végétal, finesse du hachage, pression, température).

Un processus de fermentation réussi dans un silo d'ensilage se concrétise par une chute rapide du pH aux environs de 4,0, et une concentration élevée en acide lactique qui préserve l'aliment des fermentations butyriques putréfiantes (McDONALD et coll., 1991). Des ensilages ayant une faible teneur en MS ou en hydrates de carbones solubles dans l'eau, ou caractérisés par une population peu dense en bactéries lactiques, peuvent être le siège de fermentations non lactiques conduisant à des pertes de MS dues à la production de CO<sub>2</sub> et d'acides volatils. La perte de nutriments implique une diminution du matériel fermenté pouvant atteindre 50 % et des pertes d'énergie aux environs de 18 % (McCULLOUGH, 1977).

En résumé, cinq facteurs sont essentiels à la réalisation d'un ensilage (WHITTENBURY, 1961 ; McCULLOUGH, 1977 ; PITT et coll., 1985 ; BERTIN, 1986).

- Le respect de l'anaérobiose dans les silos
- La teneur en matière sèche
- La disponibilité en hydrate de carbone solubles
- La prédominance de bactéries lactiques homofermentaires
- Le pouvoir tampon du milieu

### 2.5.3.1 - L'anaérobiose

L'anaérobiose est un facteur primordial pour la réalisation et la réussite d'un ensilage. Si cette condition n'est pas rapidement imposée, on observe une oxydation des glucides qui ne seront plus disponibles pour les ferments lactiques, ainsi qu'une évolution de la microflore (RUXTON et McDONALD, 1974). L'élévation de température qui en résulte diminue la digestibilité des ensilages. Il faut noter que c'est à température moyenne (35 à 40 °C) que survient le plus facilement la fermentation butyrique. L'idéal est donc de se maintenir à des températures inférieures.

D'autre part, lorsque l'anaérobiose est imparfaite, on observe le développement de champignons filamenteux et plus particulièrement de *Penicillium roqueforti* (LACEY, 1971 ; NOUT et coll., 1993 ; RUXTON et GIBSON, 1993), mais aussi de microorganismes pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (PERRY et DONNELLY, 1990 ; FENLON et coll., 1989).

### 2.5.3.2 - La teneur en matière sèche (MS)

La teneur en matière sèche est aussi un des éléments déterminants des ensilages (McDONALD et coll., 1991). Les fourrages riches en MS stimulent les ferments lactiques, diminuent l'acidité volatile et les pertes de matière. La teneur optimale en MS du fourrage à ensiler se situe entre 30 et 40 %. De plus, les ensilages riches en MS semblent être plus intéressants sur un plan nutritionnel (NICHOLSON et coll., 1991 et 1992). Cependant, si la teneur en MS est trop importante (supérieure à 40 %), la quantité d'acides volatils devient trop forte et la qualité de l'ensilage peu intéressante (ROUSSOS et coll., 1992). D'après PITT et coll. (1985), plus la teneur en MS d'un ensilage est élevée, plus lentes seront la chute de pH, l'apparition d'acides lactique et butyrique et la disparition des sucres solubles.

### 2.5.3.3 - La teneur en sucres fermentescibles

La richesse en sucres fermentescibles influe directement sur l'évolution des ferments lactiques (PETTERSSON et LINDGREN, 1990). Une concentration de 12 % MS environ de glucides est nécessaire pour stabiliser un ensilage. C'est pourquoi les fourrages jeunes et trop pauvres en glucides se conservent mal (HAIGH, 1990). Lorsque le taux

d'hydrates de carbone solubles est trop faible, l'apport de sucres ou de mélasse favorise le procédé de fermentation (CHAMBERLAIN, 1988 ; O'KIELY, 1992). Cependant, si la quantité de sucres est trop élevée comme dans le cas de la canne à sucre, la fermentation peut alors être dominée par les levures (OHYAMA et HARA, 1975) et aboutir à la production d'éthanol. La nature des glucides a aussi son importance : glucose, fructose, saccharose, maltose se décomposent plus facilement en acide lactique que l'amidon. De part leur composition et leur quantité en sucres, le ray-grass et le maïs réussissent infiniment mieux en ensilage que la luzerne ou le trèfle.

#### 2.5.3.4 - La nature de la fermentation lactique

Plusieurs types de fermentations peuvent mener à un ensilage : lactique, acétique, propionique, butyrique (DOELLE, 1975 ; McCULLOUGH, 1977). La fermentation lactique est de loin la plus appréciée, à cause des qualités organoleptiques qu'elle confère aux produits. Elle est très largement utilisée dans les pays d'Orient et dans les pays en voie de développement car elle peut être réalisée avec des moyens rudimentaires.

Pour obtenir une chute rapide du pH et une production majoritaire d'acide lactique, il est souhaitable de suivre une fermentation de type homofermentaire, la fermentation homolactique par la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) produisant 1,8 mole d'acide lactique par mole de glucose consommé.

Il existe une autre voie fermentaire, la fermentation hétérolactique par la voie des hexoses monophosphate (HMP), qui produit une quantité inférieure d'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>, avec comme conséquence une perte de nutriments et d'énergie (DOELLE, 1975), ainsi qu'une libération de chaleur dans le milieu.

D'autres schémas métaboliques peuvent se présenter, en relation avec la dégradation des protéines ainsi que des réactions couplées d'oxydo-réduction liées à la désamination des acides aminés donnant lieu à la libération de CO<sub>2</sub> et de NH<sub>3</sub>. La dégradation des protéines provoque l'augmentation du pouvoir tampon du milieu et implique une concentration en hydrates de carbone plus élevée pour amener le pH à 4.0.

Si le pH est inférieur à 4.0, il a été démontré que les microorganismes ne désaminent pas les acides aminés, et de plus, l'action des *Clostridium* est inhibée (McCULLOUGH, 1977).

Toutes ces considérations permettent de comprendre qu'il est préférable d'orienter le procédé d'ensilage vers la voie homofermentaire.

## 2.5.4 - Les additifs chimiques ou biologiques

Lorsque les ensilages sont réalisés sans utilisation d'additifs biologiques ou chimiques, la population microbienne est souvent dominée par les bactéries lactiques hétérofermentaires (LANGSTON et coll., 1962). Pour orienter l'ensilage vers la voie homofermentaire et assurer sa stabilité, plusieurs techniques sont donc utilisées. Parmi elles, l'apport d'additifs à base d'acides tels que l'acide formique (organique) ou l'acide sulfurique (inorganique) ; ou également à base d'urée, d'ammoniac et d'enzymes. Une bibliographie importante existe sur ce sujet (WOOLFORD, 1984 ; JAKHMOLA et coll., 1990 ; MAYNE et STEEN, 1990 ; McDONALD et coll., 1991 ; SPOELSTRA, 1991 ; LI et coll., 1992 ; ASHBELL et WEINBERG, 1993 ; SELMER-OLSEN, 1993).

### 2.5.4.1 - Les additifs enzymatiques

Divers « cocktails » contenant des enzymes telles que cellulases, hemicellulases, amylases, pectinases et/ou glucose oxydases sont utilisés afin d'augmenter le taux de sucres simples lorsque celui-ci est insuffisant pour la réalisation d'un bon ensilage (HENDERSON et McDONALD, 1977 ; BERTIN, 1986 ; JACOBS et McALLAN, 1991).

L'action bénéfique des enzymes polysaccharolytiques a été démontré par les bons résultats de conservation de végétaux pauvres en sucres assimilables : augmentation de la teneur en acide lactique, et diminution du pH, de l'ammoniac et de l'acide butyrique (Tableau 2.18) (ARNOULD et coll., 1981 ; VAN VUUREN et coll., 1989).

**Tableau 2.18 : Influence du traitement enzymatique sur les paramètres de conservation (ARNOULD et coll., 1981)**

Ensilage d'herbes à 20,12 % PMS	Silo sans enzyme polysaccharolytique	Silo avec enzyme polysaccharolytique
pH	5,17	4,18
% N NH <sub>3</sub> / N total	33,84	19,10
Acide lactique % PMF	0,44	2,20
Acide butyrique % pMF	1,41	0,20

Les préparations enzymatiques sont des extraits multienzymatiques bruts de cultures bactériennes ou fongiques (VANBELLE et coll., 1994). Leur principe d'action est de dégrader les constituants de la paroi cellulaire du végétal par de multiples attaques des polysaccharides par plusieurs enzymes agissant en synergie. La dégradation des constituants pariétaux des cellules végétales peut avoir deux effets successifs : l'un conservateur, qui se traduit par une amélioration de la fermentation du fourrage par les bactéries lactiques, l'autre valorisateur qui se traduit par une meilleure digestion du fourrage par les animaux.

#### 2.5.4.2 - Les ferments lactiques

L'utilisation de ferments lactiques était peu reconnue avant les années 70 (SHARPE, 1981). Il semble que les additifs biologiques utilisant des cultures de *Lactobacillus* et plus particulièrement de *Lactobacillus plantarum* éviteraient les inconvénients associés à l'utilisation des additifs chimiques (corrosion des silos en particulier) et permettraient une diminution rapide du pH et une orientation plus favorable de la fermentation (LINDGREN et coll., 1983 ; SEALE, 1986). Plusieurs études consacrées à ce problème (OHYAMA et coll., 1975b ; MOON, 1981 ; ELY et coll., 1982 ; WOOLFORD et SAWCZYC, 1984 ; WEINBERG et coll., 1987) n'ont pas mis en évidence d'effet réellement positif sur la fermentation d'une inoculation par des *Lactobacillus*. Par contre, d'autres auteurs ont démontré que l'addition de *Lactobacillus* provoque une diminution plus importante du pH, une augmentation de la production d'acide lactique et une diminution des acides gras volatils, donnant ainsi des produits finaux présentant une meilleure appétence pour les animaux (CARPINTERO et coll., 1979 ; FLORES et coll., 1985 ; ROOKE et coll., 1985 ; LINDGREN et coll., 1988 ; WEINBERG et coll., 1988 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990a ; MEESKE et coll., 1993 ; SELMER-OLSEN, 1993).

Aujourd'hui, il semble qu'il ne fait plus de doute que les conservateurs biologiques peuvent améliorer la qualité des fourrages ensilés, mais leur efficacité dépend du choix des souches et de leur taux d'inoculation ainsi que de la nature du substrat ensilé (composition chimique, teneur en MS) (GOUET, 1994).

#### 2.5.4.3 - Les additifs enzymes - bactéries lactiques

L'ajout d'une solution d'enzymes au ferment donne des résultats différents suivant la nature des substrats et les conditions environnementales (PAHLOW, 1991). Aucune influence de ce type d'additif sur la composition d'un ensilage d'herbes n'a été observé par ROOKE et coll. (1985). SETÄLÄ (1989) démontre qu'il existe une meilleure utilisation des sucres produits par les enzymes lorsque la solution d'enzymes est associée à un inoculum de bactéries lactiques. Certains auteurs notent une instabilité au désilage lorsque l'on utilise des additifs biologiques (bactéries plus enzymes) (KUNG et coll., 1987 ; RUST et coll., 1989 ; KENNEDY, 1990 ; WEINBERG et coll., 1993). Ces résultats sont en opposition avec ceux d'OHYAMA et coll. (1975b) et de PAHLOW (1982) qui démontrent un effet favorable de l'inoculation sur le désilage. De nombreuses études existent, montrant que l'association bactéries lactique-enzyme permet d'obtenir des ensilages plus stables au moment du désilage (HRISTOV, 1993 ; SELMER-OLSEN et coll., 1993 ; SMITH et coll., 1993).

L'ensemble de la littérature sur les effets des additifs peut sembler très contradictoire, mais il faut rappeler que les résultats observés dépendent de la nature du substrat traité, de sa composition chimique et de sa teneur en MS ainsi que du type d'additif employé, de sa concentration et de sa composition.

### 2.5.5 - L'intérêt des additifs en nutrition animale

Plusieurs auteurs ont démontré la possibilité d'utiliser les complexes polysaccharolytiques pour augmenter la digestibilité de la matière organique des végétaux grâce à la durée de vie de certaines activités enzymatiques (TILLEY et TERRY, 1963 ; VANBELLE et BERTIN, 1989). VANBELLE et coll., 1994 ont démontré que la digestibilité de la matière organique du ray-grass et de la luzerne peut être augmentée en ajoutant à une cellulase de *Trichoderma viride* une activité hémicellulase d'*Aspergillus niger*. Il y a donc une interaction possible entre enzymes. Ce n'est pas la quantité mais la spécificité et la qualité des enzymes qui sont importantes.

Les effets de l'addition d'enzymes, en combinaison ou non avec des bactéries lactiques, sur les performances animales, sont variables et peu de données sont disponibles (VANBELLE et coll., 1994).

### 2.5.6 - La conservation de la pulpe de café par ensilage

La littérature est très abondante sur les ensilages réalisés en milieux tempérés et plus particulièrement sur les fourrages. Cependant, diverses études ont été menées sur d'autres substrats, comme les résidus d'artichauts (MEGIAS et coll., 1993b), les épiluchures d'oranges (ASHBELL et coll., 1987 ; MEGIAS et coll., 1992 et 1993a), le manioc (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1987), le sorgho (DICKERSON, 1986 ; MEESKE et coll., 1993), les résidus de canne à sucre (CELANIE, 1982 ; ROUSSOS, 1985) et la pulpe de café (MURILLO, 1978). Cependant, ces travaux restent principalement axés sur la faisabilité de l'ensilage.

La production saisonnière, la composition chimique et l'humidité élevée de la pulpe de café posent de sérieux problèmes de disponibilité et de conservation de ce sous-produit. La conservation de la pulpe de café par ensilage a déjà été utilisée par MURILLO (1978). Cet auteur a étudié l'effet de différents additifs sur la conservation et la qualité nutritionnelle pour les ruminants des produits obtenus.

L'ensilage de la pulpe de café a été peu étudié du point de vue microbiologique et biochimique. On rencontre cependant quelques travaux qui s'intéressent, soit à la technique de mise en œuvre des silos, soit à l'évolution chimique et aux effets nutritionnels : BOHKENFOR et FONSECA, 1974 ; BRAHAM et coll., 1973 ; MURILLO et coll., 1976 ; CALLE, 1977 ; CARRIZALES et FERRER, 1984 ; BUTRAGO, 1987 ; GAIME-PERRAUD et coll., 1993 ; PORRES et coll., 1993.

De l'ensemble de ces travaux découlent les trois points suivants :

- la nécessité d'imposer une anaérobiose stricte dans la masse du silo ;
- le taux d'hydrates de carbone solubles initial doit être compris entre 13 et 16 % PMS ;
- la teneur en MS du matériel à ensiler doit être comprise entre 30 et 40 %.

Pour obtenir ces conditions d'ensilage, différentes techniques peuvent être utilisées, comme le pressage, le séchage ou l'utilisation d'additifs (fourrages, mélasses, conservateurs).

#### 2.5.6.1 - Les silos et la nature du substrat

Les ensilages de pulpe de café ont été généralement réalisés sur de grandes quantités (plusieurs tonnes de matériel). La pulpe est ensilée dans des silos souterrains, en tranchée ou en fosse. Dans les deux cas, on procède de la même manière c'est-à-dire que l'on remplit graduellement le silo par couches en tassant la pulpe afin d'assurer une compaction optimale et d'éliminer au maximum la quantité d'air (GONZALEZ, 1973).

BOHKENFOR et FONSECA (1974) ont comparé trois types de substrats pour l'ensilage de pulpe de café : pulpe fraîche, pulpe pressée, pulpe déshydratée. Ils sont arrivés à la conclusion que le meilleur ensilage était celui réalisé sur de la pulpe fraîche, car c'est le substrat qui contient le plus fort taux de sucres fermentescibles. La pulpe déshydratée est la moins intéressante. Ces résultats ont été confirmés par RODRIGUEZ et coll. (1974).

#### 2.5.6.2 - L'évolution chimique de la pulpe de café au cours de l'ensilage

L'effet de l'ensilage sur la composition chimique de la pulpe de café a été étudié par plusieurs auteurs (MURILLO, 1978 ; CARRIZALES et GONZALEZ, 1984). Le tableau 2.19 donne les résultats de l'évolution d'un ensilage de 5 kg de pulpe de café réalisé dans des sacs en plastique pendant 99 jours.

**Tableau 2.19 : Evolution de la composition chimique de la pulpe de café au cours d'un ensilage sans additif.**  
(CARRIZALES et GONZALEZ, 1984)

		Pulpe fraîche	Pulpe ensilée
pH		4,30	3,60
Protéines (N x 6,25)	% PMS	11,57	13,55
Fibres	% PMS	15,24	17,16
Lipides	% PMS	5,00	2,17
Cendres	% PMS	6,67	8,08
Hydrates de carbone	% PMS	61,21	58,50
Caféine	% PMS	0,95	0,83

Les protéines, les fibres et les cendres augmentent au cours de l'ensilage. L'augmentation du taux de protéine est certainement due à la croissance microbienne à partir des sucres et de l'azote minéral contenu dans la pulpe. MURILLO (1978) avait déjà observé cette augmentation du taux en protéines.

Afin d'améliorer la qualité des ensilages de pulpe de café, il est possible d'y ajouter divers types de fourrages comme les fourrages de pâturages, de maïs ou de sorgho suivant leur disponibilité et leur coût (DAQUI, 1975). MURILLO et coll. (1976) ont identifié et quantifié les changements physiques et chimiques survenant au cours de l'ensilage de la pulpe de café supplémentée en fourrages. Ces ensilages ont été réalisés dans des silos de laboratoire (Tableau 2.20).

**Tableau 2.20 : Caractéristiques physiques et chimiques de trois lots de pulpe de café. La pulpe de café est ensilée seule ou mélangée à des fourrages. Expériences réalisées en silos de laboratoire (MURILLO et coll., 1976)**

Paramètres	Pulpe de café seule	Pulpe de café + herbes	Pulpe de café + maïs
Temps d'ensilage, jours	141	140	132
Perte de poids (kg)	1,1	4,3	4,3
% liquides de drainage	4,8	18,9	23,2
pH	4,3	4,1	3,8
Matière sèche	33,2	30,1	20,1
<b>Composition en % PMS</b>			
Protéines (N x 6,25)	13,8	9,4	8,1
Lipides	2,2	2,1	2,6
Fibres	20,0	34,0	26,1
Cendres	10,9	9,8	9,9
Hydrates de carbone	43,1	44,7	53,3
Caféine	0,6	0,3	0,4
Tanins	2,4	1,5	1,2
Parois cellulaires	61,2	63,2	55,2
Hemicellulose	0,4	8,0	7,0
Lignine	29,5	22,5	15,7
Cellulose	30,0	30,0	24,9

Les pertes en matière sèche et en liquide de drainage sont peu importantes lorsque la pulpe de café est ensilée sans addition de fourrage. Le pH, l'apparence et la couleur des trois ensilages correspondent à des fermentations anaérobies correctes. Les teneurs en caféine peu importantes dans les ensilages additionnés de fourrages sont certainement dues à l'action diluante des fourrages sur la pulpe de café. La caféine soluble dans l'eau est certainement partiellement évacuée par les liquides de drainages ; de même pour les tanins solubles. Ceci a été confirmé par les études de CARRIZALES et FERRER (1984).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par DAQUI (1975) sur des ensilages réalisés avec de la pulpe de café et des fourrages de maïs dans des proportions 60:40 dans des silos en tranchées.

Le métabisulfite de sodium a été employé également comme additif à l'ensilage de la pulpe de café. En produisant de l'anhydride sulfurique, il empêche le développement de microorganismes indésirables. Cet additif a été employé à concurrence de 0,3 %. Les études de JARQUIN et BRESSANI (1977) ont montré qu'un ensilage de pulpe de café réalisé avec

du métabisulfite de sodium voit son taux de tanins libres augmenter de 2 à 3,1 % PMS en rompant le complexe tanins-protéine (MURILLO et coll., 1977).

Enfin, BOHKENFOR et FONSECA (1974) ont montré que l'addition simultanée de 2 % de CaCO<sub>3</sub> et de 1 % de CaHPO<sub>4</sub> à la pulpe de café, n'améliorait pas la qualité de l'ensilage.

Pour stimuler la fermentation, divers auteurs ont préconisé l'adjonction de mélasse de canne à sucre à la pulpe de café. Le taux élevé de sucres solubles a permis un développement rapide des bactéries, ainsi qu'une augmentation de la valeur nutritive de l'ensilage (digestibilité et acceptabilité). Les quantités de mélasse qui ont été employées varient entre 3 et 5 % du poids frais de matériel ensilé (GONZALEZ, 1973). Le tableau 2.21 présente la composition chimique d'ensilages de pulpe de café réalisés dans des silos de laboratoire sans additif (a), avec 10 % de mélasse (b), une solution à 10 % d'acides chlorydrique et sulfurique (c) et enfin un mélange d'acide et de mélasse (d) (MOLINA et coll., 1974b ; MURILLO, 1974).

**Tableau 2.21 : Caractéristiques physiques et chimiques de quatre lots de pulpe de café ensilés pendant 90 jours.**  
 (a) pulpe de café sans additifs (b) mélangée à de la mélasse  
 (c) à des acides (d) à un mélange acide/mélasse  
 MOLINA et coll., 1974b ; MURILLO, 1974

Principales caractéristiques	Pulpe de café seule (a)	Pulpe de café + mélasse (b)	Pulpe de café + acides (c)	Pulpe de café + mélasse + acides (d)
<b>pH</b>	4,3	4,1	3,7	3,8
<b>Poids total</b>				
Initial (kg)	22,0	22,0	22,0	22,0
Final (kg)	18,5	17,4	16,1	17,6
% de perte	15,9	20,9	26,8	20,0
<b>Composition en % MS</b>				
Contenu cellulaire	55,9	66,0	58,5	67,5
Parois cellulaires	41,1	24,0	41,5	32,5
Hemicelluloses	3,0	2,7	2,8	2,9
Celluloses	19,4	15,2	19,7	14,2
Lignine	20,5	14,6	17,7	14,0
Protéines (N x 6,25)	10,6	9,0	10,8	9,2
Protéines lignifiées	4,1	3,0	3,5	2,9
Cafeine	0,7	0,5	0,5	0,5
Tanins	1,6	1,6	1,6	1,5
<b>Composition du jus de drainage</b>				
Sucres solubles (g.l <sup>-1</sup> )	22,0	21,4	15,1	19,3
Cafeine (g.l <sup>-1</sup> )	2,2	2,7	3,4	3,2
Tanins (g.l <sup>-1</sup> )	3,7	3,7	3,1	4,0

Les pertes en matière sèche sont importantes au cours de ces ensilages et plus particulièrement lorsqu'il y a apport d'acides (26,8 %). Les teneurs en caféine diminuent légèrement en présence d'additifs mais pas de manière significative ; la concentration en tanins n'évolue pas. L'addition d'acides permet d'obtenir des pH inférieurs à 4.

FERRER (1984) a réalisé des ensilages de pulpe de café additionnés de 3 % de mélasse. Ces ensilages ont été conduits pendant 2 à 4 mois dans des fermenteurs anaérobies de 200 litres. L'auteur a suivi l'évolution des acides organiques. Le tableau 2.22 montre une production importante d'acides acétique, lactique et butyrique lorsque la pulpe de café est ensilée sans additif pendant deux mois. Il a aussi été détecté de l'acide propionique et de l'acide valérique. Lorsque l'ensilage est additionné de mélasse, on retrouve ces mêmes acides en concentration plus importantes. L'acide acétique est toujours majoritaire et démontre la dominance de bactéries hétérofermentaire. L'addition de mélasses permet une diminution plus rapide du pH mais n'empêche pas le développement de microorganismes indésirables producteurs d'acide butyrique. L'auteur conclut en indiquant que l'addition de mélasse n'est pas un facteur indispensable à la réussite d'un ensilage de pulpe de café, mais que le principal problème réside dans l'établissement de réelles conditions d'anaérobiose.

**Tableau 2.22 : Production d'acide lactique et d'acides organiques (% PMS) au cours d'ensilages de pulpe de café.**

(a) Pulpe fraîche (b) Ensilage de deux mois sans additif (c) Ensilage de deux mois avec 3 % de mélasse (d) Ensilage de quatre mois avec 3 % de mélasse (FERRER, 1984)

Acides organiques	Pulpe fraîche (a)	Ensilage 2 mois (b)	Ensilage 2 mois avec 3 % mélasse (c)	Ensilage 4 mois avec 3 % mélasse (d)
Acide acétique	0,54	2,20	4,33	3,31
Acide propionique	ND	0,58	0,96	0,49
Acide isobutyrique	ND	ND	0,05	ND
Acide n-butyrique	0,04	0,79	1,52	0,41
Acide i-valérique	ND	ND	0,34	ND
Acide n-valérique	ND	0,06	0,12	ND
Acide lactique	0,29	1,64	1,19	2,56
Total	0,87	5,27	8,51	6,77

ND : non détecté

Les travaux plus récents de PORRES et coll. (1993) ont été réalisés à partir de pulpe de café fraîche ou pressée, additionnées ou non de mélasse de canne à sucre et ensilées dans des silos en tranchées. Les auteurs observent une diminution du taux de caféine au cours des ensilages de pulpes non pressées. Cette diminution est liée à une perte de matière sèche importante. Ces résultats confirment que la diminution du taux de caféine au cours des ensilages est certainement due à l'évacuation de ce composé soluble dans les liquides de drainage. L'importance quantitative de ces liquides semble par ailleurs corrélée à la mauvaise stabilisation des ensilages.

### 2.5.6.3 - La valeur nutritive des ensilages de pulpe de café

La pulpe de café a une valeur nutritive potentielle similaire à celle d'un fourrage tropical de bonne qualité. En ce qui concerne sa valeur nutritionnelle, la pulpe de café ensilée est supérieure à la pulpe sèche mais elle est inférieure pour la digestibilité *in vitro*. Certains auteurs affirment que l'amélioration de l'acceptabilité de la pulpe après ensilage est due à la diminution de la caféine et des tanins, entraînés par les eaux de drainage (ADAMS et DOUGAN, 1981). DE MENEZES et coll. (1993) démontrent qu'en milieu liquide les bactéries lactiques sont capables de dégrader les tanins. Cependant, la disponibilité des protéines reste affectée par la présence d'un fort taux d'azote lignifié. L'utilisation de la pulpe de café dans les rations alimentaires des ruminants et des porcs est acceptable dans une proportion de 20 % de la ration alimentaire (BRESSANI et coll., 1974 ; CABEZAS et coll., 1978 ; JARQUIN, 1978).

Les essais nutritionnels réalisés avec de la pulpe ensilée par CALLE en 1977 sur des poulets montrent une diminution du poids du au changement d'alimentation pendant la première semaine. La prise de poids a été de 13 g pour le groupe témoin, 16 g pour le groupe nourri avec de la pulpe ensilée et 17 g pour le groupe alimenté avec de la pulpe ensilée en fosses, laquelle étaitensemencée par des vers de terre, source de protéines animales. Aucune mortalité n'a été enregistrée. Avec de la pulpe ensilée en fosse, il est possible de remplacer jusqu'à 20 % du maïs de la ration. L'auteur conclut que les taux de croissances sur pulpe de café sont comparables à ceux enregistrés sur maïs seulement si la pulpe est administrée sur des poulets de plus de 400 g ; il est donc recommandé d'utiliser la pulpe de café uniquement dans les rations de grossissement.

CABEZAS et coll. (1976) et BENDAÑA (1977) montrent que la pulpe ensilée présente une valeur nutritive supérieure à la pulpe fraîche, laquelle a un effet sur la mortalité, la perte de poids et l'efficacité alimentaire chez les moutons et les rats (Tableau 2.23)

**Tableau 2.23 : Effet sur la mortalité et la prise de poids chez des rats nourris avec de la pulpe de café fraîche (P.F) et de la pulpe ensilée (P.E). (BENDAÑA, 1977)**

Niveau de protéine (en diète)	Niveau de pulpe de café	Mortalité		Prise de poids	
		P.F.	P.E.	P.F.	P.E.
10 %	30 %	62,5	12,5	-12	18
15 %	30 %	12,5	0	34	74
20 %	30 %	25	0	66	113
25 %	30 %	37,5	12,5	72	126

## 2.6 - Conclusion

Cette analyse bibliographique nous a permis dans un premier temps de présenter le substrat que nous allons étudier au cours de ce travail. Il s'agit de la pulpe de café, principal sous-produit de la transformation industrielle des cerises de café. Les facteurs qui justifient cette étude sont plus particulièrement les problèmes de pollution engendrés par les grandes quantités de ce résidu humide et la possibilité, de part sa composition chimique, de l'utiliser en alimentation animale. Cependant, la présence de composés toxiques tels que la caféine et les composés phénoliques limitent son utilisation. D'autre part, l'humidité élevée et le caractère saisonnier de la production de ce sous-produit posent le problème de sa conservation, préalable à sa valorisation industrielle.

Pour détoxifier et conserver ce substrat, différentes alternatives sont envisageables. En ce qui concerne la décaféination de la pulpe de café en milieu solide, des travaux importants ont été réalisés sur la sélection de souches de champignons filamenteux capables de dégrader la caféine (ROUSSOS et coll., 1994a, 1995), ainsi que des études sur leur utilisation en FMS.

La principale technique de conservation de produits agricoles humide est l'ensilage. De nombreux travaux existent sur l'ensilage en zones tempérées, mais très peu de publications s'intéressent aux sous-produits des régions intertropicales. En ce qui concerne la pulpe de café, il n'existe aucune information sur le suivi microbiologique des ensilages. Par contre, quelques données existent sur leur évolution chimique et leur valeur nutritionnelle.

Cette étude bibliographique nous a permis de constater qu'il existe très peu de travaux sur la microflore endogène des substrats agricoles tropicaux et aucun article, à notre connaissance, concernant la pulpe de café. Enfin, nous n'avons pas trouvé de références récentes sur les cultures mixtes associant des bactéries lactiques à des champignons filamenteux.

Par contre, il existe une bibliographie importante sur la composition chimique de la pulpe de café ainsi que sur les techniques de FMS que nous utiliserons au cours de ce travail.

**MATERIEL**

**ET**

**METHODES**

### 3 - MATERIEL ET METHODES

#### 3.1 - Nature et origine des substrats

Les lots de pulpe sont des sous-produits solides obtenus lors du traitement des cerises de café arabica par le procédé de la « voie humide ».

- La pulpe A est le résidu d'un procédé humide classique utilisé dans une usine mexicaine. Elle a été séchée durant 10 jours au soleil pour atteindre un taux d'humidité de 10 % environ.
- Les pulpes B et C ont été fournies par le Dr. Zuluaga du centre de recherches CENICAFE en Colombie. Elles ont été récupérées à la sortie d'un dépulpeur expérimental sans eau, puis soit séchée au soleil pendant 2 jours pour atteindre un taux d'humidité voisin de 10 % (Pulpe B) ; soit lyophilisée ( Pulpe C).

Les coques sont le résidu solide du traitement par la voie sèche des cerises de café robusta. Le lot de coques D est originaire d'Inde. Il a été obtenu après séchage au soleil des cerises de café puis décorticage. Les coques ont été stockées sous abri. Ce lot de coques (humidité 14 %) a été fourni par le Dr. Ramakrishna du CFTRI, Mysore, Inde.

Les lots de pulpe ont été stockés au laboratoire dans des sacs en plastique à température ambiante. Leur taux d'humidité a été régulièrement contrôlé et n'a présenté aucune variation significative durant toutes la période de nos travaux.

L'étude sur la microflore endogène de la pulpe de café a été réalisée sur les trois lots de pulpe de café (A, B, C) et sur le lot de coques (D).

L'ensemble des expériences de décaféination et d'ensilage ont été réalisées à partir du lot de pulpe A de café arabica obtenu au Mexique à Xalapa selon un procédé humide dans une structure industrielle de l'IMNECAFE. Ce substrat, séché au soleil, a été broyé puis tamisé. Nous avons utilisé la fraction de broyat de granulométrie comprise entre 0,8 et 2 mm.

#### 3.2 - Détermination de la microflore endogène de la pulpe de café

##### 3.2.1 - Milieux de culture

L'estimation des bactéries totales est réalisée sur différents milieux de culture dont le pH est ajusté à 6,8. Pour le comptage des champignons et des levures, un antibiotique (chloramphénicol à 0,25 g.l<sup>-1</sup>) est additionné aux différents milieux de culture. Le pH est ajusté à 5,6. On a utilisé les milieux suivant afin de déterminer :

La microflore totale :	Bactéries	: Milieu Plate Count Agar
	Champignons	: Milieu Potatoes Dextrose Agar + Antibiotique
	Levures	: Milieu Sabouraud + Antibiotique

Les groupes nutritionnels : Milieu Cellulose (Mandels et Weber)  $\pm$  Antibiotique  
Milieu Amidon  $\pm$  Antibiotique  
Milieu Pectine  $\pm$  Antibiotique  
Milieu à base de Pulpe de Café  $\pm$  Antibiotique

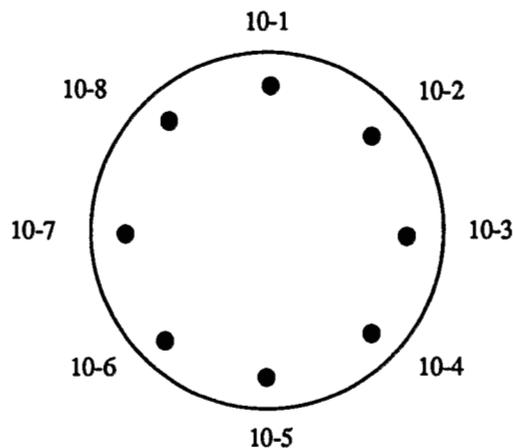
La microflore lactique : Lactobacilli MRS Agar

Les milieux Plate Count Agar, Potatoes Dextrose Agar, Sabouraud Dextrose Agar et MRS agar sont des produits Difco prêts à l'emploi (Références en Annexe 1). La composition des autres milieux est donnée en Annexe 1. Tous ces milieux ont été stérilisés à 121 °C pendant 15 minutes et répartis en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 20 ml par boîte.

### 3.2.2 - Ensemencement et comptage

Les dilutions décimales sont réalisées à partir d'une suspension mère composée de 10 grammes de pulpe sèche broyée non tamisée (10 ou 5 % d'humidité) et de 90 ml d'eau distillée stérile additionnée d'un tensioactif (Tween 80 à  $1\text{g.l}^{-1}$ ). L'ensemble est homogénéisé à l'UltraTurrax à  $8\,000\text{ tours.min}^{-1}$  pendant 4 minutes.

Afin de limiter le nombre d'ensemencement, nous avons mis au point une technique d'évaluation des dilutions optimales à ensemercer, en vue du comptage effectif des différents microorganismes. Cette technique consiste à déposer, sur deux boîtes de Pétri de chaque milieu, 20  $\mu\text{l}$  de chaque dilution comme indiqué sur la figure 3.1.



**Figure 3.1** : Schéma de la technique d'ensemencement par point des boîtes de Pétri pour déterminer les dilutions optimales

Les boîtes de Pétri sont incubées quelques jours à l'étuve à 28 °C. Cette expérience permet outre d'optimiser l'ensemencement, mais également de tester l'adéquation des milieux.

Ayant ciblés les dilutions qui permettront un comptage optimal des colonies par boîte, les différents milieux de culture sont inoculés en surface à partir d'une nouvelle série de dilutions, à raison de 0,2 ml de chaque suspension par boîte. Tous les ensemencements sont réalisés en triple. L'étalement se fait grâce à l'aide de billes de verre stériles.

Les boîtes sont incubées à l'étuve à 28 °C pendant environ 1 semaine. Les comptages se font au cours du temps. La distinction entre les bactéries et les levures est réalisée au microscope à partir d'états frais.

Les milieux MRS sont incubés à 28 °C, en atmosphère anaérobie grâce au système Anaérocult A (Merck). Ce système a permis de différencier les contaminants aérobies des microorganismes lactiques.

### 3.3 - Les microorganismes

#### 3.3.1 - Les champignons filamenteux

Au cours de cette étude, nous avons utilisé huit souches de champignons filamenteux qui avaient été présélectionnées au cours de travaux antérieurs (ROUSSOS et coll., 1989) effectué à la UAM à Mexico. Ces champignons filamenteux appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* et ont été retenus pour leur capacité à dégrader la caféine en milieu liquide. Les fiches descriptives de ces huit souches sont données en Annexe 2.

#### 3.3.2 - Les ferments d'ensilage

Trois ferments d'ensilage ont été utilisés au cours de ce travail :

- un « pied de cuve » obtenu à partir d'un ensilage naturel de pulpe de café. Le protocole d'obtention et les caractéristiques de ce ferment sont présentés au § 5.1.
- *Lactobacillus plantarum* A6. Cette souche a été isolée du manioc roui au Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM à Brazzaville, Congo (GIRAUD et coll., 1991). L'étude physiologique et enzymologique de cette souche amylolytique a été réalisée par GIRAUD en 1993.
- DpH4 de la société PURINA-France. Il s'agit d'un conservateur biologique d'ensilage commercial homologué par le Ministère de l'Agriculture. Ce ferment est composé de deux souches de bactéries lactiques homofermentaires, *Lactobacillus plantarum* à  $10^{10}$  bactéries.g<sup>-1</sup> et *Pediococcus acidilactici* à  $3.10^9$  bactéries.g<sup>-1</sup> ainsi que d'un complexe enzymatique (Cellulases : 10 000 unités d'activité CMC<sub>Case</sub>.g<sup>-1</sup>).

### 3.3.3 - La conservation des souches

Les souches de champignons filamenteux sont entretenues et conservées en pilulier sur un milieu gélosé incliné à base de café, Milieu Café Moulu Saccharose (CMS) dont la composition est donnée en Annexe 1. Après incubation des souches pendant 10 jours à 25 °C, elles sont soit lyophilisées, soit conservées à + 4 °C pendant environ 6 mois.

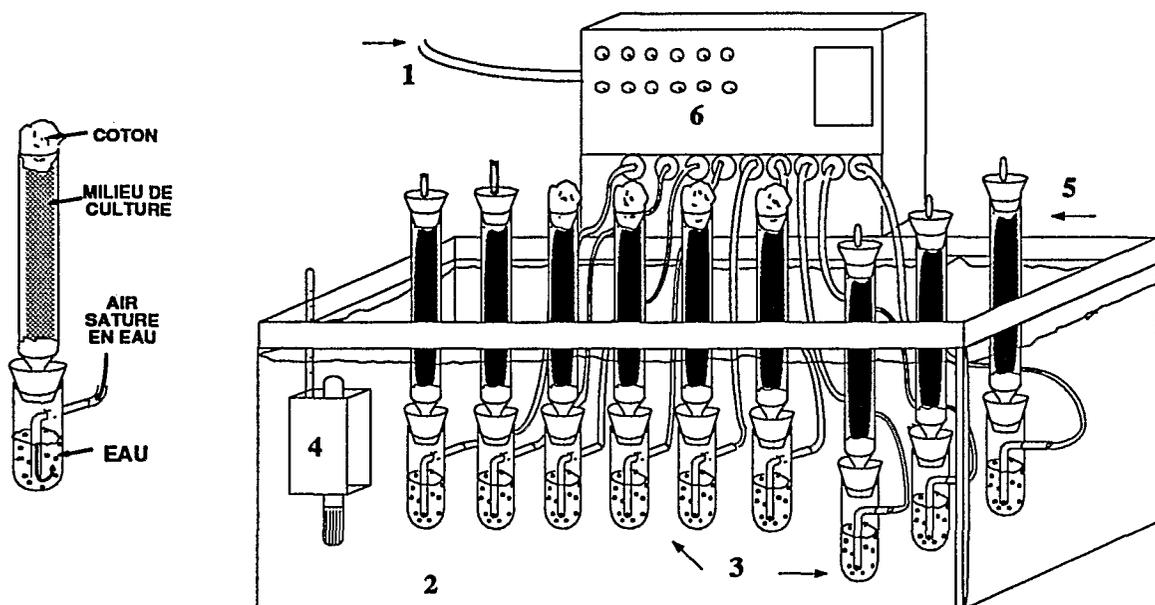
La souche de *Lactobacillus plantarum* A6 est conservée dans du glycérol à - 80 °C. Après croissance en milieu liquide MRS pendant 24 heures, la culture est reprise avec 50 % de glycérol, distribuée stérilement en tube stérile jetable de 1 ml et conservée à - 20 °C. La souche se conserve plusieurs mois dans ces conditions.

Le DpH4 se conserve sous forme de poudre lyophilisée dans son sachet d'origine, 8 mois à la température ambiante et 12 mois à + 4 °C.

## 3.4 - Les Fermentations en Milieu Solide (FMS)

### 3.4.1 - Les FMS aérobies pour la croissance des champignons

Pour étudier la physiologie des champignons filamenteux capables de se développer sur pulpe de café et de dégrader la caféine, nous avons utilisé le dispositif de fermentation solide aérobie déjà largement décrit par différents auteurs (RAIMBAULT, 1980 ; HUERTA-OCHOA, 1984 ; ROUSSOS, 1985 ; TREJO-HERNANDEZ, 1986 ; ORIOL, 1987 ; DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; SOCCOL, 1992). Ce dispositif est présenté schématiquement sur la figure 3.2.



**Figure 3.2 : Dispositif d'incubation pour les FMS aérobies**

1 : Entrée d'air - 2 : Bain-marie thermostaté - 3 : Humidificateur  
4 : Résistance chauffante - 5 : Colonne de fermentation - 6 : Microvannes d'aération

Les réacteurs sont constitués de colonnes de verre (5) de 4 cm de diamètre et 20 cm de longueur, leur volume utile est d'environ 250 ml. Une fois remplies avec le support, les colonnes sont montées sur un humidificateur (3) et introduites dans un bain thermostaté (2) à température contrôlée (4). Le contrôle du flux d'air saturé en eau s'effectue par l'intermédiaire de microvannes à pointeaux (6). Afin de s'assurer de la saturation et de la mise à température de l'air, un petit bulleur est disposé sous chaque colonne (3). Le débit d'air est réglé à la sortie de chaque colonne. Ce dispositif permet le contrôle et le suivi en continu de la fermentation.

#### **3.4.1.1 - Mise en œuvre d'une FMS**

Un exemple de fiche technique de mise en œuvre d'une expérience de FMS est présenté en Annexe 3.

##### **3.4.1.1.1 - Suspension de spores et solution minérale**

Les différentes souches de champignons filamenteux sont cultivées pendant 5 jours sur un milieu CMS gélosé. La récupération des spores est réalisée avec 100 ml d'eau stérile additionnée de Tween 80. La concentration en spores de la suspension utilisée pour l'inoculation des substrats solides est de  $2.10^7$  spores.g<sup>-1</sup> PMS (ROUSSOS et coll., 1989).

On ajoute une solution minérale à la pulpe de café pour faciliter le démarrage de la fermentation. Cette solution ne contient pas d'azote (ROUSSOS et coll., 1989).

Composition : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,3 g.l<sup>-1</sup> ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,12 g.l<sup>-1</sup> ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 0,3 g.l<sup>-1</sup> ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O : 0,3 g.l<sup>-1</sup>

##### **3.4.1.1.2 - Préparation des colonnes de fermentation**

La solution minérale est incorporée à la pulpe de café afin d'obtenir une humidité avoisinant 50 %. Le milieu est homogénéisé à l'aide d'un homogénéiseur électrique. Il est ensuite stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes afin d'éliminer les contaminants naturels de la pulpe de café. Les colonnes destinées à recevoir le milieu de culture, ainsi que tous les instruments nécessaires à la manipulation, sont stérilisés par autoclavage. Un tampon de coton, ainsi qu'une rondelle de papier filtre, sont introduits au fond des colonnes pour filtrer et diffuser l'air entrant dans le milieu de culture.

Après stérilisation et refroidissement, le milieu est inoculé avec la suspension de spores ajustée à pH 4.4 et correspondant un taux d'ensemencement de  $2.10^7$  spores.g<sup>-1</sup> PMS. L'humidité finale du mélange doit être de 68 % environ. La base de calcul des différentes quantités est donné en Annexe 4.

Le milieu inoculé est introduit dans les réacteurs à raison de 80 g de substrat environ par colonne. Au fur et à mesure du remplissage, la pulpe doit être légèrement tassée de manière à permettre la circulation des gaz. Une fois la colonne remplie, une nouvelle rondelle

de papier puis un morceau de coton sont positionnés sur le haut de la colonne, afin de limiter les contaminations (Figure 3.2).

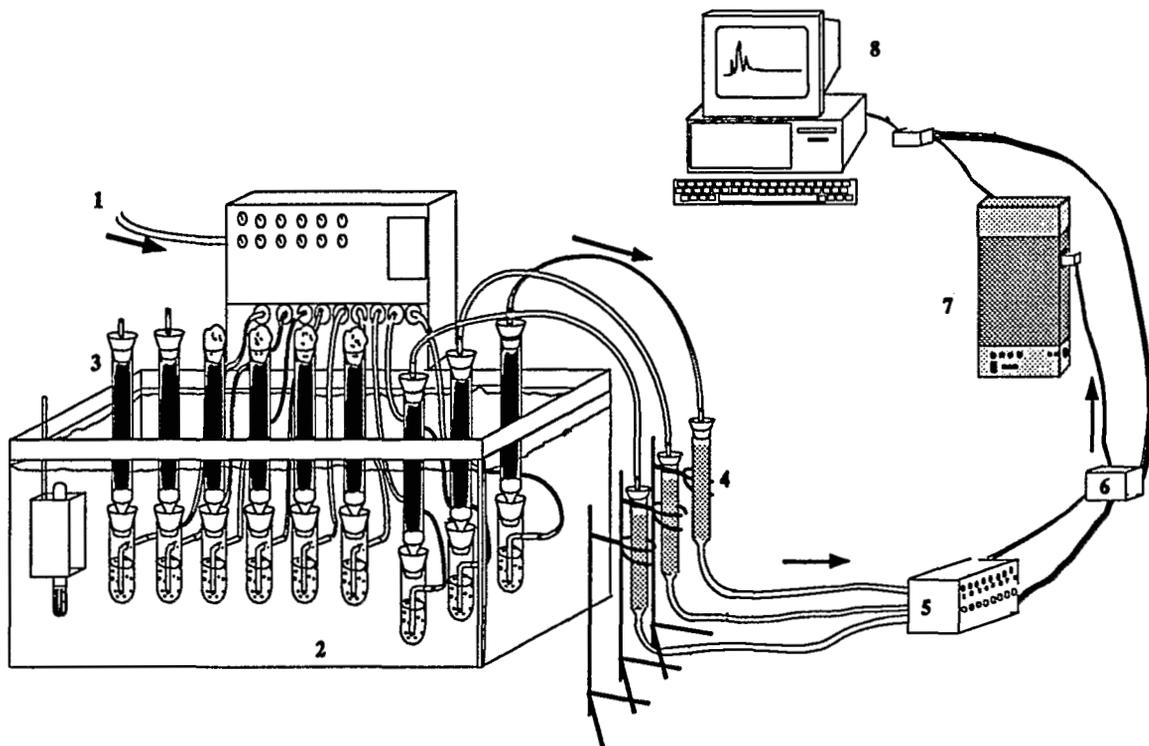
### 3.4.1.2 - Installation de la fermentation

Les colonnes contenant la pulpe de café sont montées sur les humidificateurs puis installées dans le bain-marie thermostaté (Figure 3.3). Sauf indication contraire, les conditions suivantes ont été fixées pour l'ensemble des fermentations :

- Température :  $25\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$  ;
- Flux d'air diffusé :  $4\text{ l.h}^{-1}$  pour chaque colonne

Cette installation fonctionne en continu et de manière indépendante pour chaque incubateur. Ainsi il est possible de prélever des échantillons (colonnes) à des temps différents sans perturber le reste du dispositif.

Les gaz sont collectés en sortie de fermenteur pour analyse. Le système d'analyse des gaz (Figure 3.3) est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) muni d'un détecteur à conductivité thermique couplé à un ordinateur permettant de suivre l'évolution des gaz au cours de la fermentation (DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; SOCCOL, 1992 ; TREJO-HERNANDEZ, 1992).

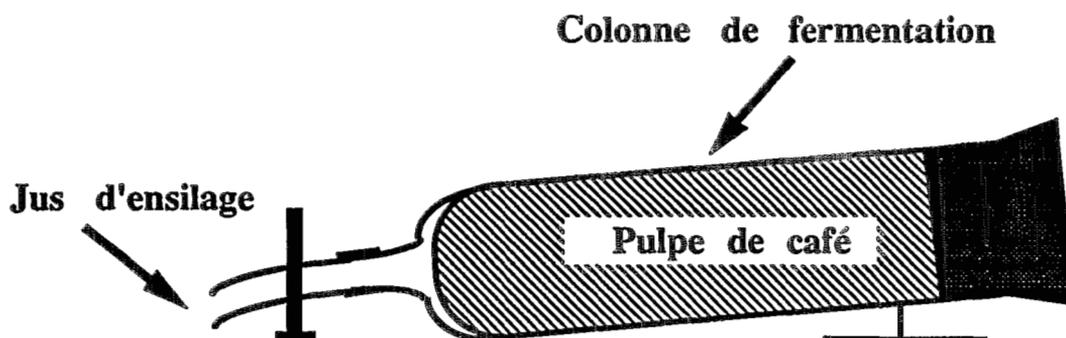


**Figure 3.3 : Dispositif d'analyse automatisé des gaz de la fermentation solide utilisant un chromatographe des gaz.**

- 1 : Entrée d'air - 2 : Bain-marie thermostaté - 3 : Colonnes de fermentation - 4 : Colonne en silicagel  
5 : Echantillonneur - 6 : Boîtier de commande de l'injection automatique  
7 : Chromatographe en phase gazeuse - 8 : Ordinateur

### 3.4.2 - La technique d'ensilage

Pour suivre l'évolution biochimique et microbiologique des ensilages, nous avons utilisé des microsilos de laboratoire dont la capacité est de 60 ou de 150 g de matériel humide. Il s'agit soit de colonnes en verre de FMS fermées aux deux extrémités (Figure 3.4), soit de pots à prélèvements en plastique scellés avec du Parafilm incubés à l'obscurité.



**Figure 3.4** : Schéma du dispositif d'un microsil expérimental pour l'ensilage de la pulpe de café

#### 3.4.2.1 - Mise en œuvre des ensilages

Une fiche technique type de mise en œuvre d'un ensilage de pulpe de café est présentée en Annexe 5. Cette mise en œuvre comprend les étapes suivantes :

##### 3.4.2.1.1 - Préparation des ferments d'ensilage

Le « pied de cuve » : Il s'agit d'un ensilage naturel de pulpe de café de deux mois (§ 5.1). Les ensilages sont inoculés à raison de 7 % PMF soit  $10^4$  bactéries lactiques par gramme PMS.

*Lactobacillus plantarum* A6 : La souche est mise en culture 24 heures avant l'inoculation à 30 °C dans des erlens de 250 ml contenant 100 ml de milieu MRS liquide. L'estimation de la population bactérienne est faite par néphélométrie. L'absorbance des suspensions cellulaires est mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre Milton Roy Spectronic 401. La suspension bactérienne est ajustée à  $10^8$  bactéries A6 par gramme PMS.

Ferment commercial DpH4 : Suivant les conseils d'utilisation du fabricant, il n'y a pas eu de mise en culture préalable de ce ferment. Au moment de l'ensemencement, une quantité de poudre est diluée dans de l'eau distillée afin d'obtenir des taux d'inoculation, soit de  $10^5$  bactéries lactiques par gramme PMS, soit de  $10^8$  bactéries lactiques par gramme PMS.

#### **3.4.2.1.2 - Préparation des microsilos**

La pulpe de café broyée et tamisée est réhydratée jusqu'à obtenir une humidité de 70 % environ. Dans le cas d'une inoculation par la microflore endogène, la pulpe est réhydratée avec de l'eau puis mélangée avec le « pied de cuve ». Dans les autres cas, la pulpe sèche non stérilisée est réhydratée et inoculée avec la suspension bactérienne souhaitée (A6 ou DpH4). Les pots d'ensilage sont remplis en tassant la pulpe afin de limiter la quantité d'air. Ils sont fermés puis scellés avec du Parafilm. On agit de même avec les microsilos « colonne » décrits précédemment.

Lorsque le substrat d'ensilage est constitué de pulpe fermentée dont le taux d'humidité est généralement voisin de 70 %, l'inoculation s'effectue par ajout d'un volume minimal des différentes suspensions bactériennes concentrées.

#### **3.4.2.2 - Conditions de fermentation d'ensilage**

Les microsilos sont incubés à l'obscurité et à une température constante de 30 °C pendant 1 mois. On a préparé autant de microsilos que de points de prélèvements souhaités.

### **3.5 - Le traitement des échantillons**

A la différence des fermentations liquides, la prise d'échantillons au cours des fermentations solides aérobies ou anaérobies est délicate. En effet, pour étudier les paramètres de la fermentation en fonction du temps, il est nécessaire de prélever une colonne complète ou un pot d'ensilage correspondant à un temps de fermentation donné. Pour traiter tous les échantillons dans les mêmes conditions, ceux-ci sont conservés à - 20 °C au fur et à mesure des prélèvements, sauf dans le cas où l'on a suivi l'évolution de la microflore. Dans ce cas, 5 g sont prélevés et traités immédiatement, le reste du matériel est congelé.

Les échantillons prélevés au cours des fermentations ont été soumis à un traitement standard permettant la réalisation des analyses biochimiques et microbiologiques (Figure 3.5).

En premier lieu, le contenu de la colonne est pesé au début de la fermentation et au moment du prélèvement afin de calculer la perte PMS du substrat.

Deux échantillons de 5 ou 10 g PMF chacun (soit environ 10 % du prélèvement) servent à la détermination de l'humidité. La caféine est dosée à partir de ces échantillons séchés puis broyés au broyeur à billes (§ 3.6.8).

Une autre fraction de 5 ou 10 g PMF est utilisée pour réaliser une dilution en poids (1/3) avec de l'eau distillée qui servira aux analyses biochimiques ultérieures (Figure 3.5). Dans le cas des FMS, la dilution poids à poids est très importante pour exprimer les résultats par rapport au poids de matière sèche. Le pH de la suspension est mesuré directement après une

forte agitation pendant 5 minutes à l'aide d'un barreau aimanté. L'observation microscopique de cette suspension permet de déterminer le stade de développement du microorganisme lorsqu'il s'agit de champignons filamenteux. Pour les analyses ultérieures, il est nécessaire de séparer la pulpe de café par centrifugation (5 000 g pendant 30 minutes). Le surnageant est filtré sur filtre 0,45 µm. Le reste du matériel fermenté frais est congelé puis lyophilisé.

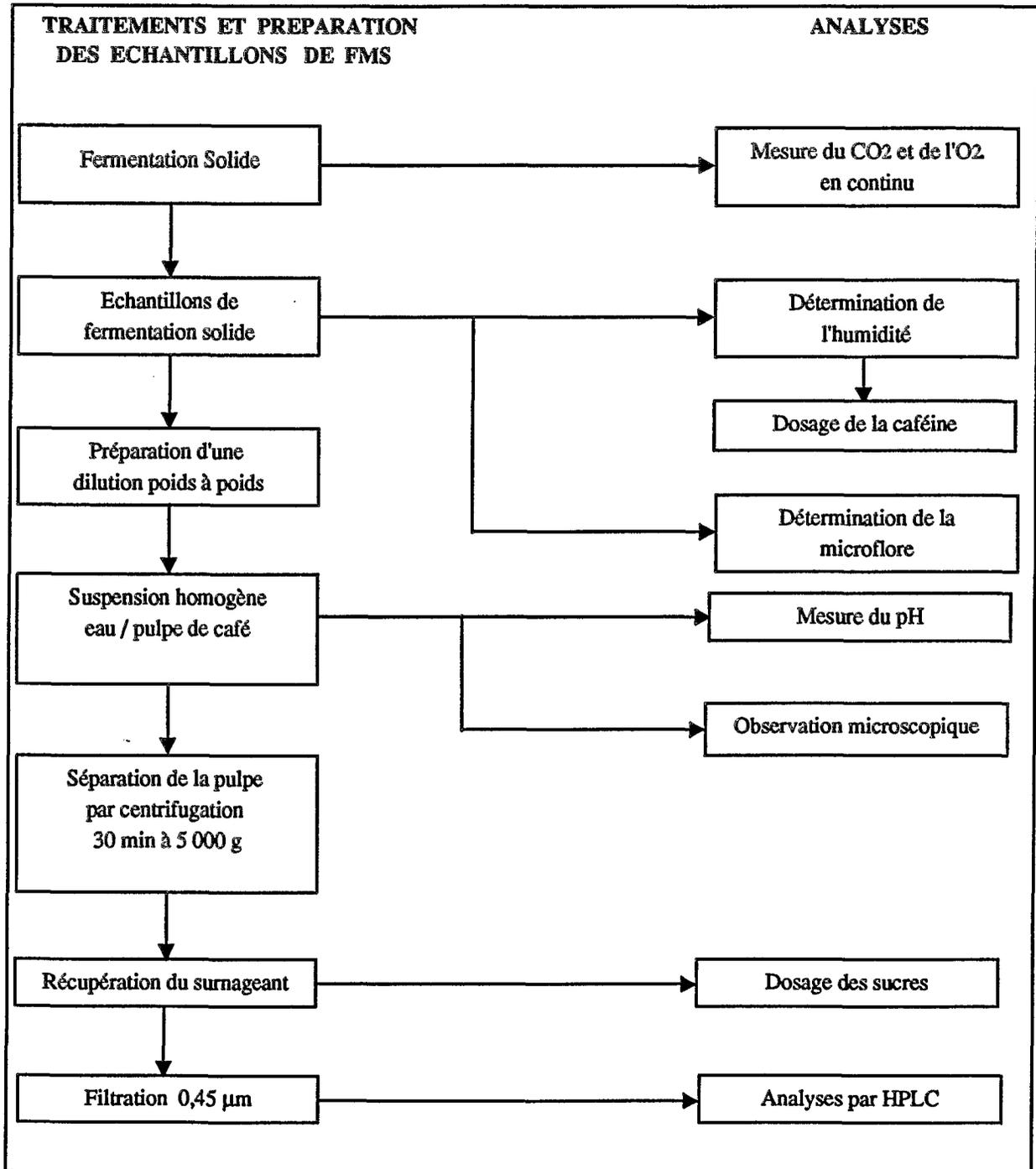


Figure 3.5 : Schéma du traitement et de la préparation des échantillons de fermentation solide en vue de la réalisation des analyses

### 3.6 - Les techniques d'analyses

#### 3.6.1 - Analyse des gaz

Le système d'analyse des gaz est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) muni d'un détecteur à conductivité thermique couplé à un ordinateur permettant de suivre l'évolution des gaz en continu. Le couplage de cet appareillage avec des fermenteurs en culture solide et la mise au point de l'automatisation informatisée de la prise des données ont été réalisés par SAUCEDO-CASTAÑEDA (1991).

Les composants sont séparés sur une colonne concentrique de type Alltech CTR I. La colonne extérieure est remplie d'un support jouant le rôle de tamis moléculaire de 5Å. La colonne centrale est remplie de Porapak, polymère poreux ne retenant pas les gaz. Les conditions opératoires de la CPG sont les suivantes :

Détecteur :	Conductivité thermique
Température :	60 °C isothermique
Phase mobile :	Hélium
Débit de l'éluant :	35 ml.min <sup>-1</sup>
Tension du catharomètre :	160 mA
Pression de l'éluant :	1 bar
Volume injecté :	0,3 ml

Chaque gaz présentant une conductivité thermique différente, il est donc nécessaire d'étalonner le détecteur avec des mélanges étalons avant de procéder à l'analyse des gaz (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>). Les courbes de calibrations sont établies pour chaque gaz.

#### 3.6.2 - Observation du matériel frais

L'observation macroscopique (de visu ou à la loupe binoculaire Olympus SZH) permet d'évaluer l'état des cultures aux différentes étapes de la croissance et de déceler l'apparition des premières têtes conidiennes.

L'observation microscopique du mycélium donne des indications plus précises sur l'état physiologique du champignon et permet de relier les études biochimiques ou respiratoires au cycle de reproduction asexuée du champignon. Les échantillons sont placés dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. On utilise un microscope photonique à contraste de phase (Olympus BH2) équipé d'une chambre photographique.

#### 3.6.3 - Suivi de la microflore

Nous avons utilisé la technique d'ensemencement par point décrite au § 3.2.2 pour suivre l'évolution de la microflore totale au cours des différentes fermentations. Cette technique a permis l'utilisation d'un nombre minimum de boîtes de Petri. Sur trois boîtes

de chaque milieu, on dépose une goutte de 20 µl de chaque dilution. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 25 °C pendant quelques jours. Le milieu Plate Count Agar (pH 6.5) a été utilisé pour le comptage des bactéries totales. Les champignons et les levures totales ont été estimés sur milieux Potatoes Dextrose Agar et Sabouraud Dextrose Agar (pH 5.6) avec du chloramphénicol à 0,25 g.l<sup>-1</sup>. L'estimation de la microflore totale anaérobie a été réalisée sur Milieu Lactobacilli MRS Agar, incubé en atmosphère anaérobie grâce au système Anaérocult A (Merck).

La solution mère est réalisée à partir de 5 ou 10 g PMF de pulpe de café (soit environ 10 % de l'échantillon) dans 45 ml ou 90 ml (dilution au 1/10ème) d'eau stérile additionnée de Tween 80. L'ensemble est homogénéisé à l'Ultra-Turrax à 8 000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 4 minutes.

#### **3.6.4 - Matière sèche, Humidité**

L'échantillon est mis à sécher pendant 24 h à 105 °C (SATO et coll., 1983). Une fois sec et refroidi en atmosphère sèche (dessicateur contenant du silicagel), il est pesé au 1/10ème de mg. La perte en eau de l'échantillon permet d'exprimer la matière sèche (quantité de solides pour 100 g d'échantillon frais), ou la teneur en eau (masse d'eau contenue dans 100 g de matière fraîche). Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche ou en pourcentage d'humidité.

#### **3.6.5 - Mesure du pH**

Les mesures de pH ont été réalisées à l'aide d'un pH mètre digital Knick muni d'une électrode combinée Ingold. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen des solutions tampon (Schott-Geräte) de pH 4.0 et 7.0 à 25 °C.

#### **3.6.6 - Dosage des substrats et des produits de la fermentation par HPLC**

Les analyses ont été effectuées au moyen d'un appareillage HPLC modulaire :

- pompe : LDC 3200 Consta Metric ;
- vanne d'injection : Vanne rhéodyne 7125 munie d'une boucle d'injection de 20 µl ;
- colonne : Aminex HPX87H (Biorad) ;
- four : Jones Chromatography ;
- détecteurs : Réfractomètre PHILIPS PU 4026, spectrophotomètre LDC 3100 ;
- intégrateur : Logiciel CHROMA (Biosystème).

La colonne utilisée dans cette étude sépare les acides organiques des sucres simples ou complexes et des différents alcools par l'action combinée d'interactions hydrophobes, de tamisage moléculaire et d'échanges d'ions. La résine greffée H<sup>+</sup> est un copolymère de styrène et de sulfonate de divinyl benzène. Deux détecteurs sont branchés en série en sortie de colonne : un réfractomètre pour détecter les sucres, les alcools et quelques acides organiques et un détecteur UV à 210 nm qui met en évidence les substances présentant des doubles liaisons. L'analyse par réfractométrie a un seuil de détection relativement faible, mais permet un dosage précis pour des concentrations supérieures à 300 mg.l<sup>-1</sup>.

Les conditions opératoires sont les suivantes (GIRAUD et coll., 1991) :

Phase mobile :	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6 mM, dégazé sous hélium
Débit du solvant :	0,8 ml.min <sup>-1</sup>
Pression :	800 - 900 PSI ou MegaPa
Volume injecté :	20 µl
Température :	65 °C

Le tableau 3.1 présente la liste des composants quantifiés par cette méthode ainsi que leur temps de rétention.

**Tableau 3.1 : Composants quantifiés par l'HPLC équipé de deux détecteurs : un réfractomètre Philips PU 4026 et un spectrophotomètre LDC 3100**

Composants	Refractomètre	UV
	Temps de rétention (min)	Temps de rétention (min)
Glucose	6,80	
Acide lactique	9,67	9,53
Acide acétique	11,35	11,22
Acide propionique	13,30	13,16
Acide isobutyrique	14,88	14,73
Méthanol	14,89	
Acide butyrique	16,10	15,95
Ethanol	17,00	
Acide isovalérique	18,42	18,25
Acide valérique	21,74	21,55

### 3.6.7 - Dosage des sucres réducteurs totaux

Les sucres réducteurs totaux sont dosés par la méthode de MILLER (1959). Le pouvoir réducteur des sucres permet de réduire l'acide 3-5 dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique à chaud et en milieu basique. Le produit de la réaction développe une coloration jaune orangé présentant un maximum d'absorption à 575 nm. Une courbe étalon de glucose de 0 à 2 g.l<sup>-1</sup> a été réalisée pour chaque série de mesure afin d'exprimer les résultats en g.l<sup>-1</sup> d'équivalent de sucre réducteur. La présence de fortes concentrations en protéines peut interférer dans la lecture (ROUSSOS, 1982).

### 3.6.8 - Dosage de la caféine

La caféine est dosée par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) au Laboratoire de Chimie Technologie Café-Cacao du CIRAD-CP Montpellier, sous la responsabilité de B. GUYOT. La caféine est une base faible, on la déplace en solution aqueuse par une base forte. Après filtration et addition d'une solution étalon, l'échantillon est injecté en CPG et les différents constituants sont analysés qualitativement et quantitativement. Le protocole expérimental est donné en Annexe 6.

### 3.6.9 - Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques de la pulpe de café sont dosés par HPLC au Laboratoire de Chimie Technologie Café-Cacao du CIRAD-CP Montpellier, sous la responsabilité de E. CROS. Le protocole expérimental d'extraction des composés phénoliques est donné en Annexe 7.

## 3.7 - Expression des résultats

Au cours de ce travail, tous les résultats expérimentaux seront exprimés par rapport au poids de Matière Sèche (PMS).

### 3.7.1 Evaluation de la microflore

Les résultats obtenus sont la moyenne de triplica. Pour ramener le nombre de colonies au gramme de pulpe de café sèche, on a utilisé la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de colonies}}{D \times P \times \% \text{ MS}}$$

où :

P est la quantité d'échantillon prélevée (g) ;

% MS est la teneur en matière sèche de l'échantillon (%) ;

D est le facteur de dilution.

### 3.7.2 Evaluation des produits

Les résultats expérimentaux des acides organiques et des sucres réducteurs sont exprimés en g.l<sup>-1</sup>. Nous avons utilisé la formule suivante pour les convertir en pourcentage de matière sèche:

$$\frac{X \times 100}{D \times P \times \% \text{ MS}}$$

où :

X est la concentration en acide ou en sucre obtenu par dosage ( $\text{g.l}^{-1}$ ) ;

P est la quantité d'échantillon humide analysé (g) ;

% MS est la teneur en matière sèche de l'échantillon (%) ;

D est le facteur de dilution de l'échantillon.

### 3.7.3 Résultats des analyses de gaz

La mesure directe de la vitesse instantanée (dérivée) de la production ou de la consommation des gaz a été réalisée par l'échantillonnage d'un courant d'air provenant de la fermentation. Les résultats sont exprimés en millilitre de gaz par heure, rapportés au gramme de pulpe de café sèche initiale selon l'équation suivante :

$$\frac{(\text{CO}_2 \text{ ou } \text{O}_2) \times \text{Débit} \times 60}{\text{Poids initial} \times \% \text{ MSI}}$$

où :

CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> sont les teneurs des gaz dans l'air, exprimées en pourcentage (par exemple CO<sub>2</sub> ≈ 0 % et O<sub>2</sub> ≈ 21 % au début de la fermentation),

le débit de l'air est exprimé en  $\text{ml.min}^{-1}$ ,

le Poids initial est la masse du contenu de la colonne de fermentation exprimée en grammes,

la teneur en matière sèche initiale est exprimée en pourcentage.

L'accumulation ou la consommation totale des gaz peut être calculée en intégrant les données de la vitesse par la règle du trapèze selon la formulation suivante :

$$\Delta t \times C_i + (C_{i+1} - C_i) \times \Delta t \times 0,5$$

où :

$\Delta t$  est l'intervalle de temps entre deux analyses (i et i+1),

C<sub>i</sub> est la valeur de la concentration du gaz au début de l'intervalle de temps,

C<sub>i+1</sub> est la valeur du gaz à la fin du même intervalle.

La mesure directe de la production ou de la consommation globale (intégrale) des gaz est réalisée dans un volume confiné avec recirculation d'air. Dans ce cas, le calcul des teneurs des gaz, exprimé en millilitres de gaz par gramme de matière sèche initiale, s'effectue selon l'équation suivante :

$$\frac{(\text{CO}_2 \text{ ou O}_2) \times V \times 60}{\text{Poids initial} \times \% \text{ MSI}}$$

où :

CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> sont les pourcentages des gaz donnés par l'analyse,

V est le volume total (ml),

le Poids initial est la masse du contenu de la colonne de fermentation exprimée en grammes,

% MSI est le pourcentage de matière sèche initiale.

**MICROFLORE**  
**ENDOGENE**  
**DE LA PULPE ET**  
**DES COQUES DE CAFE**

#### 4 - MICROFLORE ENDOGENE DE LA PULPE ET DES COQUES DE CAFE

La pulpe de café est un substrat intéressant pour l'alimentation animale de part sa teneur en sucres, protéines, acides aminés et autres nutriments (ELIAS, 1978). Comme nous avons pu le constater dans l'étude bibliographique (§ 2.2), son utilisation est limitée par la présence de composés toxiques tels que la caféine et les composés phénoliques (BRESSANI, 1978c). De plus, l'humidité élevée (80 - 85 %) de la pulpe, favorise le développement de la microflore naturelle. Si celle-ci n'est pas traitée ou stabilisée immédiatement, elle devient une source de pollution importante (ROUSSOS et coll., 1993a). On peut supposer enfin, que sous l'action incontrôlée des microorganismes endogènes, la pulpe de café va se dégrader et perdre une partie de ses qualités nutritionnelles.

Il est donc important de rechercher de nouveaux procédés biotechnologiques pour conserver la pulpe de café. Favoriser le développement des bactéries lactiques afin de préserver la pulpe de café par ensilage pourrait être une solution (MURILLO, 1978 ; ROUSSOS et coll., 1993a). La connaissance de la quantité et de la diversité de la microflore naturelle de la pulpe de café est indispensable à la réalisation ultérieure de travaux sur la conservation par ensilage et la valorisation biotechnologique de ces sous-produits. Cette approche a été recommandée au cours d'études concernant la valorisation d'autres substrats agricoles tropicaux (ROUSSOS, 1985). Rappelons enfin qu'il n'existe aujourd'hui aucune étude détaillée sur la microflore endogène de la pulpe de café.

##### 4.1 - Origine de la pulpe et des coques de café

Ce travail présente la détermination, la quantification et la comparaison de la microflore de deux lots de pulpe de café (*C. arabica*) issus de traitements par voie humide : le premier est originaire de Xalapa (Mexique), le second de Chinchina (Colombie), et d'un échantillon de coques de café (*C. canephora*) obtenu par voie sèche, originaire de Mysore (Inde).

**Tableau 4.1 : Caractéristiques des différents lots de pulpes et de coques de café .**

Substrat	Variété	Origine	Traitement	Séchage	Humidité	Caféine % PMS	
Pulpe de Café	Arabica	Xalapa Mexique	Voie Humide Industriel	Soleil / 10 jours	10 %	≈ 1 %	Pulpe A
Pulpe de Café	Arabica	Chinchina Colombie	Voie Humide Dépulpage à sec Pilote	Soleil / 2 jours	10 %	≈ 1 %	Pulpe B
				Lyophilisée	5 %	≈ 1 %	Pulpe C
Coques de Café	Robusta	Mysore Inde	Sec Industriel	Soleil / 3 semaines Stockage / 2 mois	14 %	≈ 0,4 %	Coques D

Le procédé de traitement humide utilisé à Xalapa (Mexique) est différent de celui utilisé à Chinchina (Colombie). A Xalapa, il s'agit d'un procédé industriel classique utilisant une grande quantité d'eau au cours du dépulpage. La pulpe issue de ce procédé (Pulpe A) nécessite 10 jours de séchage au soleil pour réduire l'humidité finale à 10 % environ (Tableau 4.1).

A Chinchina, au Centre de Recherche CENICAFE, une nouvelle méthode utilisant un dépulpeur sans eau est testée au stade pilote. Un échantillon de pulpe de café issu de ce traitement (Pulpe B) a été séché au soleil, 2 jours ont été nécessaires pour obtenir une humidité de 10 %. Un autre lot de cette même pulpe a été immédiatement lyophilisé à la sortie du dépulpeur (Pulpe C), ceci afin de connaître la microflore initiale. Son humidité est de 5 % environ. La teneur en caféine de ces trois échantillons est d'environ 1 % PMS.

Les coques de café provenant de Mysore (Inde) sont le sous-produit de la voie sèche. Les cerises de café ont été décortiquées après séchage au soleil (3 semaines). Les coques ont ensuite été stockées sous abri pendant plusieurs mois. L'humidité des coques prélevées après 2 mois de stockage est de 14 % et le taux de caféine de 0,4 % PMS.

#### 4.2 - Evaluation quantitative de la microflore

Tous les comptages ont été réalisés en triplica suivant le protocole décrit au § 3.2 de manière rigoureusement identique. On peut donc supposer que le facteur d'erreur lié à ce type de comptage est le même pour tous les résultats obtenus.

Le tableau 4.2 présente les résultats obtenus sur les trois lots de pulpe et sur le lot de coques en nombre de germes formant colonies (UFC) par gramme de matière sèche ainsi que les pourcentages de chaque population de microorganismes par rapport à la population totale.

**Tableau 4.2 : Numération de la microflore totale des lots de pulpes et de coques de café**

Substrats	Champignons		Bactéries		Levures		Total .g <sup>-1</sup> PMS
	.g <sup>-1</sup> PMS	%	.g <sup>-1</sup> PMS	%	.g <sup>-1</sup> PMS	%	
Pulpe de Café A	1,24 10 <sup>6</sup>	1,1	1,11 10 <sup>8</sup>	98,8	1,07 10 <sup>5</sup>	0,1	1,12 10 <sup>8</sup>
Pulpe de Café B	2,85 10 <sup>4</sup>	4,1	6,64 10 <sup>5</sup>	94,7	8,52 10 <sup>3</sup>	1,2	7,01 10 <sup>5</sup>
Pulpe de Café C	8,56 10 <sup>4</sup>	2,4	1,33 10 <sup>6</sup>	37,0	2,18 10 <sup>6</sup>	60,6	3,60 10 <sup>6</sup>
Coques de Café D	3,64 10 <sup>5</sup>	5,6	6,14 10 <sup>6</sup>	94,3	4,48 10 <sup>3</sup>	0,1	6,51 10 <sup>6</sup>

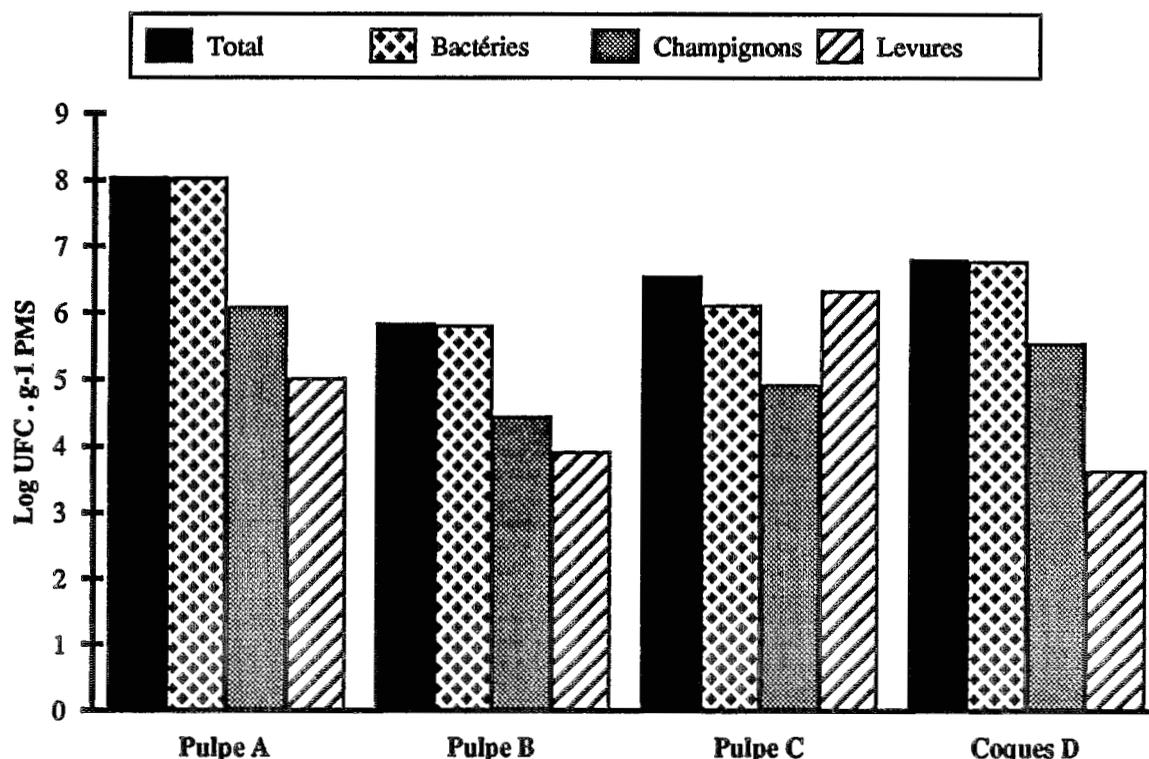
La microflore totale de la pulpe A issue du traitement par voie humide est nettement supérieure à celle des coques D issues du traitement par voie sèche. Le facteur est de 17 environ. Rappelons qu'il s'agit de deux variétés différentes de café.

La microflore totale de la pulpe provenant de Chinchina en Colombie (procédé humide avec un dépulpage à sec) est nettement moins importante que celle de la pulpe mexicaine

(traitement humide industriel classique) ; le facteur est de 160 entre les deux lots de pulpe A et B séchés au soleil. L'humidité initiale plus faible du substrat colombien, impliquant un temps de séchage plus court, peut expliquer cette différence significative.

La microflore totale de la pulpe fraîche colombienne C (échantillon immédiatement lyophilisé après dépulpage) est 5 fois plus importante que la microflore totale de la même pulpe séchée au soleil pendant 2 jours (Pulpe B).

La représentation en Log du nombre de germes (UFC) par gramme de pulpe sèche (Figure 4.1) permet de mieux apprécier les résultats.



**Figure 4.1** : Distribution de la microflore totale de champignons, de bactéries et de levures contenus dans les lots de pulpes et de coques de café.

Ces résultats confirment que la pulpe de café est un substrat très chargé en micro-organismes (Bactéries, Levures et Champignons). Sur le lot de pulpe lyophilisée C que l'on peut assimiler à de la pulpe fraîche, on observe une dominance des levures (61 %) et un nombre élevé de bactéries mais qui ne représentent que 37 % du total. Après séchage au soleil, ce sont les bactéries qui sont les populations dominantes : 99 % pour la pulpe mexicaine A ; 95 % pour la pulpe colombienne B. On observe la quasi disparition des levures mais le nombre de champignons reste du même ordre de grandeur.

Sur le lot de coques D, les bactéries représentent 94 % de la population totale à l'image des pulpes A et B, mais il faut noter que la population des champignons représente un pourcentage beaucoup plus important que dans le cas des pulpes.

### 4.3 - Distribution qualitative de la microflore

Afin de mettre en évidence la distribution qualitative des microorganismes, nous avons utilisé des milieux de culture à base d'amidon, de cellulose ou de pectine. On a aussi déterminé la microflore sur un milieu à base de pulpe de café. Enfin, la microflore anaérobie a été estimée sur un milieu MRS Agar.

#### 4.3.1 - Populations se développant sur cellulose, amidon et/ou pectine

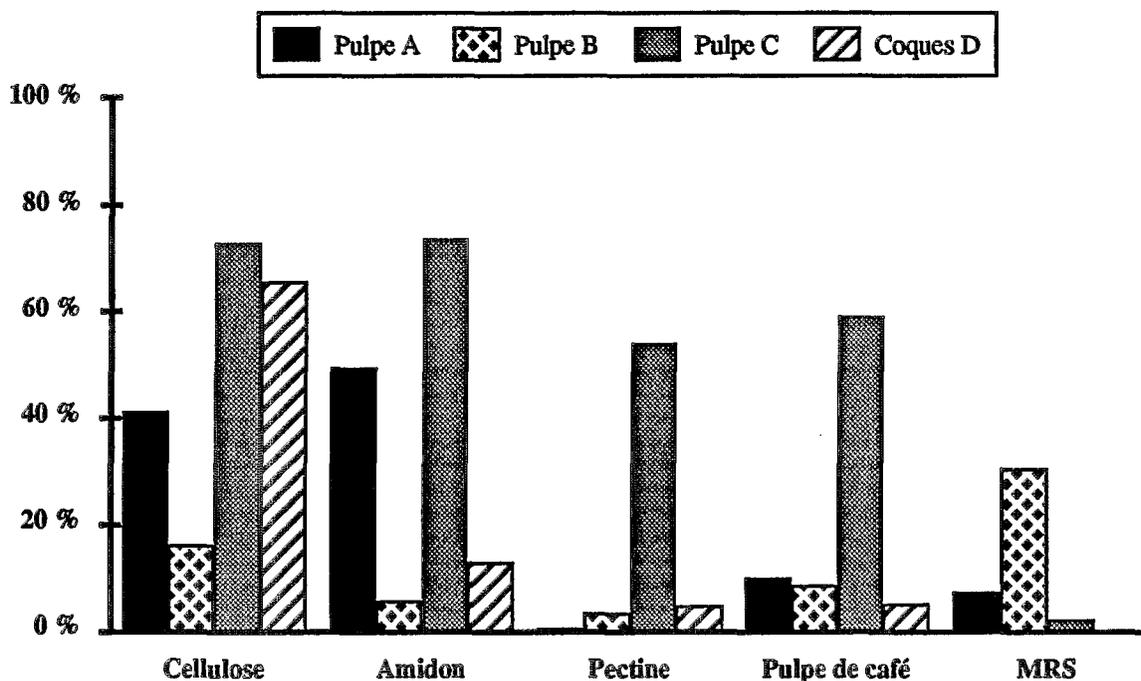
On retrouve des microorganismes se développant sur les milieux de culture à base de cellulose, de pectine ou d'amidon, quelque soit l'échantillon analysé.

A partir de la pulpe fraîche colombienne C, le nombre total de microorganismes sur les trois milieux est similaire (Figure 4.2) et très important en pourcentage. 73 % de la microflore totale se développe sur le milieu à base de cellulose, 74 % sur le milieu à base d'amidon et 54 % sur le milieu à base de pectine. D'autre part, en analysant les types de microorganismes se développant sur chaque milieu (Figure 4.3), on observe une dominance très nette des levures, une absence de bactéries sur les milieux pectine et amidon et un nombre similaire de champignons (2 à 3 %).

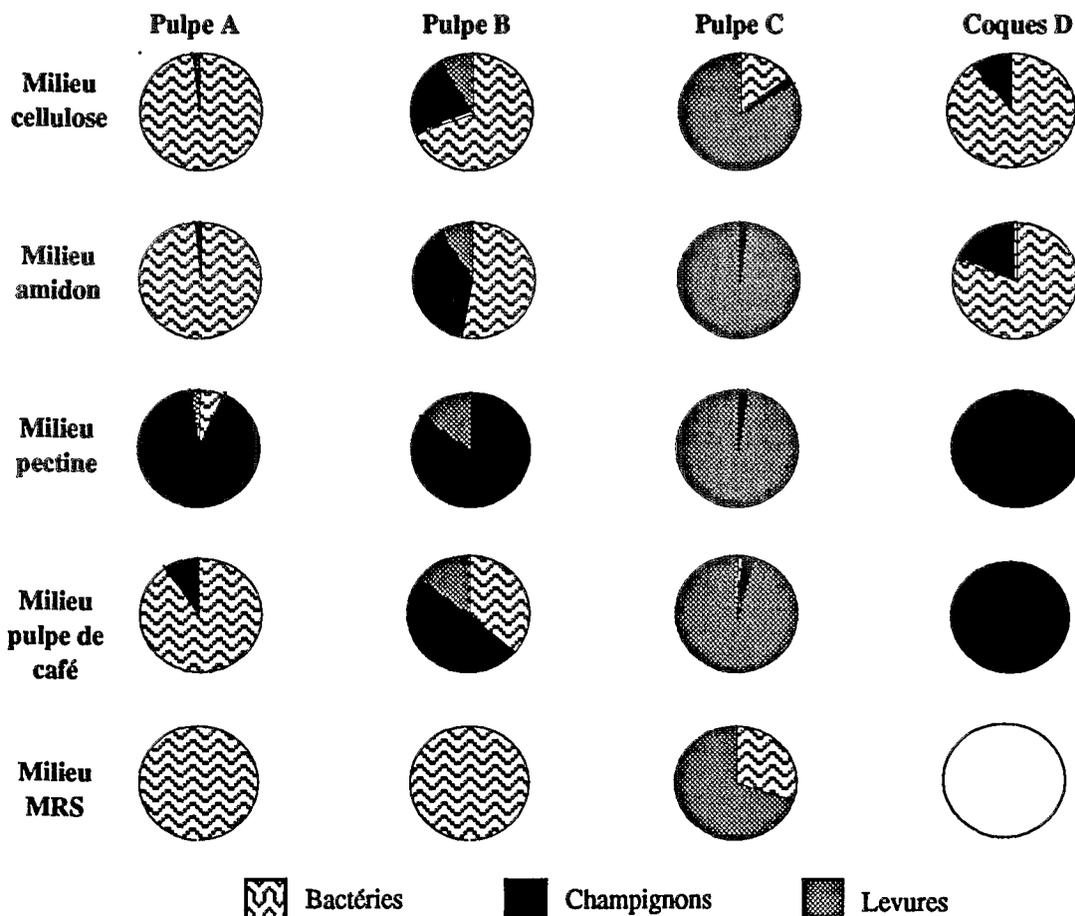
La microflore de la pulpe colombienne séchée au soleil B sur cellulose est la plus importante (16 %), et celle sur pectine la moins nombreuse (4 %). En comparaison avec la pulpe colombienne lyophilisée C, la microflore sur cellulose, sur amidon et sur pectine diminuent fortement d'un facteur 20, 200 et 400 fois respectivement (Figure 4.2). Si l'on observe la répartition des microorganismes sur les trois milieux, on remarque que les levures sont peu nombreuses (Figure 4.3). Sur les milieux cellulose et amidon, les bactéries sont devenues dominantes (69 % et 53 % respectivement) et sur le milieu pectine ce sont les champignons (85 %). Les champignons, sur les milieux cellulose et amidon, sont significatifs en pourcentage (23 % et 38 % respectivement).

En ce qui concerne la pulpe mexicaine A, les nombres totaux de microorganismes sur les milieux à base de cellulose (41 %) et d'amidon (50 %) sont importants et similaires. On note la dominance des bactéries (98 % sur cellulose et 99 % sur amidon). Sur milieu pectine, la microflore totale (1 %) est environ 50 fois moins importante que sur les milieux cellulose et amidon, les bactéries représentent un pourcentage peu important (7 %) ; par contre les champignons sont dominants (91 %) comme sur la pulpe colombienne B séchée au soleil (Figures 4.2 et 4.3). Sur l'ensemble des trois milieux, le pourcentage de levures est très peu élevé (GAIME-PERRAUD et coll., 1993).

Dans les coques de café D, la microflore se développant sur milieu cellulose est largement dominante (65,5 %), elle représente 13 % sur milieu amidon et 5 % sur milieu pectine (Figure 4.2). Sur ce milieu, les champignons représentent 100 % de la population, par contre les bactéries sont largement dominantes sur les milieux amidon et cellulose (Figure 4.3).



**Figure 4.2 : Distribution de la microflore totale en fonction de la composition des milieux de culture**



**Figure 4.3 : Distribution des bactéries, des champignons et des levures en fonction de la composition des milieux de culture. Résultats exprimés en % du nombre total sur chaque type de milieu**

### 4.3.2 - Population se développant sur le milieu pulpe de café

Pour les lots A, B et D séchés au soleil, le nombre total de microorganisme se développant sur milieu à base de pulpe de café est environ 10 fois moins important que le nombre total de germes. Ce sont principalement les bactéries qui disparaissent quantitativement. Par contre, à partir de la pulpe lyophilisée C, la microflore totale ne diminue que d'un tiers et reste dominée par les levures (95,5 %) (Figure 4.3).

### 4.3.3 - Population anaérobie sur milieu MRS

Aucune population anaérobie ne s'est développée à partir du lot de coques D (ROUSSOS et coll, 1995). D'autre part, quelque soit le lot de pulpe analysé, aucun champignon ne s'est développé en absence d'oxygène. Enfin, on note la présence de levures uniquement à partir du lot de pulpe colombienne lyophilisée C (Figure 4.3) ; alors que sur les lots de pulpe séchés au soleil A et B, seules des bactéries se sont développées. Cette population de bactéries représente 7,5 % de la microflore totale dans le cas de la pulpe mexicaine A et 30 % pour la pulpe colombienne B. Dans le cas de la pulpe colombienne lyophilisée, la population totale sur MRS représente environ 2,5 % de la microflore totale.

## 4.4 - Discussion

La comparaison des résultats obtenus sur les lots B et C de pulpe colombienne, avant et après séchage au soleil, montrent que le séchage de la pulpe de café provoque une diminution du nombre total de microorganismes, essentiellement due à une quasi disparition des levures, les bactéries et les champignons étant peu affectés (Tableau 4.2).

Par ailleurs, l'influence du type de dépulpeur utilisé dans le traitement par voie humide sur la quantité de microorganismes endogènes de la pulpe est très nettement marquée. Dans le cas de la pulpe A (dépulpeur industriel utilisant une grande quantité d'eau), l'humidité initiale de la pulpe est supérieure à 80 % et le temps de séchage pour obtenir une humidité avoisinante les 10 % est d'environ 10 jours. La quantité de microorganismes déterminée sur ce substrat ( $1,12 \cdot 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS) est très supérieure (x 160) à celle déterminée sur la pulpe B ( $7,01 \cdot 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS) dont l'humidité initiale est comparativement plus faible (dépulpeur sans eau), et dont le temps de séchage est seulement de 2 jours. Néanmoins, dans les deux cas, les bactéries sont largement dominantes (A : 99 % et B : 95 %).

L'influence du pourcentage d'humidité des produits stockés sur la nature de la microflore s'exprime principalement sur le développement des champignons filamenteux. Le lot de coques (D), résidu de la voie sèche, a un taux d'humidité de 14 %, taux relativement élevé qui correspond à une activité de l'eau permettant le développement des champignons filamenteux. En effet, c'est sur ce lot que le pourcentage de champignons est le plus élevé

(6 % de la microflore totale). On a d'autre part pu observer que dans les deux mois qui ont suivi la réception, ce lot a été complètement envahi par ces champignons. Lorsque l'humidité des substrats est inférieure ou égale à 10 % (cas des lots de pulpes), on n'observe pas de développement des microorganismes.

L'utilisation de milieux à base d'amidon, de cellulose et/ou d'amidon a permis de mettre en évidence la spécificité de différentes microflores. C'est à partir du lot de pulpe lyophilisée (Pulpe C) que l'on observe les plus forts pourcentages de la microflore totale capable de se développer sur ces milieux. Lorsque les pulpes sont séchées au soleil, ces pourcentages diminuent de manière très significative. D'autre part, la population bactérienne est capable de se développer principalement sur les milieux à base de cellulose et d'amidon (Figure 4.3). Par contre, sur le milieu à base de pectine, on observe la prédominance de la population fongique.

Le milieu à base de pulpe de café n'est pas un milieu spécifique, il est riche en hydrates de carbone, en protéines et en éléments minéraux. Cependant, seulement 10 %, 9 % et 5 % de la microflore totale des lots A, B et D respectivement se développent sur ce milieu. Cela est certainement dû à la présence de composés qui inhibent la croissance de certains groupes de microorganismes sur ce milieu.

La présence, à partir des trois lots de pulpe, d'une microflore capable de se développer sur milieu MRS en anaérobiose, est une information très importante dans la mesure où l'on pourrait souhaiter favoriser le développement de cette microflore afin de stabiliser et conserver la pulpe humide à la sortie des dépulpeurs par la technique de l'ensilage. Cependant, il faut noter que sur la pulpe fraîche (Pulpe C), les levures sont majoritaires. Les bactéries représentent toutefois 30 % de la microflore anaérobie soit environ  $3.10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS. La bibliographie préconise pour les substrats des zones tempérées, la présence d'un minimum de  $10^5$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS à la mise en silo pour la réalisation d'un bon ensilage (BERTIN et HELLING, 1985). De ce point de vue, les résultats obtenus sur pulpe fraîche sont donc très intéressants.

**Tableau 4.3 : Microflore totale de différents substrats tropicaux.**  
nombre de microorganismes par gramme de substrat poids sec

Substrats Tropicaux	Microflore Totale
Pulpe de café A	$1,12 \cdot 10^8$
Pulpe de café B	$7,01 \cdot 10^5$
Pulpe de café C	$3,60 \cdot 10^6$
Coques de café D	$6,51 \cdot 10^6$
Bagasse de canne à sucre (ROUSSOS, 1985)	$2,64 \cdot 10^6$
Farine de manioc (RAIMBAULT, 1980)	$2,50 \cdot 10^8$

Le tableau 4.3 présente la microflore totale de différents substrats tropicaux en comparaison avec ceux obtenus au cours de notre étude sur les trois lots de pulpe de café et sur le lot de coques de café.

Dans les farines destinées à l'alimentation animale, on dénombre généralement  $10^8$  germes aérobies.g<sup>-1</sup> PMS, nombre relativement élevé (RAIMBAULT, 1980). Lorsque cette microflore aérobie appartient à un substrat humide, elle devient un handicap car en se développant, elle dégrade le matériel qui devient une source de pollution. Les résultats obtenus à partir des lots de pulpe de café colombien démontrent l'importance du type de traitement appliqué aux cerises de café. Ils sont environ 100 fois moins importants que ceux obtenus sur pulpe de café A ou sur farine de manioc.

ROUSSOS (1985) a démontré que pour de la bagasse de canne à sucre fraîche dont l'humidité initiale est de 44,4 %, le nombre de microorganismes total est de  $2,64.10^6$  germes.g<sup>-1</sup> PMS. Si cette bagasse reste stockée en tas 15 jours à l'air libre, le nombre s'élève à  $1,89 10^9$  germes.g<sup>-1</sup> PMS. Ces résultats montrent qu'il existe une population microbienne contaminante importante dans la bagasse fraîche qui évolue rapidement en fonction du temps de stockage.

On peut supposer qu'il en sera de même en ce qui concerne la pulpe de café. En effet, la microflore de ce substrat, dont l'humidité initiale (80 % environ) est encore plus importante que celle de la bagasse, va évoluer très rapidement. D'où, la nécessité de rechercher des techniques efficaces de conservation. Le séchage peut être une de ces techniques, mais il faut savoir que les aires de séchage ou les structures mécaniques permettant de diminuer l'humidité de ce substrat, si elles existent sur les lieux de production, sont déjà utilisées pour sécher le grain de café. A l'heure actuelle, la pulpe de café est généralement stockée dans des fosses à l'air libre ou rejetée dans les cours d'eau.

Il est possible d'utiliser la méthode de l'ensilage pour stabiliser la pulpe de café à la sortie des dépulpeurs en utilisant et en améliorant les fosses de stockage souvent existantes sur les lieux de production et en orientant les activités de la microflore naturelle décrite précédemment vers un développement rapide des bactéries lactiques provoquant une diminution importante des valeurs du pH.

Dans la suite de ce travail, nous étudierons l'évolution de la microflore totale aérobie et anaérobie au cours d'ensilages réalisés à partir de pulpe de café séchée et réhydratée. Nous travaillerons sur la pulpe A dont la microflore totale est de  $1,12.10^8$  germes.g<sup>-1</sup> PMS et dont la microflore anaérobie, exclusivement bactérienne, représente 7,5 % de la microflore totale soit  $10^6$  germes.g<sup>-1</sup> PMS. Nous étudierons d'autre part, les effets d'additifs biologiques sur ces ensilages.

#### 4.5 - Conclusion

La pulpe et les coques de café contiennent une importante microflore naturelle (Bactéries, Levures, Champignons filamenteux) qui varie de  $7.10^5$  à  $1,12.10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS.

Les échantillons provenant du Mexique (procédé humide industriel) présentent la plus forte population en microorganismes, environ 160 fois et 17 fois supérieure à celles évaluées sur les échantillons provenant respectivement de Colombie (procédé semi-humide pilote) et d'Inde (procédé sec).

La distribution des populations de bactéries, de levures et de champignons filamenteux est sensiblement similaire dans le cas de la pulpe de café, alors que la population des champignons est nettement prédominante dans les coques de café. La population de levures est dominante uniquement lorsque la pulpe de café est immédiatement lyophilisée après dépulpage. Enfin, une diversité importante au niveau des grands groupes nutritionnels constituant la microflore naturelle a été mise en évidence.

Cette microflore naturelle évolue rapidement d'où la nécessité de rechercher une technique efficace et fiable de conservation dans le cas de la pulpe de café.

La méthode de l'ensilage serait une solution pour stabiliser la pulpe de café en orientant les activités de la microflore naturelle vers un développement des bactéries lactiques. En effet, la bibliographie préconise un taux de  $10^5$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS à la mise en silo pour la réalisation d'un bon ensilage (BERTIN et HELLING, 1985), or la population de bactéries anaérobies sur milieu MRS a été estimée à  $3.10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS sur pulpe de café fraîche.

**CONSERVATION  
DE LA PULPE DE CAFE  
PAR ENSILAGE**

## 5 - CONSERVATION DE LA PULPE DE CAFE PAR ENSILAGE

La production saisonnière, la teneur élevée en eau de la pulpe de café et l'importance de la microflore endogène posent des problèmes à la conservation de ce sous-produit du traitement par voie humide du café (GAIME-PERRAUD et coll., 1993 ; ROUSSOS et coll., 1993a). Rappelons ici quelques contraintes supplémentaires au choix d'une technique de stockage :

- Volumes et tonnages important à traiter par jour (ZULUAGA, 1989) ;
- Produit riche et facilement putrescible qui nécessite un traitement rapide (BRAHAM et BRESSANI, 1978) ;
- Peu de main d'œuvre disponible ;
- Séchage naturel difficile (zone humide, peu de soleil, pas d'équipements disponibles) ;
- Nécessité d'un procédé industriel simple et économiquement rentable.

Afin de pouvoir utiliser toute l'année de la pulpe de café de bonne qualité et en quantités commercialement intéressantes, il est nécessaire d'employer des méthodes qui pourront être appliquées indépendamment du traitement du grain de café. Dans le cas d'une utilisation en alimentation animale, le procédé doit maintenir, voir améliorer la qualité nutritionnelle de la pulpe sans augmenter excessivement le prix de revient final.

La technique de conservation qui offre les meilleures perspectives, dans le cadre des exigences décrites ci-dessus, est l'ensilage. Cette technique est simple, elle peut être appliquée relativement facilement par les industriels du café et les éleveurs. Ce procédé permettrait d'emmagasiner la pulpe pendant la période de traitement du café, pour l'utiliser postérieurement sous forme fraîche ou déshydratée. Dans ce cas, le séchage pourrait se faire en utilisant les aires de séchage des usines de traitement du café qui ne sont pas utilisées en dehors de la période de récolte et de traitement des cerises de café.

L'ensilage est un procédé de conservation des produits végétaux par acidification en conditions anaérobies. Pour obtenir un bon ensilage, il est nécessaire de favoriser le développement des bactéries lactiques homofermentaires. En effet, la production rapide et importante d'acide lactique provoque une chute immédiate du pH et inhibe la croissance de microorganismes indésirables. L'anaérobiose interdit le développement de microorganismes aérobies comme les champignons filamenteux (§ 2.5).

Au cours de cette étude, nous étudierons d'un point de vue microbiologique et biochimique un ensilage naturel de pulpe de café. Puis nous déterminerons l'impact de l'apport de différents ferments sur cet ensilage. Le tableau 5.1 regroupe les informations sur la confection de ces différents ensilages. Ils sont tous réalisés à partir d'un même lot de pulpe de café. Il s'agit de la pulpe A, issue du traitement par voie humide dans l'usine de Xalapa au Mexique, séchée au soleil pendant 10 jours, puis conservée à l'obscurité dans des sacs en plastique (§ 3.1). L'humidité de ce substrat a été régulièrement contrôlée ; elle est restée inférieure à 10 % au cours de toute cette étude.

**Tableau 5.1 : Confection des microsilos à partir de pulpe de café (Pulpe A) réhumidifiée avec de l'eau**

	Ferments	Apport bactéries lactiques UFC.g <sup>-1</sup> PMS	Matière sèche initiale %	pH initial	Date d'ensilage
Ensilage TEMOIN	-	-	37,35	4,44	16 mars 1993
Ensilage PC	Pied de Cuve 7 %	1,5 10 <sup>4</sup>	33,24	4,26	17 mai 1993
Ensilage A6	<i>Lactobacillus plantarum</i> A6	2 10 <sup>8</sup>	33,36	4,25	5 mai 1993
Ensilage DpH4	Ferment commercial DpH4	10 <sup>5</sup>	33,53	4,37	27 octobre 1993

### 5.1 - Ensilage témoin et préparation d'un ferment naturel

Nous avons utilisé des microsilos en colonne (§ 3.4.2). Ceux-ci ont été remplis au maximum avec de la pulpe de café réhumidifiée avec de l'eau. Le taux d'humidité initial est de 63 % environ et le pH de 4.4. Les microsilos sont incubés 2 mois à l'étuve à 30 °C.

Au désilage, on remarque qu'aucun champignon ne s'est développé, ce qui montre que les conditions d'anaérobiose ont été respectées. Le produit présente une odeur agréable, légèrement acide, la couleur du substrat s'est légèrement éclaircie.

#### 5.1.1 - Evolution des paramètres physico-chimiques et suivi de la microflore

En fin d'ensilage, l'humidité du produit final est de 62 %, le pH de 3,9 et il n'y a pas eu de perte de poids en terme de matière sèche (Tableau 5.2).

**Tableau 5.2 : Evolution des principaux paramètres au cours d'un ensilage naturel de pulpe de café (2 mois)**

Paramètres		Pulpe initiale	Pulpe ensilée naturellement
Humidité	%	62,65	61,63
pH		4,44	3,90
Perte de poids	% PMS	-	0,80
Acide lactique	% PMS	0,00	2,39
Acide acétique	% PMS	0,00	0,29
Acide butyrique	% PMS	0,00	0,00
Sucres réducteurs totaux	% PMS	4,72	4,85
Glucose	% PMS	0,73	2,03
Fructose	% PMS	4,19	2,55
Ethanol	% PMS	0,00	0,00
Caféine	% PMS	1,04	0,95

Les analyses en HPLC de la pulpe ensilée montrent la présence d'un taux non négligeable d'acide lactique (2,39 % PMS), peu d'acide acétique (0,29 % PMS) et l'absence d'acide butyrique.

On observe une conservation de la teneur en caféine (environ 1 % PMS). Par contre, on remarque une diminution importante du taux de composés phénoliques et plus particulièrement de l'acide chlorogénique (850 unités avant ensilage, 150 unités au désilage) (Figure 5.1).

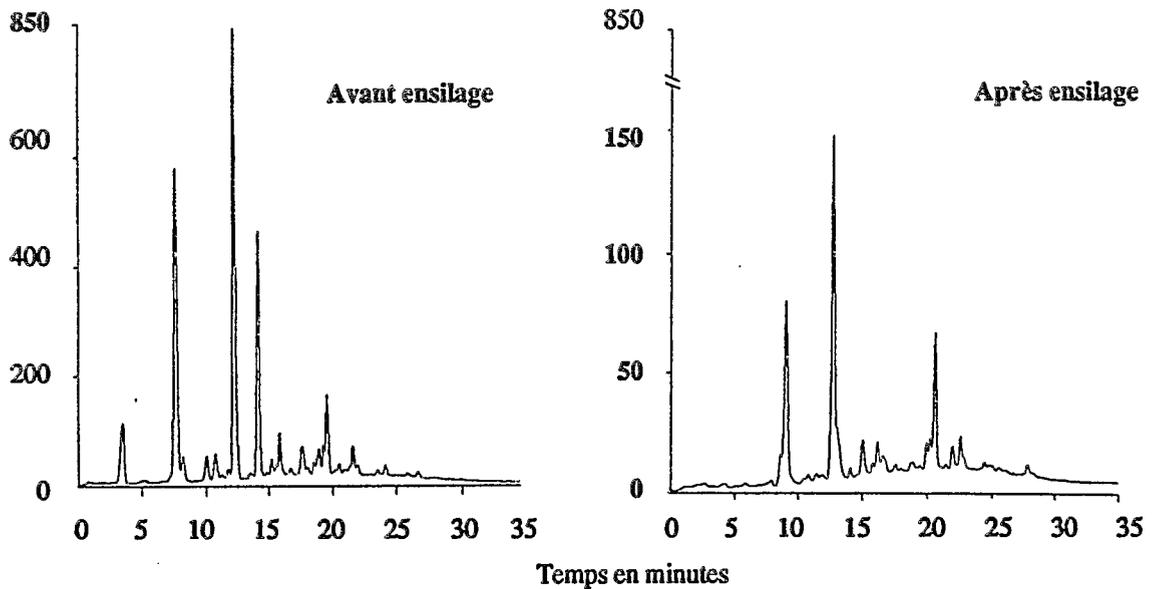


Figure 5.1 : Analyse en HPLC des composés phénoliques de la pulpe de café avant et après ensilage

En ce qui concerne le suivi de la microflore, les résultats sont présentés dans le tableau 5.3. Globalement, on observe une diminution d'un facteur 5 environ de la microflore totale. En particulier, on remarque la disparition de la population de champignons au cours de l'ensilage, l'augmentation des bactéries et des levures anaérobies.

Tableau 5.3 : Evolution de la microflore dans l'ensilage naturel de pulpe de café

Microflore	Unités	Pulpe A (\$ 4.2) (avril 1991)	Pulpe A Temps 0 (mars 1993)	Pulpe A Ensilée 2 mois (mai 1993)
Bactéries totales	(log 10 UFC.g <sup>-1</sup> PMS)	8,05	7,99	7,23
Champignons totaux	"	6,09	4,75	ND
Levures totales	"	5,03	4,59	5,61
Bactéries anaérobies	"	6,93	3,95	5,17
Levures anaérobies	"	ND	ND	4,1
<b>TOTAL</b>	<b>(UFC.g<sup>-1</sup> PMS)</b>	<b>1,12 10<sup>8</sup></b>	<b>9,83 10<sup>7</sup></b>	<b>1,76 10<sup>7</sup></b>

N.D : Non détectable

### 5.1.2 - Caractérisation des bactéries anaérobies

A partir des comptages effectués sur la pulpe ensilée, vingt souches de bactéries qui s'étaient développées sur milieu MRS en anaérobiose ont été isolées. Le tableau 5.4 présente quelques caractéristiques de ces souches cultivées sur milieu MRS liquide pendant 24 heures à 35 °C.

**Tableau 5.4 : Détermination du métabolisme de différentes bactéries anaérobies isolées de la pulpe de café ensilée naturellement. Analyse du surnageant de culture après croissance sur MRS glucose (10 g.l<sup>-1</sup>) à 35 °C pendant 24 heures.**

Souches	pH final	Glucose résiduel g.l <sup>-1</sup>	Acide lactique g.l <sup>-1</sup>	Acide acétique g.l <sup>-1</sup>	Ethanol g.l <sup>-1</sup>	Rendement (%) acide lactique / métabolites produits	Rendement (%) acide lactique / glucose consommé
L 8	3,74	0,30	7,04	1,69	0,00	80,67	72,56
L 18	3,75	0,36	7,06	1,68	0,00	80,82	73,32
L 3	3,77	0,26	7,05	1,70	0,00	80,57	72,38
L 11	3,83	0,27	6,74	1,65	0,00	80,28	69,21
L 14	3,83	0,27	7,53	1,85	0,00	80,24	77,36
L 6	3,85	0,31	7,17	1,78	0,00	80,10	74,02
L 17	3,87	0,27	7,16	1,98	0,00	78,37	73,66
L 1	3,93	1,17	6,69	1,76	0,00	79,18	75,76
L 20	3,97	1,36	5,99	1,73	0,00	77,62	69,33
L 2	4,02	1,64	5,94	1,83	0,00	76,41	71,05
L 10	3,93	1,89	5,56	1,54	0,00	78,32	68,54
L 5	4,74	3,22	2,09	1,47	0,88	47,06	30,83
L 15	4,24	3,31	4,26	1,66	0,00	72,00	63,60
L 9	5,05	4,34	1,44	1,41	0,57	42,12	25,52
L 4	5,08	5,02	1,57	1,63	0,61	41,18	31,53
L 16	4,95	5,63	1,98	1,31	0,00	60,20	45,27
L 19	5,35	5,96	1,01	1,59	0,35	34,22	24,99
L 13	5,52	6,93	0,92	1,55	0,29	33,32	30,04
L 12	5,86	7,77	0,55	1,52	0,00	26,64	24,68
L 7	5,98	8,27	0,48	1,55	0,00	23,79	27,96

Toutes ces souches sont des bacilles immobiles, asporulés, plus ou moins trapus, plus ou moins longs, en chaînette ou par paires. Elles sont toutes catalase négative et la majeure partie produisent une quantité importante d'acide lactique. Ces bactéries appartiendraient au groupe des bactéries lactiques et au genre *Lactobacillus*.

Les chromatogrammes obtenus en HPLC pour l'analyse des acides organiques sont relativement semblables, avec peu de pics spécifiques aux différentes souches. On note l'absence de production d'acide propionique, butyrique ou isobutyrique.

L'ensemble des données du tableau 5.4 permettent de regrouper ces 20 souches en trois groupes. Un premier groupe composé de bactéries qui consomment pratiquement tout le glucose (supérieur à 95 %), produisent de fortes concentrations d'acide lactique corrélées à des pH finaux très bas (environ 3.8). Les concentrations d'acide acétique sont faibles et il n'y a pas de production d'éthanol. Toutes ces souches produisent de faibles quantités d'acide malique. Ce sont les bactéries les plus fréquemment observées lors des comptages. Dans un second groupe, on retrouve des bactéries très proches du premier groupe, mais qui produisent moins d'acide lactique et pas d'acide malique. L'ensemble de ces bactéries lactiques auraient un métabolisme de type hétérofermentaire facultatif, c'est-à-dire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique (DELLAGLIO et coll., 1994).

Dans le troisième groupe, on trouve des bactéries hétérofermentaires strictes (productrices d'éthanol ou de fortes concentrations en acide acétique). La production d'acide lactique est faible et le rapport acide lactique sur acide acétique est inférieur à 2, exception faite pour la souche L15. On observe enfin que la faible production d'acide lactique n'entraîne qu'une faible diminution du pH. Le pH final est en effet supérieur dans tous les cas à 4.75 sauf pour la souche L15. Il s'agirait donc de bactéries peu performantes pour un processus d'ensilage.

Cette étude nous a permis de déterminer la présence d'une microflore lactique endogène à la pulpe de café. Cette microflore appartient principalement au genre *Lactobacillus*.

La microflore naturelle lactique dans les produits végétaux représente en général un très faible pourcentage de la microflore totale, environ 1 % du nombre total des microorganismes de la plante verte (BERTIN, 1986 ; HUBERT et DUPUY, 1994). Nous avons pu mettre en évidence que cette microflore représentait environ 2,5 % dans le cas de la pulpe de café « fraîche » (§ 4.3) et 7,5 % dans le cas de la pulpe séchée au soleil pendant 10 jours, puis conservée à l'obscurité dans des sacs en plastique sans précaution particulière. Ces comptages ont été réalisés en avril 1991, à la réception du substrat. L'humidité est restée inférieure à 10 % au cours du stockage qui a duré 3 ans (1990 à 1993). Le pourcentage de bactéries anaérobies a diminué au cours du temps de conservation puisqu'il avoisine les 0,1 % de la microflore totale en 1993 (Tableau 5.3). Cette microflore lactique représente encore  $10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS, ce qui démontre que les bactéries lactiques sont des microorganismes particulièrement résistants.

Cette microflore viable, hétérogène et naturellement présente dans la pulpe de café contribue d'une manière très significative à la conservation de la pulpe car elle s'exprime dès que les conditions environnementales (anaérobiose et humidité) le lui permettent. Rappelons que l'on ne détecte ni éthanol, ni acide butyrique, dans la pulpe ensilée au bout de deux mois. Les bactéries lactiques hétérofermentaires strictes naturellement présentes dans la pulpe de café sont donc minoritaires.

## 5.2 - Ensilage de pulpe de café avec addition de ferments contrôlés

Le procédé utilisé pour réaliser ces ensilages est décrit au § 3.4.2. Nous rappelons ici les principales caractéristiques techniques :

Un premier lot de pulpe de café a été ensemencé avec un pied de cuve (pulpe de café ensilée naturellement pendant 2 mois) à un taux de 7 % PMF soit  $10^4$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS.

Le second lot de pulpe est ensemencé avec une suspension de *L. plantarum* A6 à un taux de  $10^8$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS.

Le troisième lot est ensemencé avec un ferment commercial DpH4 composé de deux souches de bactéries lactiques : *L. plantarum* et de *P. acidilactici*, associées à un complexe enzymatique composé de cellulases. Nous avons respecté le taux d'inoculation préconisé par le fabricant, c'est-à-dire environ  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS.

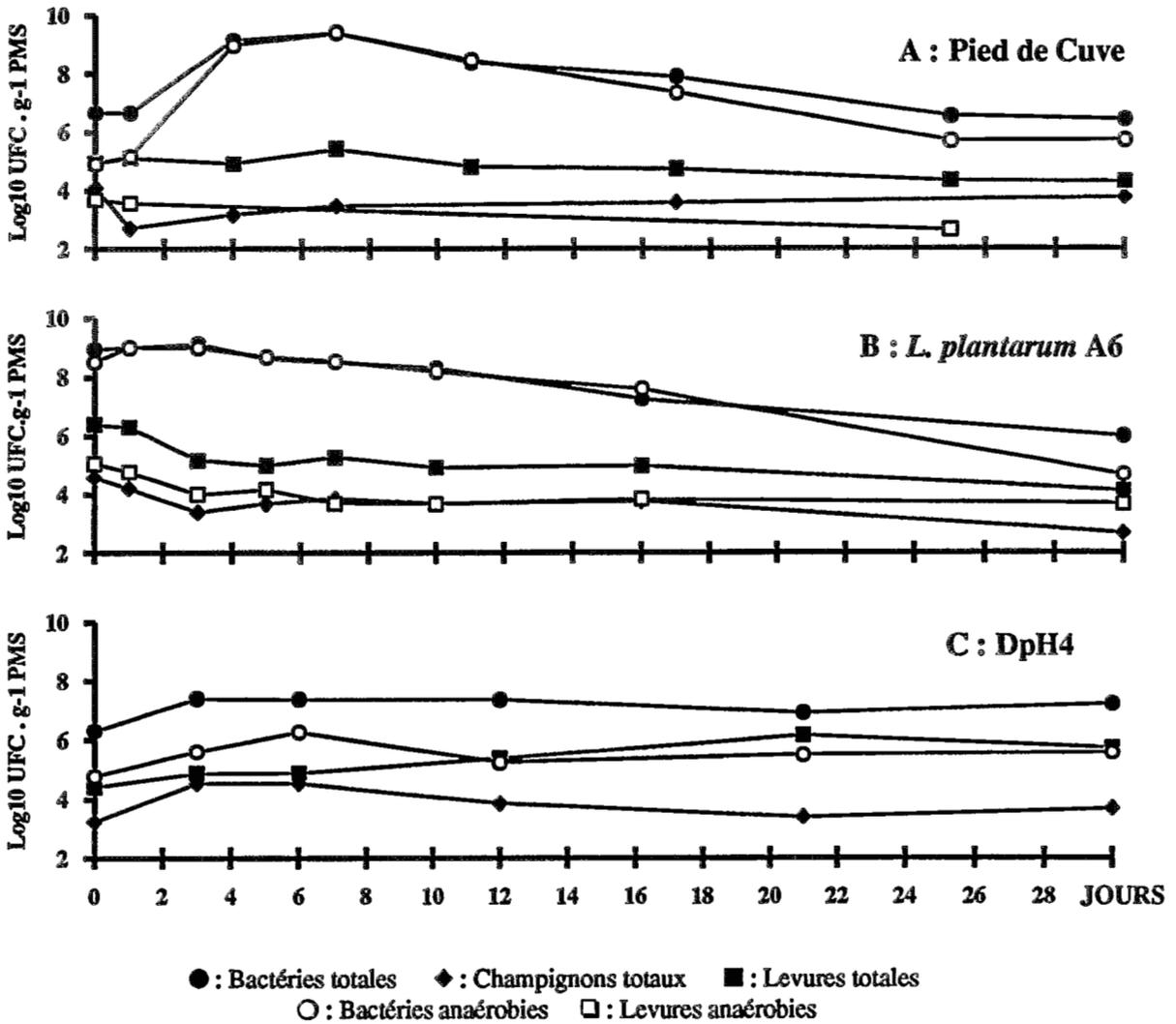
A l'ouverture des pots d'ensilage, nous n'avons pas détecté d'odeur de décomposition, la pulpe de café avait toujours sensiblement la même couleur, voire plus claire. Aucun développement de champignons n'a été observé sauf parfois au contact du bouchon de fermeture.

### 5.2.1 - Evolution de la microflore

L'évolution de la microflore au cours des trois ensilages est présentée sur la figure 5.2. Les microorganismes sont exprimés en Log UFC.g<sup>-1</sup> PMS. Nous avons déterminé en aérobiose les bactéries totales, les champignons et les levures ; en anaérobiose sur milieu MRS les bactéries et les levures anaérobies.

Les populations microbiennes évoluent différemment au cours des ensilages de la pulpe de café. A la mise en silos, les populations des champignons filamenteux et de levures sont aux environs de  $10^4$  germes.g<sup>-1</sup> PMS. Lorsque les ensilages sont inoculés par le pied de cuve ou par *L. plantarum* A6, on observe une diminution des champignons pendant les premiers jours d'ensilage. Le nombre des levures totales n'évolue que très peu dans le cas de l'ensilage inoculé par le pied de cuve. Il diminue pendant les premiers jours de l'ensilage ensemencé par *L. plantarum* A6. Les levures anaérobies qui représentent environ 10 % des levures totales, suivent les mêmes profils. Il est important de signaler que ces populations restent viables.

Lorsque la pulpe de café est inoculée par le ferment commercial DpH4 à un taux de  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS, on observe des profils d'évolutions des champignons et des levures différents de ceux observés sur les deux autres ensilages. Le nombre de champignons ne varie pas au début de la fermentation mais après 10 jours de fermentation. Les levures augmentent légèrement au cours de l'ensilage. On n'a pas pu dénombrer les levures anaérobies (nombre inférieur à  $10^2$  microorganismes.g<sup>-1</sup> PMS).



**Figure 5.2 : Evolution de la microflore au cours d'ensilages de pulpe de café inoculés par trois ferments lactiques différents (Pied de cuve ; *L. plantarum* A6 ; DpH4) pendant 30 jours**

Le nombre de bactéries lactiques endogènes dans la pulpe de café avant inoculation par des ferments et sa mise en silo, est de  $10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS environ (Tableau 5.3). L'ensilage PC estensemencé par un pied de cuve contenant environ  $1,5 \cdot 10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS. L'ensilage A6 est inoculé par  $2 \cdot 10^8$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS (Tableau 5.2). Dans les deux cas, le nombre des bactéries lactiques augmentent les premiers jours jusqu'à  $10^9$ - $10^{10}$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS (Figure 5.2 A et B). L'ensilage DpH4 est inoculé au taux préconisé par le fabricant ( $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS). On n'observe pas au cours de cette fermentation, le même développement des bactéries lactiques (Figure 5.2 C). Après 6 jours d'ensilage, elles atteignent le taux de  $10^6$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS. Dans tous les cas, le nombre des bactéries lactiques décroît après 10 jours pour se stabiliser vers  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS.

Les populations dominantes de la pulpe de café sont les bactéries aérobies qui se développent au cours des deux premiers jours puis elles disparaissent en laissant la place aux bactéries lactiques pour les ensilages PC et A6. Par contre, pour l'ensilage DpH4, elles restent dominantes.

Le nombre des bactéries totales suit l'évolution des bactéries lactiques et on retrouve en fin d'ensilage le même nombre qu'au début. Elles restent donc viables. Cela se vérifie principalement sur l'ensilage inoculé par DpH4.

### 5.2.2 - Les paramètres physico-chimiques en fin d'ensilage

Nous avons suivi au cours de ces fermentations différents paramètres : l'humidité, la perte de poids, le pH, les AGV, les alcools, les sucres réducteurs. Les résultats initiaux et finaux sont présentés dans le tableau 5.5.

**Tableau 5.5 : Principaux paramètres avant et après ensilage de la pulpe de café**

Paramètres		Pulpe initiale	Témoin	Ferments		
				Pied de cuve	<i>L. plantarum</i> A6	DpH4
Durée de l'ensilage	mois		2	1	1	1
Humidité initiale	%		62,65	66,76	66,64	66,47
Humidité finale	%		61,63	66,78	66,78	66,19
pH initial			4,44	4,26	4,25	4,37
pH final			3,90	3,91	3,92	4,11
Perte de poids	% PMS	-	0,80	1,73	1,41	0,38
Acide lactique	% PMS	0,00	2,39	3,35	2,14	0,08
Acide acétique	% PMS	0,00	0,29	0,68	0,48	0,05
Acide butyrique	% PMS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sucres réducteurs totaux	% PMS	4,72	4,85	4,56	3,67	8,32
Glucose	% PMS	0,73	2,03	1,69	1,56	1,54
Fructose	% PMS	4,19	2,55	1,52	2,06	4,19
Ethanol	% PMS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Caféine	% PMS	1,00		1,02	0,93	0,90

Quelque soit le type de ferment utilisé, l'humidité du produit ensilé n'évolue que très peu au cours du temps. La perte de matière sèche est dans tous les cas inférieure à 2 %. Nous n'avons pas observé d'écoulement de jus et le taux de caféine n'a pas diminué.

La pulpe de café est naturellement un substrat acide dont le pH initial est proche de 4.3. Par conséquent au cours de l'ensilage, on ne note qu'une faible diminution des valeurs de pH. Les valeurs finales sont inférieures à 4.0, exception faite pour l'ensilage réalisé avec DpH4 (pH final = 4,11).

Les analyses par HPLC des échantillons de pulpe ensilée ont révélé une quantité importante d'acide lactique (supérieure à 2 % PMS) dans tous les cas sauf pour DpH4. On observe aussi la production d'une faible quantité d'acide acétique (inférieure à 0,7 % PMS) mais pas d'acide butyrique ni d'éthanol.

Le fructose et le glucose sont les principaux sucres réducteurs de la pulpe de café comme cela a déjà été démontré par ZULUAGA (1981). Cependant, on note que la quantité de glucose en fin d'ensilage est généralement plus élevée. Cela serait dû à l'hydrolyse des polysaccharides pariétaux. La concentration en fructose diminue mais son pourcentage en fin d'ensilage est encore significatif.

Dans le cas de l'ensilage inoculé par DpH4, la quantité finale d'acide lactique est très faible, de même que pour l'acide acétique ; la valeur du pH a diminué légèrement, et on n'observe pas de production d'acide butyrique, ni d'éthanol. L'aspect du produit ensilé est satisfaisant. La quantité finale de sucres réducteurs totaux est beaucoup plus importante que dans les autres ensilages. Cette concentration en sucres réducteurs provient sûrement de l'activité du complexe enzymatique cellulasique contenu dans le DpH4. En effet, les conditions de l'ensilage (pH acide, contact cellulases-substrat, température) sont très favorables et proches de l'optimum des activités cellulasiques.

D'après l'ensemble de ces résultats, on constate que les ensilages obtenus avec l'addition d'un pied de cuve ou de bactéries lactiques *L. plantarum* A6 sont très similaires. Par contre, l'ensilage réalisé avec le ferment commercial DpH4 a évolué de manière très différente (absence d'acide lactique corrélée à un faible développement des bactéries lactiques). On peut supposer qu'il y a eu un antagonisme entre les populations de microorganismes impliquées, qui aura même empêché le développement de la population endogène de bactéries lactiques. De ce fait, il n'y a pas eu accumulation d'acide lactique. Par contre, les enzymes cellulasiques contenues dans le ferment DpH4 ont hydrolysé les hémicelluloses et une partie de la cellulose de la pulpe, en libérant des sucres réducteurs.

D'autre part, il est probable que le taux d'inoculation du DpH4 ( $10^5$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS) est trop faible pour le type de substrat que nous utilisons. Dans la suite de nos expériences, nous testerons des concentrations de ferment DpH4 plus élevées et nous vérifierons que lorsque la pulpe de café est inoculée par une suspension de DpH4 contenant  $10^8$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS, l'ensilage est alors optimal (§ 7.2).

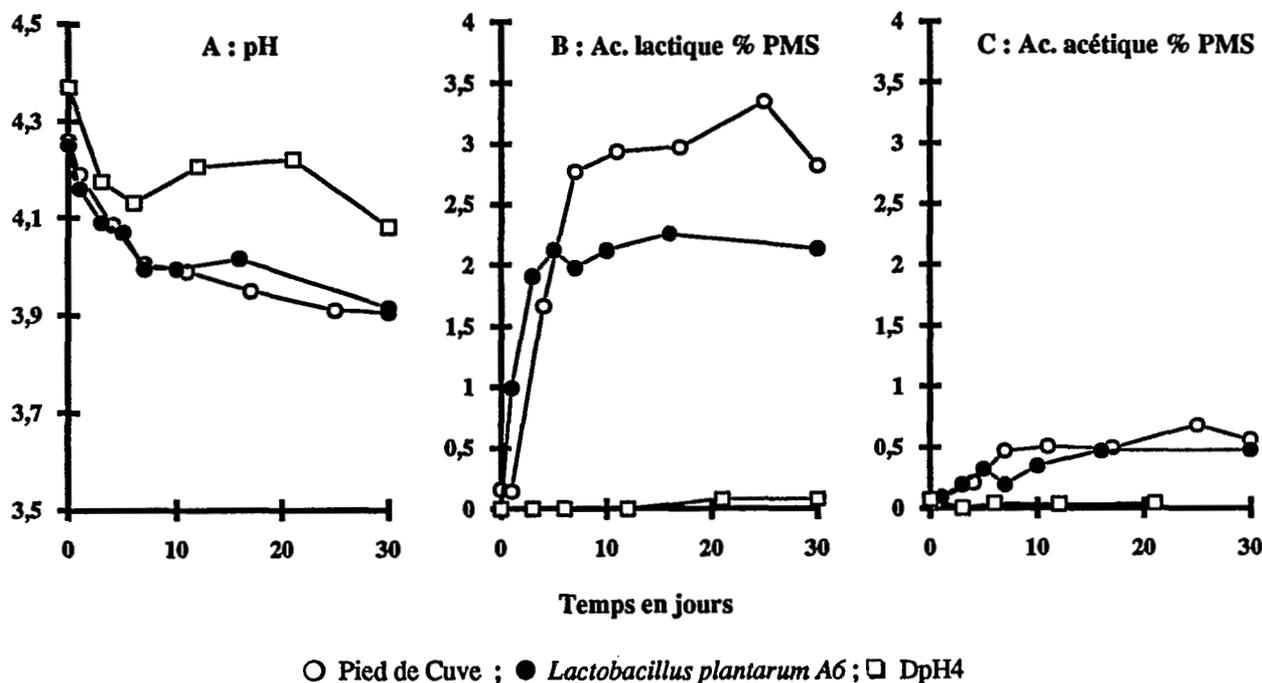
### 5.2.3 - Cinétiques des paramètres physico-chimiques

Les cinétiques d'évolution du pH, des acides lactique et acétique, du glucose et du fructose, principaux sucres de la pulpe de café, sont présentés sur les figures 5.3 et 5.4. Elles permettent de comparer les effets des différents ferments.

Dans le cas d'une inoculation de la pulpe de café par un pied de cuve ou par *L. plantarum* A6, la diminution du pH est rapide et se stabilise vers le 7ème jour à un pH inférieur à 4.0 (Figure 5.3 A). La production d'acide lactique est rapide, elle est maximale dès le 3ème jour dans le cas de A6 (environ 2,2 % PMS), dès le 7ème jour pour le pied de cuve (Figure 5.3 B) mais le taux atteint par ce dernier est le plus élevé (environ 3 % PMS).

La différence de temps peut s'expliquer par la différence des taux d'inoculation en bactéries lactiques au début de ces deux ensilages. Les quantités d'acide acétique augmentent au cours des premiers jours et se stabilisent à des valeurs avoisinantes 0,5 % PMS (Figure 5.3 C).

Les cinétiques (Figure 5.3) confirment qu'il n'y a pas eu ni production, ni accumulation d'acide lactique au cours de l'ensilage inoculé par DpH4 ; de même pour l'acide acétique. Le profil de pH est cependant cohérent avec un profil d'ensilage.



**Figure 5.3 : Evolution du pH, de l'acide lactique et de l'acide acétique au cours d'ensilages de pulpe de café inoculée par trois ferments lactiques différents.**

Les concentrations en sucres solubles, dans de nombreux ensilages, diminuent en même temps que le pH. Dans la pulpe de café séchée, les sucres réducteurs totaux, dosés par la méthode au DNS, ont été estimés à 4,72 % PMS (Tableau 5.5). Initialement, pour les trois ensilages, le glucose plus le fructose, estimés par HPLC, représentent environ 5 % PMS (Figure 5.4 A). Ces deux sucres sont donc bien les principaux sucres présents dans la pulpe.

Dans le cas de l'ensilage inoculé par le pied de cuve, on observe une consommation rapide du fructose corrélée à la diminution du pH (Figure 5.4 C). Cette consommation est plus tardive dans le cas d'une inoculation par A6. Dans les deux cas, le taux de glucose varie peu en début de fermentation, il augmente légèrement après 12 jours d'ensilage (Figure 5.4 B). Après 1 mois d'ensilage, le glucose plus le fructose sont estimés à 3,5 % PMS pour les deux ensilages, PC et A6 (Figure 5.4 A). Or, le dosage des sucres réducteurs totaux donne 4,56 % PMS pour PC et 3,67 % PMS pour A6 (Tableau 5.5). Il y a donc eu accumulation d'un ou de plusieurs autres sucres réducteurs dans le cas de l'ensilage inoculé par le pied de cuve.

Lorsque la pulpe de café est inoculée par DpH4, on note une augmentation rapide des sucres solubles, due à l'augmentation du taux de fructose (Figure 5.4 C). Le taux de glucose augmente légèrement après 20 jours d'ensilage (Figure 5.4 B). Après 1 mois de fermentation, le glucose plus le fructose représentent environ 6 % PMS (Figure 5.4 A). Les sucres réducteurs totaux sont estimés à 8,32 % PMS (Tableau 5.5). Comme dans le cas du pied de cuve, il y a eu accumulation d'autres sucres réducteurs. La concentration importante de sucres réducteurs dans cet ensilage s'explique par la présence de cellulases dans le ferment.

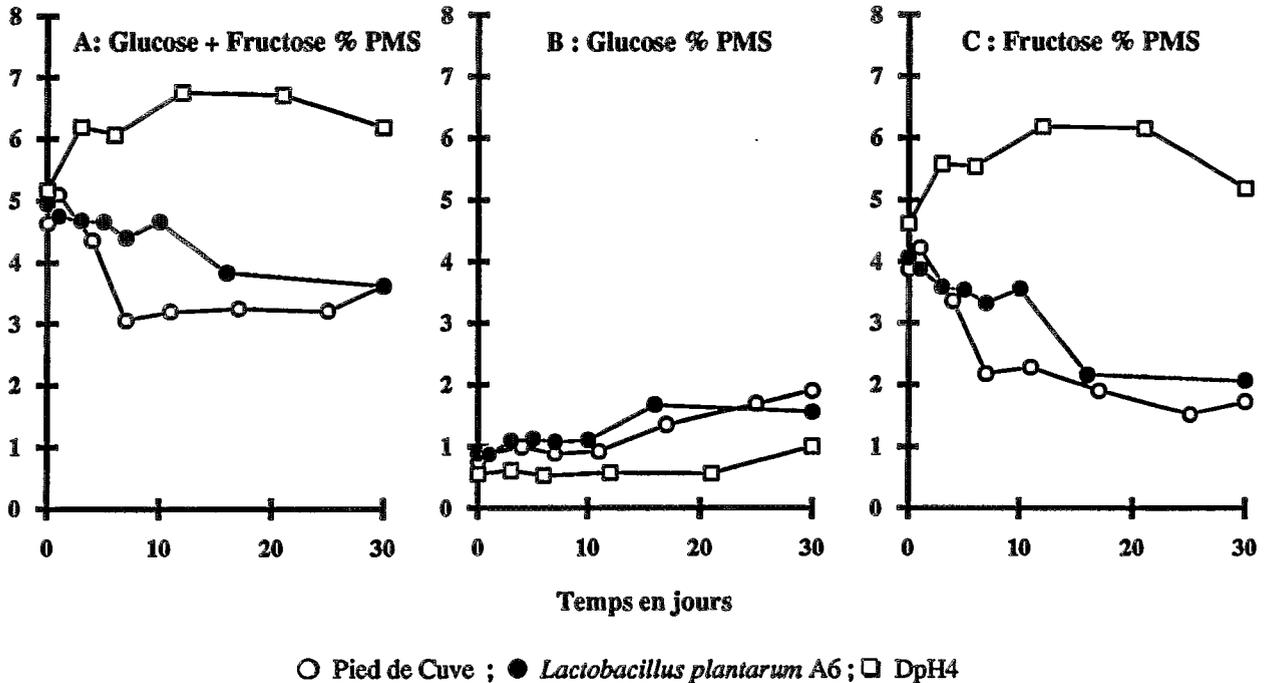


Figure 5.4 : Evolution des sucres réducteurs (glucose et fructose) au cours d'ensilages de pulpe de café inoculée par trois ferments lactiques différents.

### 5.3 - Discussion

L'ensemble des résultats ainsi que l'observation macroscopique des produits finaux, nous permettent d'affirmer que dans le cas des inoculations par Pied de Cuve et par *L. plantarum* A6, les ensilages de pulpe de café ont donné des résultats satisfaisants :

- la teneur en matière sèche est supérieure à 30 % ;
- la perte de poids en matière sèche est faible ;
- les teneurs en acide lactique sont importantes ;
- les teneurs en acide acétique sont faibles ;
- il n'y a pas de production d'acide butyrique ;
- le pH est inférieur à 4 ;
- la pulpe garde son aspect original.

La réussite d'un ensilage par apport d'un additif biologique lors de la mise en silo, dépend de nombreux facteurs tels que le type et la nature du substrat ensilé, les conditions climatiques, la microflore endogène, la technique d'ensilage utilisée et les propriétés du ferment (HENDERSON et McDONALD, 1984). La connaissance du nombre et de la nature de la microflore lactique endogène initiale est nécessaire pour comprendre l'effet et orienter l'inoculation (PAHLOW, 1991).

L'effet positif de l'inoculation par des bactéries lactiques a été démontré par de nombreux auteurs lorsque le nombre initial de bactéries lactiques endogène est considéré comme faible, entre  $10^2$  et  $10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS (WEINBERG et coll., 1993).

Des études réalisées sur l'influence de la concentration en cellules bactériennes de l'inoculum (*L. plantarum*) sur la vitesse d'acidification et l'abaissement du pH dans des ensilages de fétuque (graminée des prés et des bois) et de rye-grass (fourrage de seigle) ont révélées que des doses de  $10^7$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS et de  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS respectivement sont nécessaires afin d'obtenir des résultats satisfaisants en raison d'une flore autochtone importante à la mise en silo (GOUET, 1994). En général, le nombre de bactéries minimum préconisé pour l'ensilage est de  $10^5$  bactéries par gramme de végétal vert pour une concentration en sucres fermentescibles de 12 % PMS (BERTIN et HELTINGS, 1985).

Dans le cas de la pulpe de café séchée au soleil, réhydratée, puis ensilée dans des silos de laboratoire, on peut dire que l'influence de l'inoculation par un ferment composé d'une seule souche (*L. plantarum* A6) est peu significative par rapport à l'ensilage naturel et surtout par rapport à une inoculation par un pied de cuve. L'intérêt réside principalement dans la dominance et l'homogénéité de la population lactique, imposées par le taux d'inoculation très important (dans notre cas  $10^8$  bactéries A6.g<sup>-1</sup> PMS contre  $10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS par le pied de cuve). L'inoculation massive par des bactéries lactiques permet une production d'acide lactique plus rapide et de ce fait un abaissement du pH.

La microflore endogène totale de la pulpe de café avoisine  $10^7$  microorganismes.g<sup>-1</sup> PMS lors de la mise en silo. Lorsque les taux d'inoculation en bactéries lactiques sont faibles, cette microflore peut représenter un sérieux handicap. Cela explique peut être l'échec relatif de l'ensilage inoculé par le ferment commercial DpH4 au taux préconisé par le fabricant soit  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS. Le faible développement des bactéries lactiques (endogènes et inoculées) serait dû à un antagonisme entre ces différentes populations. En effet, la microflore de cet ensilage reste dominée par les bactéries non lactiques (Figure 5.2 C).

La microflore lactique endogène à la pulpe de café est une microflore hétérogène. Le taux d'inoculation par le pied de cuve est faible ( $1,5 \cdot 10^4$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS). Cependant, il est probable que la réussite de cet l'ensilage réside dans le fait que l'on introduit des souches performantes naturellement sélectionnées et adaptées au substrat ; ce qui n'est pas le cas pour le ferment DpH4 normalement prévu pour inoculer des ensilages de maïs en zones tempérées.

Dans le cas de la fermentation du chou, les essais d'ensemencement par diverses souches pures n'améliorent pas sensiblement la fermentation. Lorsque l'on utilise un ensemencement naturel, la fermentation suit le principe d'une culture séquentielle. Additionner, au début de la fermentation, une culture constituée d'un seul microorganisme, équivaut à rompre le déroulement de la séquence et conduit à un produit fini dont les qualités organoleptiques sont différentes de celles résultant de la séquence normale. Cependant, l'addition de ferments (*L. plantarum*) est utilisée dans d'autres cas, comme par exemple pour les olives afin d'accélérer l'acidification (VAUGHIN, 1975). Il en est de même pour les cornichons (ETCHELLS et coll., 1975). Dans la conservation des haricots en saumure, on cherche à favoriser la prédominance des espèces hétérofermentaires strictes pour éviter une trop forte acidité (CHEN et coll., 1983). L'addition de ferments permettrait donc de mieux maîtriser les procédés et de prévenir les accidents de fermentation (FLEMING et McFEETERS, 1981).

L'évolution des acides est un indicateur de la réussite d'un ensilage. Les concentrations en acide lactique doivent être comprises entre 3 et 13 % (CATCHPOOLE et HENZELL, 1971). La production d'acide lactique doit se faire dans les premiers jours et atteindre son taux maximal vers le 6<sup>ème</sup> jour (LUIS et RAMIREZ, 1985), puis évoluer vers une stabilisation.

Nous retrouvons ce profil d'évolution de l'acide lactique dans les deux ensilages PC et A6, lié à une évolution inverse du pH. L'acide acétique serait un agent anti-myotique et inhiberait le développement des levures et des champignons (MOON, 1983). La présence d'acide acétique dans les ensilages aurait donc un effet positif. L'absence d'acide propionique et d'acide butyrique confirme que la microflore lactique endogène strictement hétérofermentaire est minoritaire.

Un taux initial de glucides avoisinant les 12 % est nécessaire pour stabiliser un ensilage (DEMARQUILLY, 1985). Dans le cas de la pulpe de café, ce taux est relativement faible si l'on considère la quantité de sucres réducteurs directement fermentescibles (environ 5 % PMS) mais suffisant car le pH initial du produit est bas (4.3 environ). La quantité globale de ces sucres n'évolue pas vraiment au cours des ensilages, ils n'agissent donc pas comme un facteur limitant. La faible évolution du taux de sucres au cours des ensilages démontre que la production d'acide dépend de la dégradation des hémicelluloses, des pentosanes et d'autres complexes carbohydratés (DEWAR et coll., 1963 ; PETTERSSON et LINDGREN, 1990).

L'effet positif de la présence d'un complexe enzymatique composé de cellulases dans le ferment DpH4 est sensible même si cet ensilage ne s'est pas correctement déroulé. En effet, on observe une augmentation significative du taux des sucres réducteurs, substances privilégiées de la fermentation lactique. Nous approfondirons ce sujet au § 7.2.

Bien que le taux initial de sucres réducteurs de la pulpe de café soit relativement faible, il ne semble pas nécessaire d'ajouter à ce substrat des sources de sucres supplémentaires

telles que la mélasse comme cela a été souvent réalisé avec des résultats peu probants (MOLINA et coll., 1974b ; MURILLO, 1974 ; FERRER, 1984 ; PORRES et coll., 1993). Il semble plus souhaitable d'utiliser des ferments biologiques associant des bactéries lactiques à des complexes enzymatiques capables de dégrader les constituants de la paroi cellulaire du végétal.

Quelque soit le type de ferment utilisé, il n'y a pas eu dégradation de la caféine au cours des trois ensilages. On n'a pas observé d'écoulement de jus et les pertes de matière sèche ont été minimales (inférieures à 2 %). Ces résultats confirment que les diminutions des teneurs en caféine observées par certains auteurs au cours d'ensilage de pulpe de café (PORRES et coll., 1993) résultent de l'évacuation de ce composé soluble dans les liquides de drainage. En effet, lorsque les travaux sont réalisés sur de la pulpe pressée, les liquides de drainage sont peu importants et les taux de caféine ne varient pas de manière significative.

Des analyses préliminaires nous ont permis de vérifier qu'au cours de l'ensilage témoin, on observe une diminution importante du taux des composés phénoliques et plus particulièrement de l'acide chlorogénique. Ces premières observations sont en accord avec les résultats obtenus par DE MENEZES et coll. (1993), qui démontrent qu'en milieu liquide les bactéries lactiques sont capables de dégrader les tanins. Une étude plus approfondie de ce sujet fait partie des perspectives de ce travail.

#### 5.4 - Conclusion

L'ensilage naturel de pulpe de café a permis de démontrer la présence d'une microflore lactique endogène relativement importante ( $10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS à la mise en silos,  $2.10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS après deux mois d'ensilage). Cette microflore appartient principalement au genre *Lactobacillus*. Ces microorganismes sont particulièrement résistants ( $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS après séchage de la pulpe au soleil pendant 10 jours, puis stockage à 10 % d'humidité et à l'obscurité pendant 2 ans environ). Cette microflore viable et hétérogène s'exprime dès que les conditions environnementales (anaérobiose et humidité) sont favorables.

Après deux mois d'ensilage naturel, le bilan chimique donne les résultats suivants : la teneur en acide lactique est correcte (2,4 % PMS) ; la teneur en acide acétique est faible (0,3 % PMS) ; il n'y a eu de production d'acide butyrique, ni d'éthanol ; le pH est de 3.9 ; on observe une conservation des sucres réducteurs ; pas de perte de matière sèche (0,80 % PMS). Il s'agit de résultats parfaitement acceptables. Le métabolisme fermentaire dominant est de type hétérofermentaire facultatif c'est-à-dire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique mais pas d'acide butyrique, ni d'éthanol.

Nous avons d'autre part étudié les effets de l'apport de trois ferments lactiques différents (Pied de cuve ; *L. plantarum* A6 ; Ferment commercial DpH4) sur l'ensilage de la pulpe de café. Les ensilages de pulpe de café sont satisfaisants dans le cas des inoculations par le Pied de cuve et par *L. plantarum* A6. Cependant, l'influence de l'inoculation par un ferment composé d'une seule souche (*L. plantarum* A6) est peu significative par rapport à l'ensilage naturel. L'intérêt réside dans la dominance et l'homogénéité de la population lactique imposées par le fort taux d'inoculation ( $10^8$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS). Par le pied de cuve, on introduit des souches performantes naturellement sélectionnées et adaptées au substrat, bien que le taux d'inoculation soit relativement faible ( $1,5.10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS).

L'ensilage inoculé par le ferment commercial DpH4 au taux préconisé par le fabricant ( $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS) a donné des résultats peu probants (pas de production d'acide lactique et faible développement des bactéries lactiques). On observe cependant, un effet positif de la présence du complexe cellulastique dans le ferment DpH4 par l'augmentation du taux des sucres réducteurs, substances nécessaires à la fermentation lactique.

Ces expériences ont permis de démontrer qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter les ensilages de pulpe de café avec des sources extérieures de sucres. En effet, bien que le taux initial de sucres directement fermentescibles dans la pulpe de café soit relativement faible (5 % PMS) par rapport au taux préconisé dans la littérature (12 à 13 %), on observe une conservation du taux de ces sucres au cours des ensilages. La production d'acide dépend donc de la dégradation des constituants des parois cellulaires du substrat, d'où l'intérêt d'utiliser des ferments lactiques associés à des complexes enzymatiques.

Enfin, on observe que la caféine n'est pas dégradée quelque soit le type d'ensilage réalisé.

**DECAFEINATION**  
**DE LA PULPE DE CAFE**

## 6 - DECAFEINATION DE LA PULPE DE CAFE

Au cours des chapitres précédents, nous avons démontré que la microflore endogène de la pulpe de café est très importante (environ  $10^8$  microorganismes par gramme de matière sèche). Cette microflore évoluant rapidement, nous avons utilisé la technique de l'ensilage pour stabiliser et conserver ce substrat. Nous avons étudié, dans un premier temps, l'ensilage naturel de la pulpe, puis déterminé l'influence de l'apport de ferments lactiques sur cet ensilage. Il s'avère qu'après un mois de fermentation, on obtient des produits stabilisés dont le pourcentage en caféine n'a pas diminué. Or, dans la mesure où l'on souhaite utiliser la pulpe de café ensilée en alimentation animale, il est nécessaire de la détoxifier au préalable.

L'ORSTOM et la UAM d'Iztapalapa à Mexico ont initié en 1984 des recherches visant à utiliser les techniques de FMS comme alternatives pour améliorer la qualité nutritionnelle des produits et sous-produits tropicaux dont la pulpe de café, en sélectionnant des souches de champignons filamenteux, non pour leur capacité à synthétiser des protéines, mais pour leur potentialité à dégrader des substances toxiques spécifiques (AQUIAHUATL et coll., 1988 ; ROUSSOS et coll., 1989 ; VINIEGRA-GONZALEZ et coll., 1991).

Huit souches de champignons filamenteux ont été présélectionnées pour leur haute capacité à dégrader la caféine (de 90 à 100 % en fermentation liquide) ; il s'agit de 2 *Penicillium* et de 6 *Aspergillus*. Tous ces champignons ont été isolés initialement à 25 °C. Une étude physiologique a été réalisée sur ces 8 souches : rendement de sporulation, croissance apicale, temps de germination, pH minimum de croissance, taux de dégradation de la caféine (§ 2.4.2.2). A partir de ces résultats et de travaux antérieurs, une souche de *Penicillium* a été retenue pour des études visant à déterminer les conditions optimales de fermentation en milieu solide (§ 2.4.2.3).

Le but de la présente étude est de tester ces huit souches de champignons filamenteux en FMS sur de la pulpe de café dans des conditions identiques. L'objectif est de sélectionner un ou plusieurs microorganismes capable de dégrader la caféine de la pulpe avant sporulation de manière à pouvoir le tester par la suite en association avec le procédé d'ensilage. Nous rechercherons d'autre part un facteur corrélé à la dégradation de la caféine et à la sporulation des souches facilement mesurable au cours de la fermentation.

Dans un deuxième temps, nous utiliserons la méthode des plans d'expériences pour définir et optimiser les principaux facteurs intervenant au cours de la fermentation de décaféination de la pulpe de café par le champignon sélectionné sachant que l'on cherche à obtenir un pourcentage de caféine inférieur à 0,2 % avant la sporulation de la souche.

## 6.1 - Description morphologique des souches retenues en boîte de Pétri

Le tableau 6.1 présente la description morphologique des 8 souches de champignons cultivées en boîte de Pétri sur un milieu pulpe de café à 25 °C.

**Tableau 6.1 : Description morphologique des 8 souches de champignons filamenteux cultivés en boîte de Pétri à 25 °C**

Souches	Mycélium	Conidiophore	Structure Reproductrice	Conidies
<i>Penicillium</i> V26A25	lisse, septé, branché Ø ≈ 2 à 3 µ	lisse, long septé hyalins	Verticillés Métules L ≈ 13 µ Phialides ampouliformes 10 µ / 3 µ	hyalines, lisses Ø ≈ 4 µ vert-jaune clair
<i>Penicillium</i> V33A25	lisse, septé, branché Ø ≈ 2 à 3 µ	long, septé, marron Ø ≈ 2 µ	Verticillés Métules L ≈ 12 µ Phialides ampouliformes L ≈ 10 µ	rondes, hyalines, lisses Ø ≈ 6 µ ocre au centre
<i>Aspergillus</i> C16A25	septé, branché Ø ≈ 2 µ	long, lisse, hyalins Ø ≈ 12 µ	Tête aspergillaire, Ø ≈ 50 µ unisériée, radiée, verte Phialides ampouliforme L ≈ 12 µ	rugueuses, verruqueuses Ø ≈ 5 µ foncées
<i>Aspergillus</i> V12A25	septé, vacuolé peu ou pas branché Ø ≈ 3 µ	long Ø ≈ 8 µ	Tête aspergillaire, Ø ≈ 25 µ unisériée, non radiée Phialides forme bouteille L ≈ 15 µ	crénelées Ø ≈ 5 µ foncées
<i>Aspergillus</i> C17B25	fin, septé	hyalin	Tête aspergillaire, Ø ≈ 50 µ globuleuse, jaune-vert Phialides ampouliforme	échinulées Ø ≈ 5 µ marron
<i>Aspergillus</i> C11B25	fin septé peu branché		Tête aspergillaire, petite unisériée, non radiée	
<i>Aspergillus</i> C28B25	branché, septé Ø ≈ 2 µ	très long, hyalin devenant granuleux Ø ≈ 10 µ	Tête aspergillaire, Ø ≈ 40 µ unisériée, radiée Phialides L ≈ 5 µ	granuleuses Ø ≈ 3 à 4 µ brunes
<i>Aspergillus</i> C23B25	fin septé, peu branché Ø ≈ 2 µ	Ø ≈ 6 µ	Tête aspergillaire, Ø ≈ 40 µ unisériée, radiée Phialides ampouliformes L ≈ 12 µ	échinulées Ø ≈ 4 µ ± foncées

Ces observations sont en accord avec les descriptions faites par AQUIAHUATL (1992) et ont permis de confirmer qu'il s'agit bien des mêmes souches.

## 6.2 - Description de la croissance des souches en FMS sur pulpe de café

Toutes les fermentations ont été réalisées suivant le même protocole décrit au § 3.4.1. Nous rappelons ici les principales caractéristiques :

- Substrat initial stérile mélangé à une solution minérale sans azote ; inoculation au taux de  $2.10^7$  spores par gramme de substrat poids sec ; pH ajusté à 4,5 ; humidité initiale de 68 % environ ;
- Température du fermenteur contrôlée à 25 °C et aération établie à 60 ml. min<sup>-1</sup> par colonne.

Les paramètres suivis au cours des fermentations ont été :

- Toutes les cinq heures : l'humidité ; la perte de poids ; le pH ; le taux de caféine ; l'observation au microscope de l'évolution des microorganismes.
- Toutes les heures : les teneurs en CO<sub>2</sub> et en O<sub>2</sub> des effluents gazeux.

### 6.2.1 - L'observation microscopique

Les fermentations ont été suivies pendant 48 heures. Les observations microscopiques ont permis de suivre l'évolution du développement de chaque microorganisme au cours des fermentations sur pulpe de café et de déterminer l'heure de la sporulation de chaque souche testée (Tableau 6.2). Tous les microorganismes se sont développés de manière homogène dans chaque colonne.

**Tableau 6.2 : Développement morphologique des 8 souches au cours des FMS sur pulpe de café**

Souches	20 h	25 h	28 h	30 h	35 h	42 h	Sporulation
<i>Penicillium</i> V26A25	Mycélium bien développé			Début formation des pinceaux	Beaucoup de spores libres		32 H
<i>Penicillium</i> V33A25	Mycélium bien développé	Début formation des pinceaux		Quelques spores libres	Beaucoup de spores libres		30 H
<i>Aspergillus</i> C16A25	Mycélium bien développé	Formation des conidio-phores		Début tête conidienne Pas de spores libres	Nombreuses têtes conidiennes Beaucoup de spores libres		32 H
<i>Aspergillus</i> V12A25	Mycélium bien développé		Début tête conidienne Quelques spores libres		Nombreuses têtes conidiennes Beaucoup de spores libres		28 H
<i>Aspergillus</i> C17B25	Mycélium bien développé			Formation des conidiophores	Nombreuses têtes conidiennes Beaucoup de spores libres		32 H
<i>Aspergillus</i> C11B25				Mycélium bien développé		Début tête conidienne Quelques spores libres	42 h
<i>Aspergillus</i> C28B25	Mycélium bien développé			Début tête conidienne Pas de spores libres	Nombreuses têtes conidiennes Beaucoup de spores libres		32 H
<i>Aspergillus</i> C23B25	Mycélium bien développé	Mycélium bien développé		Début tête conidienne Quelques spores libres	Nombreuses têtes conidiennes Beaucoup de spores libres		30 H

La souche qui sporule le plus tôt est *Aspergillus* V12A25 (28 h) et celle qui sporule le plus tard est *Aspergillus* C11B25 (42 h). Les six autres souches sporulent après 30 ou 32 heures de fermentation.

### 6.2.2 - La respirométrie

L'adhésion intense des champignons filamenteux au substrat rend impossible l'estimation de la biomasse par les méthodes classiques (ROCHE et coll., 1993). Nous utiliserons la technique d'analyse et de suivi des gaz pour observer l'évolution de la croissance mycélienne d'une manière indirecte. Les teneurs en gaz carbonique et en oxygène, effluents de la fermentation solide, sont en effet directement liées à l'activité microbienne (RAIMBAULT, 1980 ; ORIOL, 1987 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991). Ces analyses de gaz permettent de suivre les différentes phases de fermentation *in situ*, en continu et de façon non destructive. La figure 6.1 présente les courbes de production de CO<sub>2</sub> au cours de la croissance des 8 champignons filamenteux ainsi que ces mêmes courbes exprimées en logarithme népérien. Ces courbes permettent de déterminer les temps de latence et d'estimer les activités respiratoires  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  ( $\Delta \ln \text{CO}_2 / \Delta t$ ) des différentes souches (Tableau 6.3).

**Tableau 6.3 : Récapitulatif des résultats obtenus par respirométrie**

Souches	Phase de latence en heures	$\alpha_1$ h <sup>-1</sup>	$\alpha_2$ h <sup>-1</sup>	CO <sub>2</sub> produit ml.g <sup>-1</sup> MSI
<i>Penicillium</i> V26A25	12,5	0,34	0,18	115
<i>Penicillium</i> V33A25	11,5	0,34	0,19	95
<i>Aspergillus</i> C16A25	13	0,30	0,13	100
<i>Aspergillus</i> V12A25	10,5	0,29	0,16	130
<i>Aspergillus</i> C17B25	17	0,34	0,17	65
<i>Aspergillus</i> C11B25	20	0,26	0,15	65
<i>Aspergillus</i> C28B25	11	0,30	0,13	100
<i>Aspergillus</i> C23B25	11	0,34	0,15	85

Après des phases de latence variant entre 10 et 13 heures sauf pour la souche C17B25 (17 h) et la souche C11B25 (20 h), on observe une phase d'accélération suivie d'une phase de croissance ( $\alpha_1$  variant de 0,26 à 0,34 h<sup>-1</sup>). Après cette phase exponentielle qui dure de 5 à 7 heures, on observe un changement de pente ( $\alpha_2$  variant de 0,13 à 0,19 h<sup>-1</sup>). Cette phase de ralentissement dure environ 15 heures. Elle est suivie d'une phase stationnaire correspondant à la sporulation des souches.

Les profils de croissance et les coefficients respiratoires observés ci-dessus sont similaires aux résultats obtenus par RAIMBAULT (1980) sur la croissance d'*Aspergillus niger* sur un substrat amylicé. Les temps de latence sur pulpe de café sont cependant plus longs.

Le suivi en continu de la croissance en milieu solide grâce à la mesure du CO<sub>2</sub> permet d'estimer le développement des microorganismes sur un même échantillon tout au long d'une période et cela sans apporter de perturbation au système. La mesure du CO<sub>2</sub> permet aussi de supprimer le problème d'homogénéité et de représentativité des prélèvements. Il est important de souligner la précision des mesures.

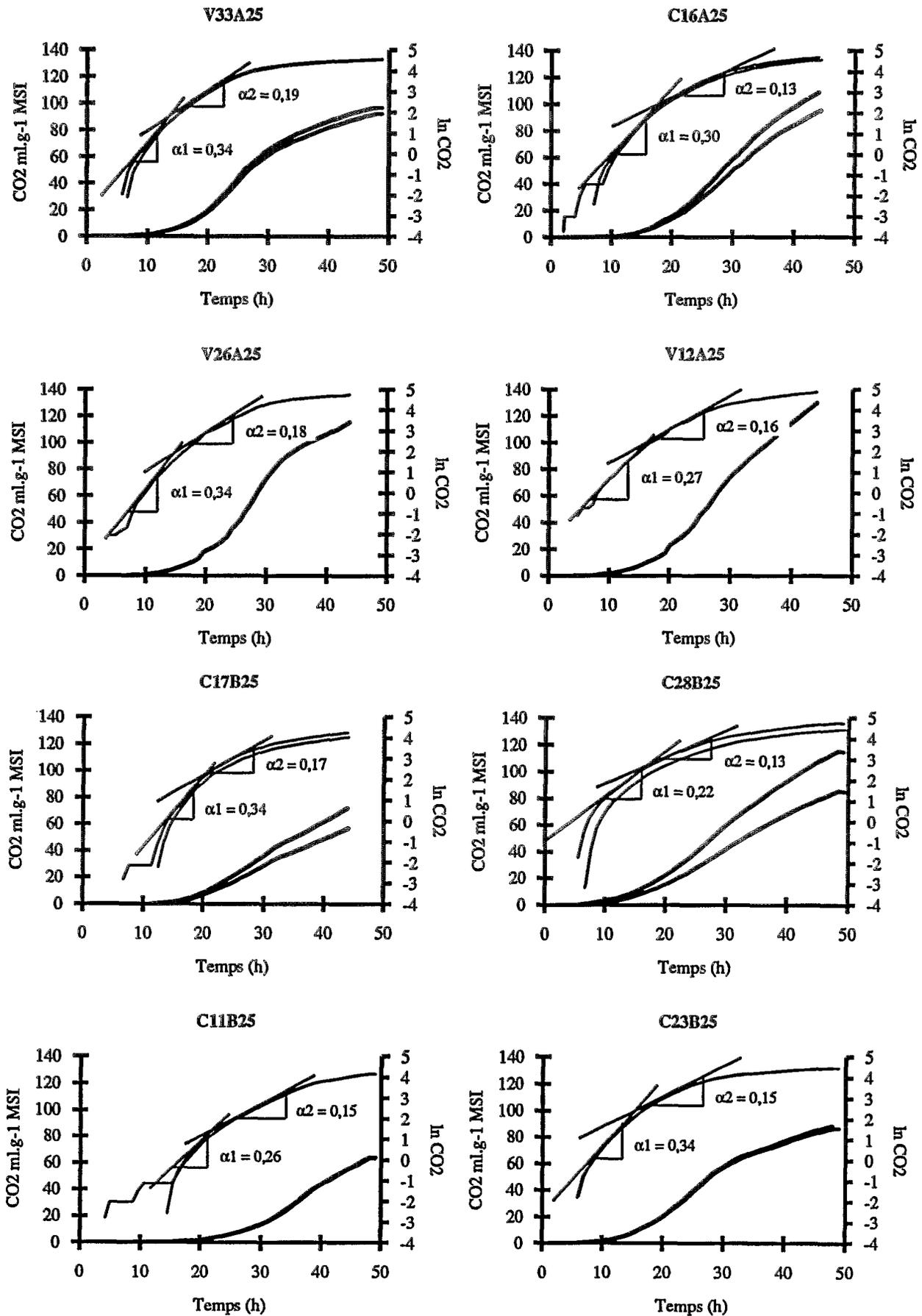
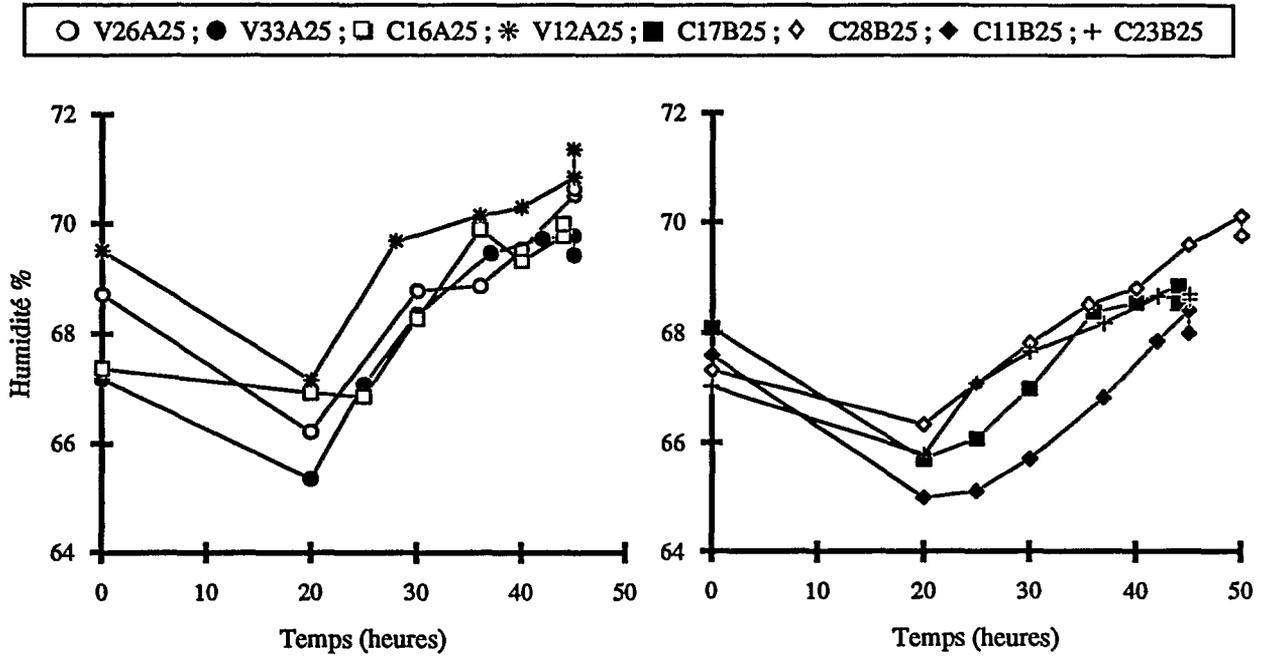


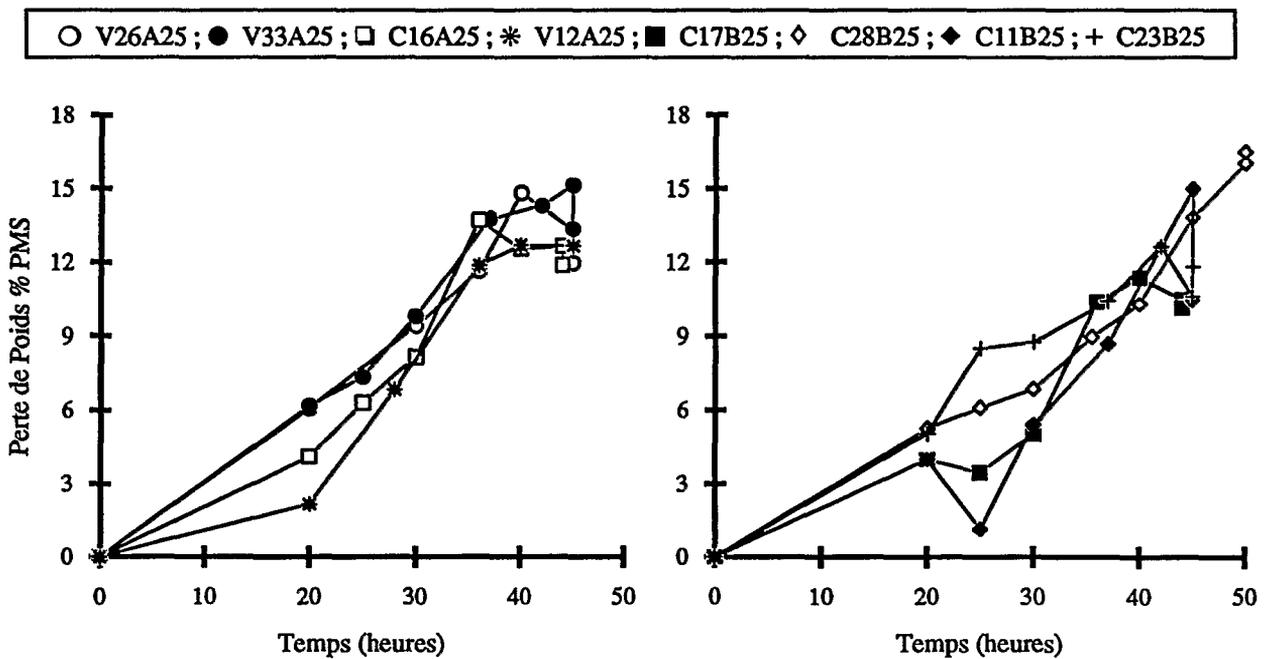
Figure 6.1 : Evolution du CO2 au cours de la croissance des souches de champignons filamenteux en FMS sur pulpe de café. (—) vitesses de production de CO2 ; (---) ln CO2. Les (↔) indiquent le début de la phase de sporulation.

### 6.2.3 - L'humidité et la perte de matière sèche

Les figures 6.2 et 6.3 présentent respectivement l'évolution de l'humidité de la pulpe de café et les pertes de poids en pourcentage de matière sèche au cours des FMS pour les 8 souches de champignons.



**Figure 6.2 :** Evolution de l'humidité de la pulpe de café au cours des 8 FMS



**Figure 6.3 :** Perte de poids en % de matière sèche au cours des 8 FMS

Les humidités initiales se situent entre 67 et 69 %. Les pourcentages diminuent légèrement au cours des vingt premières heures pour atteindre 66 % environ. Ce taux d'humidité serait donc celui qu'il faudrait instaurer en début de fermentation. Après 20 heures de fermentation, les taux d'humidité augmentent jusqu'à 68 - 70 % (phase de développement des microorganismes), puis se stabilisent (phase de sporulation). L'écart observé (65 à 71 %) n'est pas important et démontre que le système d'humidification de l'air est cohérent.

Les pertes de matière sèche sont corrélées avec le développement des microorganismes et la production de CO<sub>2</sub>. En fin de fermentation, le pourcentage de perte varie de 11 à 16 % suivant les souches.

### 6.2.4 - Le pH

Les profils de pH des différentes souches au cours des fermentations sont présentés sur la figure 6.4. Les valeurs de pH sont stables pendant les phases de germination et d'envahissement du substrat par le mycélium. Ces phases durent environ 20 heures sauf pour la souche C11B25 (30 heures environ).

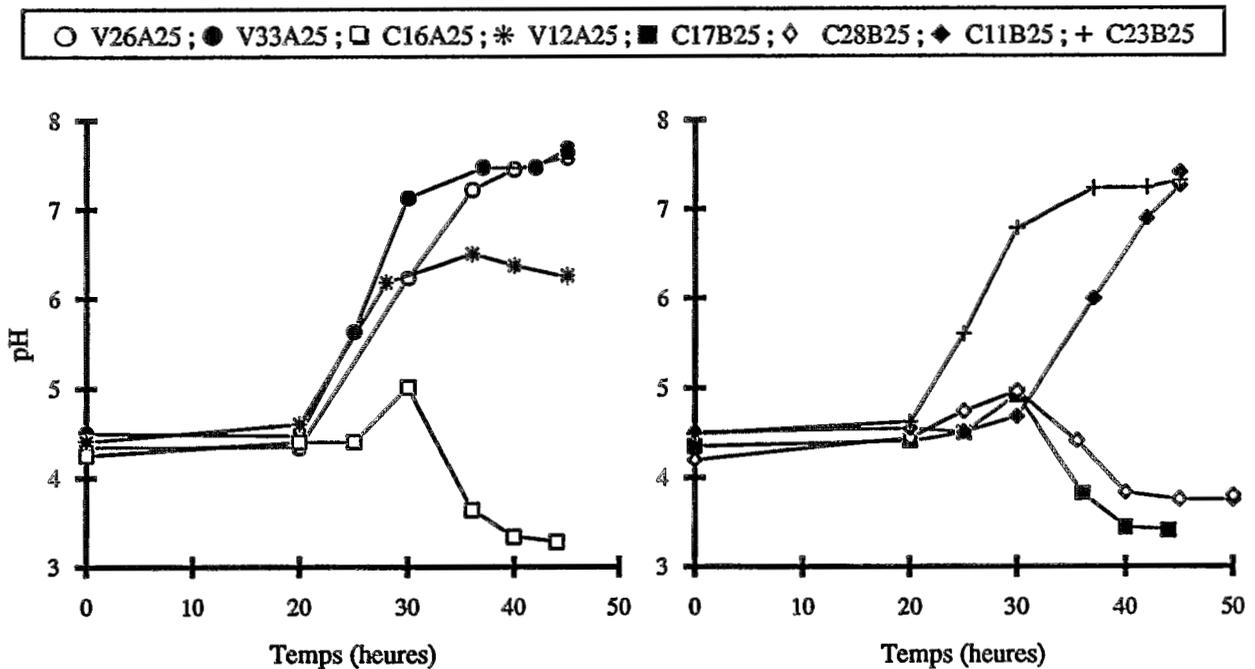


Figure 6.4 : Evolution du pH au cours des 8 FMS

Pour trois *Aspergillus*, C16A25, C28B25 et C17B25, le pH augmente très légèrement jusqu'à 5.0 vers 30 heures (phase de développement du mycélium). Ces trois souches sporulent à 32 heures, le pH décroît alors rapidement jusqu'à 3.2 environ.

Le pH des cinq autres souches augmente aussi au cours de la phase de développement du mycélium, mais de manière beaucoup plus significative, jusqu'à atteindre un pH de 7.2 au moment de la sporulation pour quatre d'entre elles. La souche V12A25, qui sporule le plus tôt (28 heures), se stabilise alors à pH 6.5.

Toutes les valeurs de pH se stabilisent lorsque que le processus de sporulation se déclenche. Cette étape implique l'arrêt du métabolisme du champignon et l'apparition d'une phase de dormance.

Il existe donc une corrélation entre le pH et le développement des microorganismes :

- germination et envahissement du substrat : pas d'évolution du pH ;
- développement du mycélium : augmentation du pH plus ou moins marquée selon les souches;
- sporulation : décroissance rapide du pH pour trois souches puis stabilisation ; augmentation légère pour les cinq autres puis stabilisation.

### 6.2.5 - La caféine

L'évolution des taux de caféine au cours des 8 FMS est présentée sur la figure 6.5. Toutes les souches dégradent totalement la caféine de la pulpe de café après la phase de germination et d'envahissement du substrat. Au cours de cette phase, d'autres sources d'azote plus accessibles que la caféine, seraient utilisées. Celle-ci est rapidement dégradée au cours de la phase de croissance du champignon. Lorsque la caféine s'épuise (taux inférieur à 0,1 % PMS), les microorganismes développent leurs formes de reproduction asexuée.

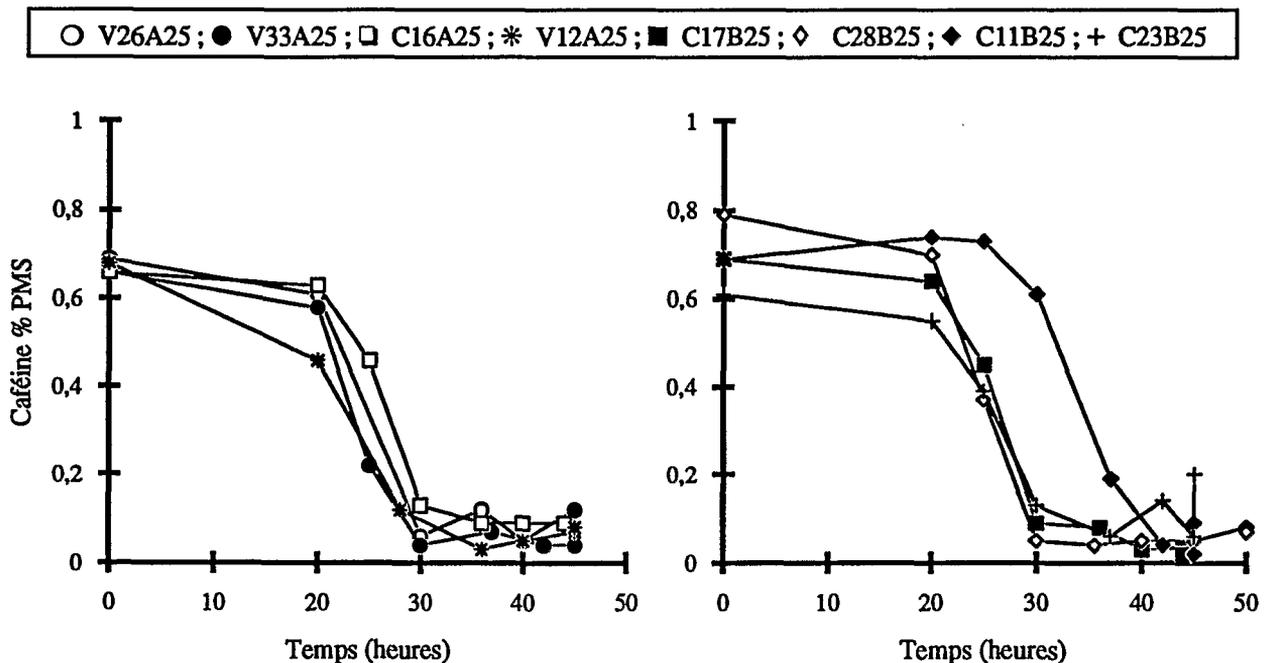


Figure 6.5 : Evolution des taux de caféine au cours des 8 fermentations

### 6.3 - Relations entre les différents paramètres de croissance et choix d'une souche

Nous avons déjà constaté que l'on pouvait établir une relation entre le développement morphologique des microorganismes et l'évolution du pH.

Nous avons aussi mis en évidence la corrélation entre la perte de matière sèche et la production de CO<sub>2</sub>, elle-même corrélée au développement des microorganismes.

Les figures 6.6 et 6.6 bis présentent l'évolution du pH, l'évolution du taux de caféine, la représentation sur le moniteur de CPG de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> et le début de la phase de sporulation des champignons.

On observe une corrélation entre l'évolution du pH et la dégradation de la caféine. En effet, le pH commence à augmenter lorsque débute la diminution du taux de caféine. Les valeurs du pH se stabilisent lorsque la caféine est complètement dégradée.

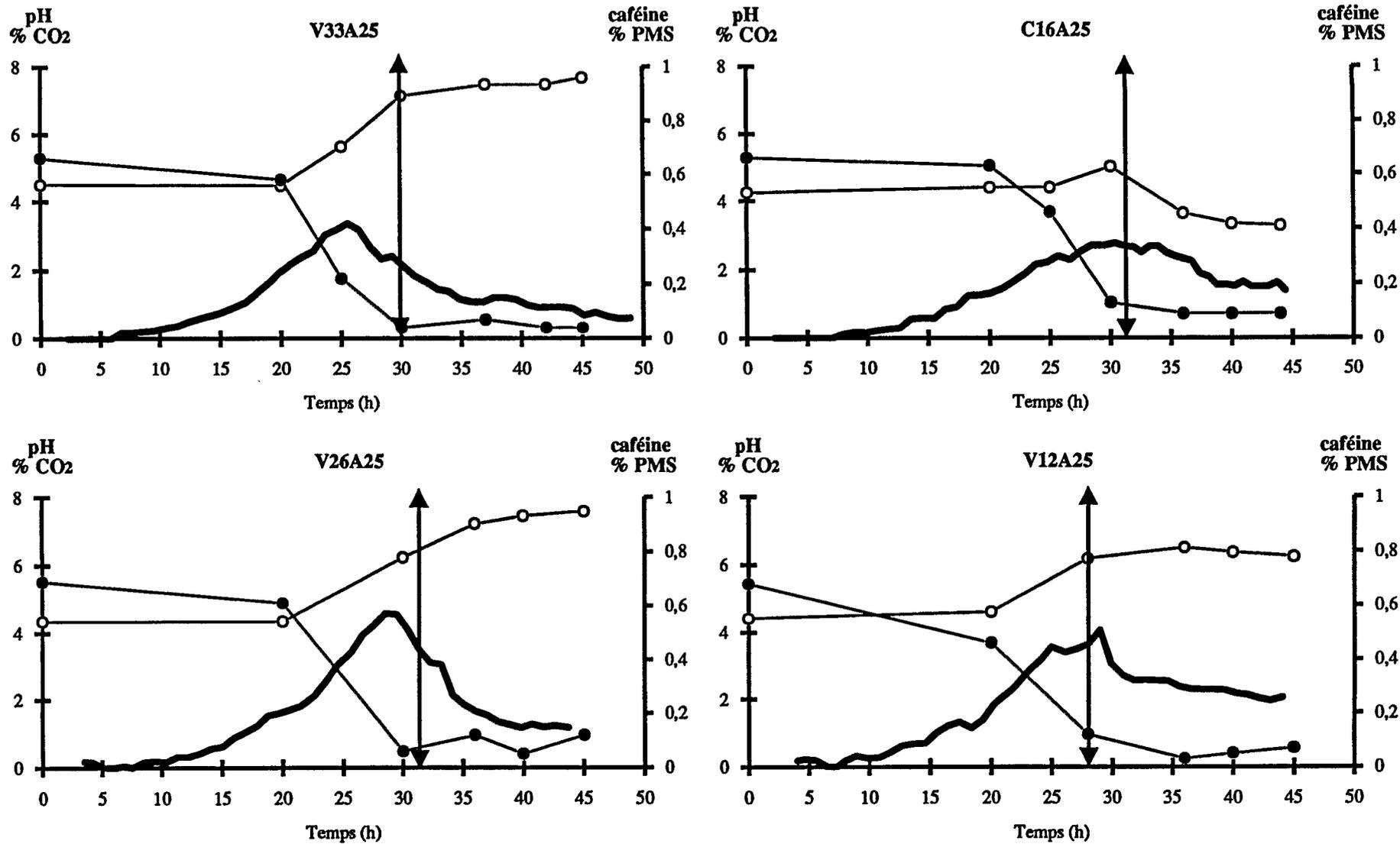
On observe, d'autre part, que le maximum de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> est généralement antérieur au moment de la sporulation (sauf pour V12A25).

Le tableau 6.4 regroupe les principaux critères de sélection pour les huit souches de champignons filamenteux étudiés.

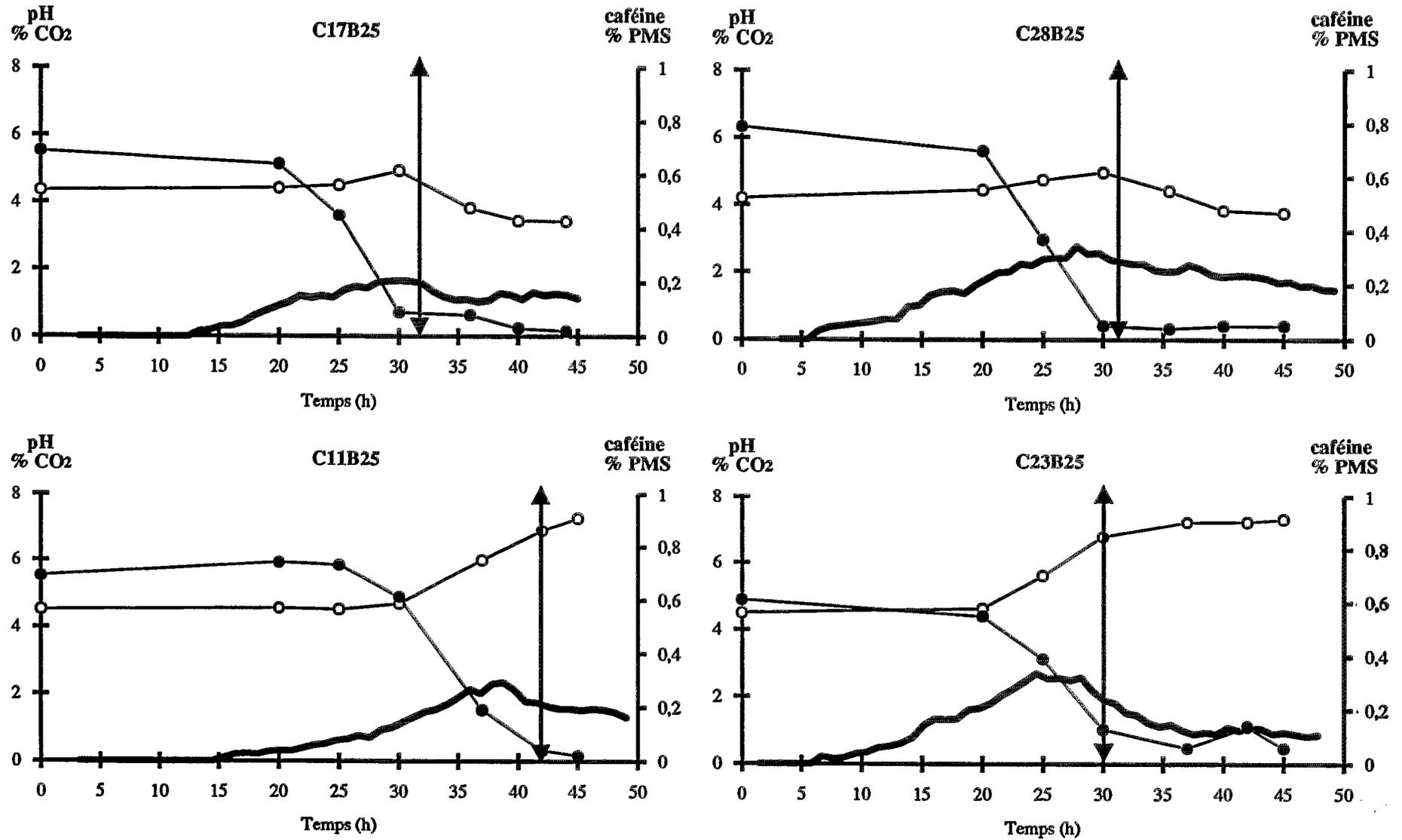
**Tableau 6.4 : Principaux critères pour sélectionner la meilleure souche capable de dégrader la caféine de la pulpe de café en FMS**

Souches	Rendement de sporulation spore.g <sup>-1</sup>	Croissance apicale mm.h <sup>-1</sup> à 25°C	Phase de latence en heures	α1 h <sup>-1</sup>	CO <sub>2</sub> produit ml.g <sup>-1</sup> MSI	Différence pH final - pH initial	Dégradation de la caféine % à 30 h	Début phase de sporulation
<i>Penicillium</i> V26A25	5,4 10 <sup>9</sup>	0,15	12,5	0,34	115	+ 3,24	91	32 h
<i>Penicillium</i> V33A25	9,3 10 <sup>9</sup>	0,14	11,5	0,34	95	+ 3,14	94	30 h
<i>Aspergillus</i> C16A25	1,2 10 <sup>9</sup>	0,24	13	0,30	100	- 0,97	80	32 h
<i>Aspergillus</i> V12A25	4,8 10 <sup>9</sup>	0,22	10,5	0,29	130	+ 1,85	82	28 h
<i>Aspergillus</i> C17B25	3,4 10 <sup>9</sup>	0,24	17	0,34	65	- 0,95	87	32 h
<i>Aspergillus</i> C11B25	8,8 10 <sup>10</sup>	0,16	20	0,26	65	+ 2,90	12	42 h
<i>Aspergillus</i> C28B25	8,8 10 <sup>9</sup>	0,19	11	0,30	100	- 0,41	94	32 h
<i>Aspergillus</i> C23B25	1,5 10 <sup>11</sup>	0,23	11	0,34	85	+ 2,83	79	30 h

Le premier objectif de ce travail est de sélectionner un ou plusieurs microorganismes capables de dégrader la caféine de la pulpe de café avant la phase de sporulation et ceci afin de pouvoir l'associer avec des bactéries lactiques au cours d'un procédé de stabilisation par ensilage.



**Figure 6.6 :** Profils du pH (○), du taux de caféine (●) et variation de la teneur en CO<sub>2</sub> (—) au cours de la croissance des souches de champignons filamenteux en FMS sur pulpe de café. Les (↔) indiquent le début de la phase de sporulation.



**Figure 8.6 bis** : Profils du pH (○), du taux de caféine (●) et variation de la teneur en CO<sub>2</sub> (—) au cours de la croissance des souches de champignons filamenteux en FMS sur pulpe de café. Les (↔) indiquent le début de la phase de sporulation.

Nous éliminerons, sur la base de cet objectif, les souches C16A25 et C23B25. En effet, lorsque ces souches sporulent, le taux de caféine est encore significatif par rapport aux autres souches (Figures 6.6 et 6.6 bis). Nous éliminerons aussi la souche C11B25 qui présente un temps de latence très long (20h) et un pourcentage de dégradation de la caféine à 30 heures très faible (Tableau 6.4). La souche V12A25 sporule très tôt (28 h) et présente donc peu d'intérêt pour la suite de ce travail.

Les souches V33A25 et C28B25 sont les plus intéressantes si l'on considère le taux de dégradation de la caféine à 30 heures, soit 94 %. Ces deux souches sporulent à 30 et 32 heures respectivement. Les phases de latence sont courtes (environ 11 heures). Le CO<sub>2</sub> produit et les coefficients respiratoires démontrent une bonne croissance de ces deux microorganismes sur pulpe de café (Tableau 6.4).

Le second objectif de cette étude est de rechercher un facteur corrélé à la dégradation de la caféine et à la sporulation des souches, facteur devant être facilement mesurable au cours de la fermentation.

Parmi les quatre souches V26A25, V33A25, C17B25 et C28B25, on observe, pour les deux *Aspergillus* C17B25 et C28B25, que le pH diminue lorsque le taux de caféine est inférieur à 0,2 % PMS et avant que les souches sporulent (Figure 6.6 bis). Cette observation est très intéressante si l'on considère l'objectif d'associer ces souches à des bactéries lactiques pour un procédé de stabilisation par ensilage. Pour *Penicillium* V33A25 (Figure 6.6) lorsque le taux de caféine devient inférieur à 0,2 % PMS, le pH se stabilise à 7.0 environ. Le phénomène est moins marqué pour *Penicillium* V26A25 (Figure 6.6). Cependant, il reste que ce facteur de pH nécessite d'effectuer des prélèvements au cours des fermentations.

La représentation graphique de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> que l'on peut visualiser sur un écran de moniteur tout au long de la fermentation sans effectuer de prélèvement est certainement le facteur le plus approprié. On remarque pour les deux *Penicillium* que le maximum de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> est largement antérieur à la sporulation des deux souches et correspond à des taux de caféine inférieurs à 0,2 % PMS (Figure 6.6). Les observations sont moins nettes en ce qui concerne les deux *Aspergillus* (Figures 6.6 et 6.6 bis).

Ainsi, parmi les deux souches potentiellement intéressantes, nous choisirons de continuer notre étude avec *Penicillium* V33A25. Ce microorganisme correspond aux critères recherchés et a déjà fait l'objet d'études physiologiques (§ 2.4.2). D'autre part, des travaux sur les voies de dégradation de la caféine utilisant ce champignon filamenteux se poursuivent dans notre laboratoire.

#### 6.4 - Influence des facteurs de culture sur la dégradation de la caféine de la pulpe de café par *Penicillium* V33A25

Le but de cette étude est de définir l'influence de certains facteurs essentiels pour la dégradation de la caféine de la pulpe de café par *Penicillium* V33A25 sachant que l'on cherche à obtenir un pourcentage de caféine inférieur à 0,2 % avant la sporulation de la souche.

La démarche classique pour optimiser des conditions de culture consiste à faire varier successivement chaque facteur, en maintenant les autres constants, ce qui conduit inévitablement à un nombre élevé d'expériences. L'utilisation de la méthode des plans d'expériences permet de déterminer l'influence simultanée des composants et des conditions de culture avec un nombre minimum d'essais.

##### 6.4.1 - Définition des facteurs essentiels et mise en place du plan d'expérience

Une matrice factorielle fractionnée,  $2^{k-p}$  (où  $k$  est le nombre de facteurs et  $2^p$  est le nombre de blocs du plan factoriel complet), a été mise en œuvre, afin de repérer les facteurs ayant un effet sur la FMS de *Penicillium* V33A25. Toutefois, par cette méthode, les interactions entre les facteurs restent confondues (DE MEO et coll. 1985).

L'effet des facteurs est modélisé sous forme de polynôme (DE MEO et coll., 1985) :

$$Y = b_0 + \sum b_i F_i$$

où  $Y$  est la réponse mesurée,  $b_0$  est un terme indépendant,  $b_i$  représente les coefficients correspondants aux différents facteurs testés ( $F_i$ ) et  $i$  est l'indice pour les différents facteurs.

Afin de comparer l'effet relatif des facteurs ( $a_i$ ) sur les différentes réponses, une transformation des polynômes est nécessaire. Elle est effectuée par rapport aux gradients normalisés des  $Y$  (HIMMELBLAU, 1969) :

$$\frac{\nabla Y}{\|\nabla Y\|}$$

où  $\nabla Y$  est le gradient de  $Y$  et  $\|\nabla Y\|$  est la taille du vecteur  $\nabla Y$ . Le calcul est le suivant :

$$\frac{\nabla Y}{\|\nabla Y\|} = \frac{\sum \left(\frac{\partial Y_i}{\partial F_i}\right)^{2i}}{\left[\sum \left(\frac{\partial Y_i}{\partial F_i}\right)^2\right]^{1/2}} = \frac{\sum b_i}{\left[\sum b_i^2\right]^{1/2}} = \sum a_i$$

Sept facteurs sont étudiés : l'ajout ou non d'une solution minérale contenant du potassium, du sodium du magnésium, des phosphates et des sulfates, l'éclairage, le débit d'air, la température, la stérilité ou non du substrat, la concentration en  $\text{CaCl}_2$  et le pH initial.

L'humidité initial du substrat est de 68 % environ, le taux d'inoculation est de  $2.10^7$  spores par gramme PMS.

Dans les tableaux 6.5 et 6.6 sont rassemblées les valeurs codées et réelles des différents facteurs testés.

**Tableau 6.5 - Matrice d'expériences avec les valeurs codées des différents facteurs**

Expérience No.	Niveau des facteurs						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1

**Tableau 6.6 - Relation entre les niveaux codés et les valeurs réelles des facteurs**

	Facteurs	Niveaux réels des facteurs	
		- 1	+ 1
F1	Solution Minérale	Sans	Avec
F2	Eclairage	Obscurité	Lumière
F3	Aération (ml.mn <sup>-1</sup> par colonne)	40	70
F4	Température (°C)	35	25
F5	Stérilité (Autoclavage)	Non	Oui
F6	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (g.l <sup>-1</sup> )	0,1	0,3
F7	pH	5,6	4,4

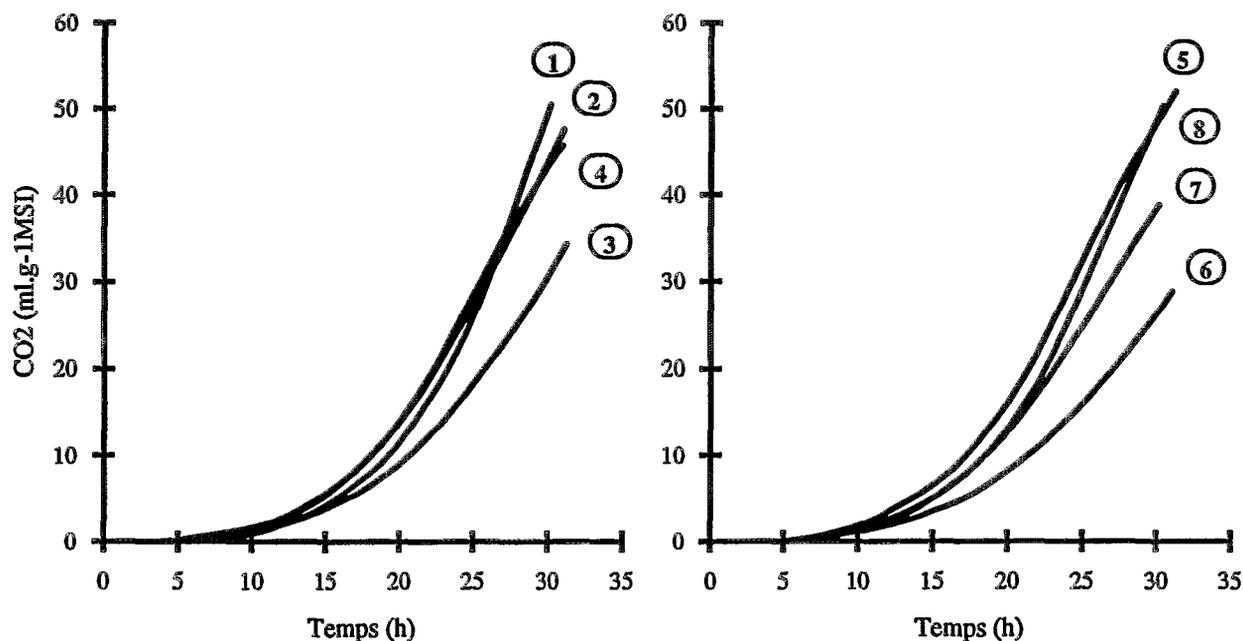
#### 6.4.2 - Résultats expérimentaux

Dans le tableau 6.7 sont réunies les réponses mesurées pour les différentes expériences.

**Tableau 6.7 - Résultats expérimentaux des réponses déterminées par le plan d'expérience.**

	pH final	Caféine à 29 h %	Sporulation	CO <sub>2</sub> formé ml.g <sup>-1</sup> MSI
1	7,18	0,45	31 h	50,5
2	5,71	0,91	> 32 h	44,2
3	5,63	0,95	> 32 h	31,4
4	6,77	0,24	< 26 h	45,8
5	6,84	0,19	28 h	49,3
6	5,52	0,95	> 32 h	34,5
7	5,91	0,96	32 h	38,9
8	6,70	0,23	30,5 h	50,3

L'effet des différents facteurs sur l'évolution du CO<sub>2</sub> au cours des fermentations est présenté dans la figure 6.7.



**Figure 6.7 - Evolution du CO<sub>2</sub> au cours de la croissance de *Penicillium V33-225* sur pulpe de café. Les numéros 1 à 8 correspondent aux conditions de culture données dans les tableaux 6.5 et 6.6**

#### 6.4.3 - Analyse des effets relatif des facteurs

L'effet relatif des facteurs (ai) sur la sporulation que l'on souhaite tardive, sur la dégradation de la caféine, sur la production de CO<sub>2</sub> ainsi que sur le pH final de la fermentation, que l'on espère moindre en vue d'associer cette souche à un procédé de conservation par ensilage, sont représentés sur la figure 6.8.

L'aération, le pH initial, la présence ou non d'une solution minérale contenant du potassium, du sodium, du magnésium, des phosphates et des sulfates ainsi que l'éclairage n'ont pratiquement aucune influence sur la dégradation de la caféine, sur la production de CO<sub>2</sub>, sur la sporulation et sur le pH final. On note qu'il est préférable d'augmenter la quantité de chlorure de calcium si l'on souhaite retarder la sporulation et favoriser la croissance. Il est intéressant d'observer que le facteur stérilité n'est pas un facteur majeur.

Le facteur majeur est la température. Si l'on souhaite une dégradation de la caféine liée à un bon développement du champignon, il est préférable de travailler à des températures avoisinantes 25 °C. Si l'on souhaite une sporulation tardive et un pH final bas, alors il semble souhaitable de travailler vers 35 °C. En effet, lorsque l'on observe les résultats du tableau 6.6, on remarque alors que pour toutes les expériences réalisées à 35 °C (2-3-6-7), il n'y a pas eu dégradation de la caféine, le pH final est inférieur à 6. Les courbes d'évolution du CO<sub>2</sub>

(Figure 6.7) et les observations microscopiques de ces quatre expériences montrent que le champignon se développe plus lentement et que pour trois d'entre elles aucune forme de reproduction n'existe à 32 heures de fermentation.

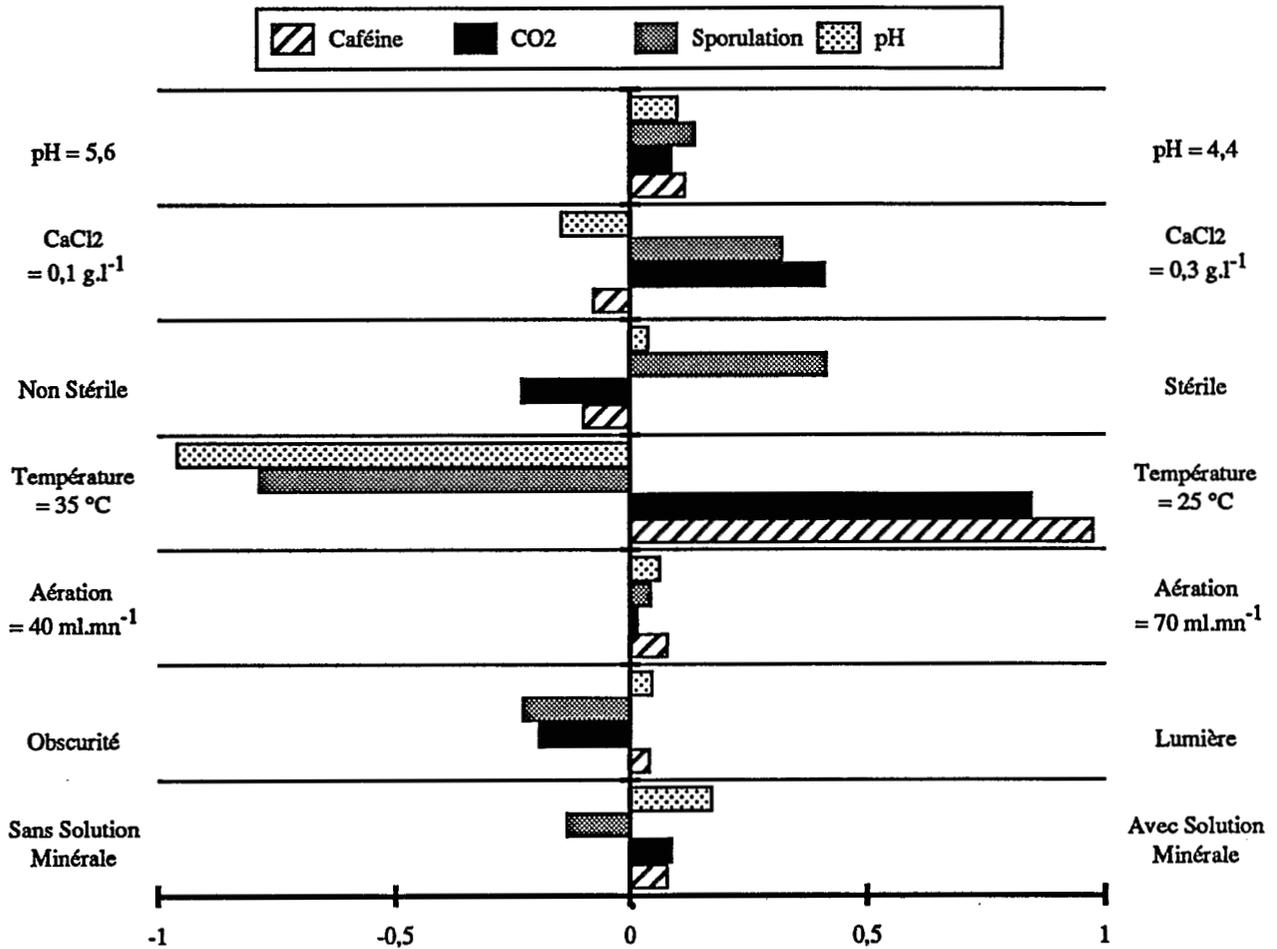


Figure 6.8 : Analyse graphique des effets des facteurs sur la dégradation de la caféine, sur la production de CO<sub>2</sub>, sur la sporulation et sur le pH final.

Les résultats obtenus à partir de ce plan d'expérience permettent d'affiner les conditions de fermentation pour *Penicillium V33A25*. Elles sont rassemblées dans le tableau 6.8.

Tableau 6.8 - Conditions optimales de fermentation pour V33A25 en FMS

Facteurs	Valeur
Solution Minérale	Indifférent
Eclairage	Indifférent
Aération	Entre 40 et 70 ml.mn <sup>-1</sup> par colonne
Température	25 °C
Stérilité (Autoclavage)	Indifférent
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,3 g.l <sup>-1</sup>
pH initial	Entre 4,4 et 5,6

## 6.5 - Conclusion

Parmi 8 souches de champignons filamenteux présélectionnées par ROUSSOS et coll. (1989), nous avons identifié 2 microorganismes capables de dégrader à 94 % la caféine de la pulpe de café en FMS et ceci avant de sporuler. Il s'agit d'une souche d'*Aspergillus* C28B25 et d'un *Penicillium* V33A25.

Nous avons d'autre part choisi la représentation graphique de la vitesse de production du CO<sub>2</sub> comme étant le facteur le plus approprié pour suivre en FMS la dégradation de la caféine. En effet, on peut visualiser cette représentation sur un écran de moniteur tout au long de la fermentation sans effectuer de prélèvements et donc sans perturber le milieu. Pour le *Penicillium*, le maximum de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> est largement antérieur à la sporulation et correspond à un taux de caféine inférieur à 0,2 % PMS.

Nous avons choisi de continuer notre étude avec *Penicillium* V33A25, cette souche ayant déjà fait l'objet de plusieurs études et correspondant aux critères recherchés.

L'utilisation de la méthode des plans d'expériences nous a permis de déterminer l'influence des facteurs essentiels pour la dégradation de la caféine de la pulpe de café par la souche *Penicillium* V33A25, sachant que l'on cherche à obtenir un pourcentage de caféine inférieur à 0,2 % PMS avant la sporulation de la souche.

La représentation graphique de l'effet relatif de différents facteurs sur la sporulation que l'on souhaite tardive, sur la dégradation de la caféine, sur la production de CO<sub>2</sub> ainsi que sur le pH final de la fermentation que l'on espère moindre, en vue d'associer cette souche à un procédé de conservation par ensilage, permet de choisir les conditions de fermentation qui seront utilisées dans la suite de ce travail :

Température : 25 °C

CaCl<sub>2</sub> : 0,3 g.l<sup>-1</sup>

Eclairage : lumière naturelle

pH initial : 4,4

Aération : 60 ml.mn<sup>-1</sup> et par colonne

L'ajout ou non d'une solution minérale contenant du potassium, du sodium, du magnésium, des phosphates et des sulfates ainsi que la stérilité de la pulpe de café sont indifférents et dépendront de la finalité de l'expérience mise en œuvre.

**FERMENTATIONS**  
**SUCCESSIVES**

## 7 - FERMENTATIONS SUCCESSIVES

On appelle « fermentations successives », les cultures mixtes de microorganismes qui se suivent dans le temps sans subir un arrêt définitif de croissance par une intervention externe (température, stérilisation).

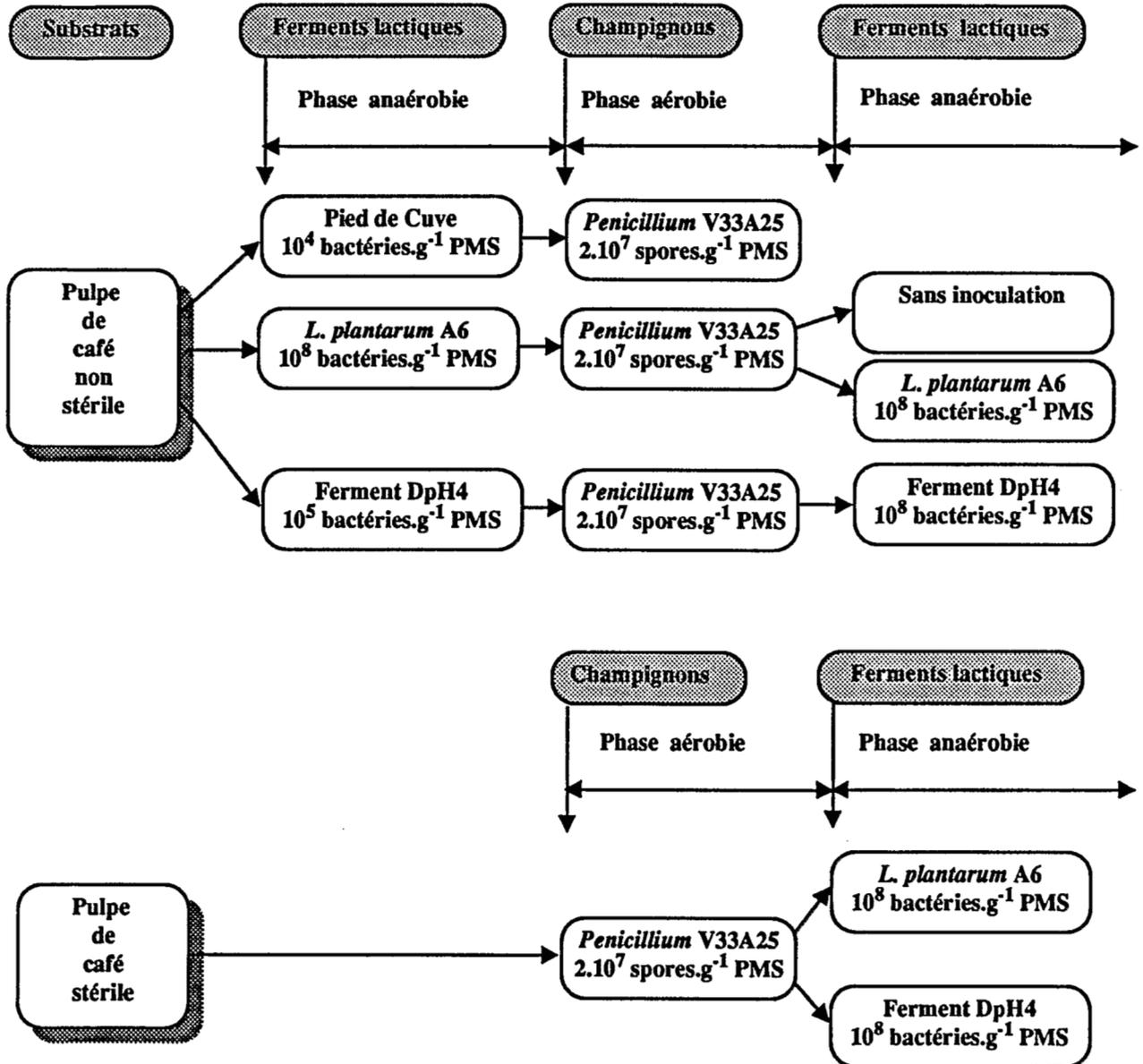


Figure 7.1 : Schéma synthétique des fermentations successives pour l'étude de la décaféination et la conservation de la pulpe de café mexicaine et de l'influence de la microflore endogène au cours de ces procédés aérobie ou anaérobie.

Nous avons étudié, dans le chapitre 5, les effets de l'apport de différents ferments lactiques sur l'ensilage de pulpe de café. Au bout d'un mois de conservation, on obtient un produit stabilisé dont le pH est de 4.0 environ quelque soit le ferment utilisé, mais contenant toujours environ 1 % PMS de caféine.

Dans le chapitre 6, nous avons sélectionné une souche de champignon filamentueux capable de dégrader la caféine de la pulpe axénique (débarrassée par stérilisation de sa microflore endogène). Il s'agit d'un *Penicillium* (V33A25). Nous avons optimisé les conditions de croissance de ce microorganisme afin d'obtenir une dégradation quasi-complète de la caféine avant la phase de sporulation.

Dans le présent chapitre, nous travaillerons dans un premier temps à partir des trois lots de pulpe de café ensilée pendant 1 mois avec les différents ferments (Pied de Cuve ; *L. plantarum* A6 ; Ferment commercial DpH4) obtenus précédemment (§ 5.2). Ces trois lots seront utilisés comme substrats pour la croissance aérobie du *Penicillium* V33A25 afin de les décaféiner (Figure 7.1). Nous étudierons au cours de ces fermentations aérobies, le devenir de la microflore et l'évolution des différents paramètres physico-chimiques.

Puis, la pulpe décaféinée par *Penicillium* V33A25 sera de nouveau ensilée avec ou sans réinoculation du ferment lactique utilisé lors du premier ensilage (Figure 7.1). Nous suivrons les mêmes paramètres que précédemment.

Les expériences antérieures ont été faites à partir de pulpe de café non stérilisée. Afin de déterminer l'influence de la microflore endogène de la pulpe de café sur le comportement des populations microbiennes imposées, nous travaillerons, dans un dernier temps, à partir d'un lot de pulpe de café axénique, décaféiné en aérobose par *Penicillium* V33A25. Ce produit sera inoculé d'une part par *L. plantarum* A6 et d'autre part par le ferment commercial DpH4 (Figure 7.1.B).

## 7.1 - Décaféination de la pulpe ensilée

Nous rappelons les principales caractéristiques des trois lots de pulpe de café mexicaine A ensilée qui seront inoculés par *Penicillium* V33A25 :

Ensilage PC : Ensemencement par un Pied de Cuve ( $\approx 7\%$  PMF soit  $10^4$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS) ;

Ensilage A6 : Ensemencement par *L. plantarum* A6 (à raison de  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS) ;

Ensilage DpH4 : Ensemencement par un ferment commercial DpH4 composés de deux bactéries lactiques : *L. plantarum* et *P. acidilactici* plus un complexe enzymatique composé de cellulases. Le taux d'inoculation est celui préconisé par le fabricant soit  $10^5$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS.

Les caractéristiques de ces trois ensilages (Lot PC, Lot A6, Lot DpH4) après 1 mois de fermentation anaérobie sont rappelées dans le tableau 7.1

**Tableau 7.1 : Principaux paramètres des trois ensilages de pulpe de café après 1 mois de fermentation anaérobie**

Lot ensilé		Lot PC	Lot A6	Lot DpH4
<b>Ferment</b>		<b>Pied de cuve</b>	<b><i>L. plantarum</i> A6</b>	<b>DpH4</b>
<b>Humidité finale</b>		<b>66,78</b>	<b>66,78</b>	<b>66,19</b>
<b>pH final</b>		<b>3,91</b>	<b>3,92</b>	<b>4,11</b>
<b>Acide lactique</b>	% PMS	<b>3,35</b>	<b>2,14</b>	<b>0,08</b>
<b>Acide acétique</b>	% PMS	<b>0,68</b>	<b>0,48</b>	<b>0,05</b>
<b>Acide butyrique</b>	% PMS	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Sucres réducteurs</b>	% PMS	<b>4,56</b>	<b>3,67</b>	<b>8,32</b>
<b>Glucose</b>	% PMS	<b>1,69</b>	<b>1,56</b>	<b>1,54</b>
<b>Fructose</b>	% PMS	<b>1,52</b>	<b>2,06</b>	<b>4,19</b>
<b>Ethanol</b>	% PMS	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Caféine</b>	% PMS	<b>1,02</b>	<b>0,93</b>	<b>0,90</b>

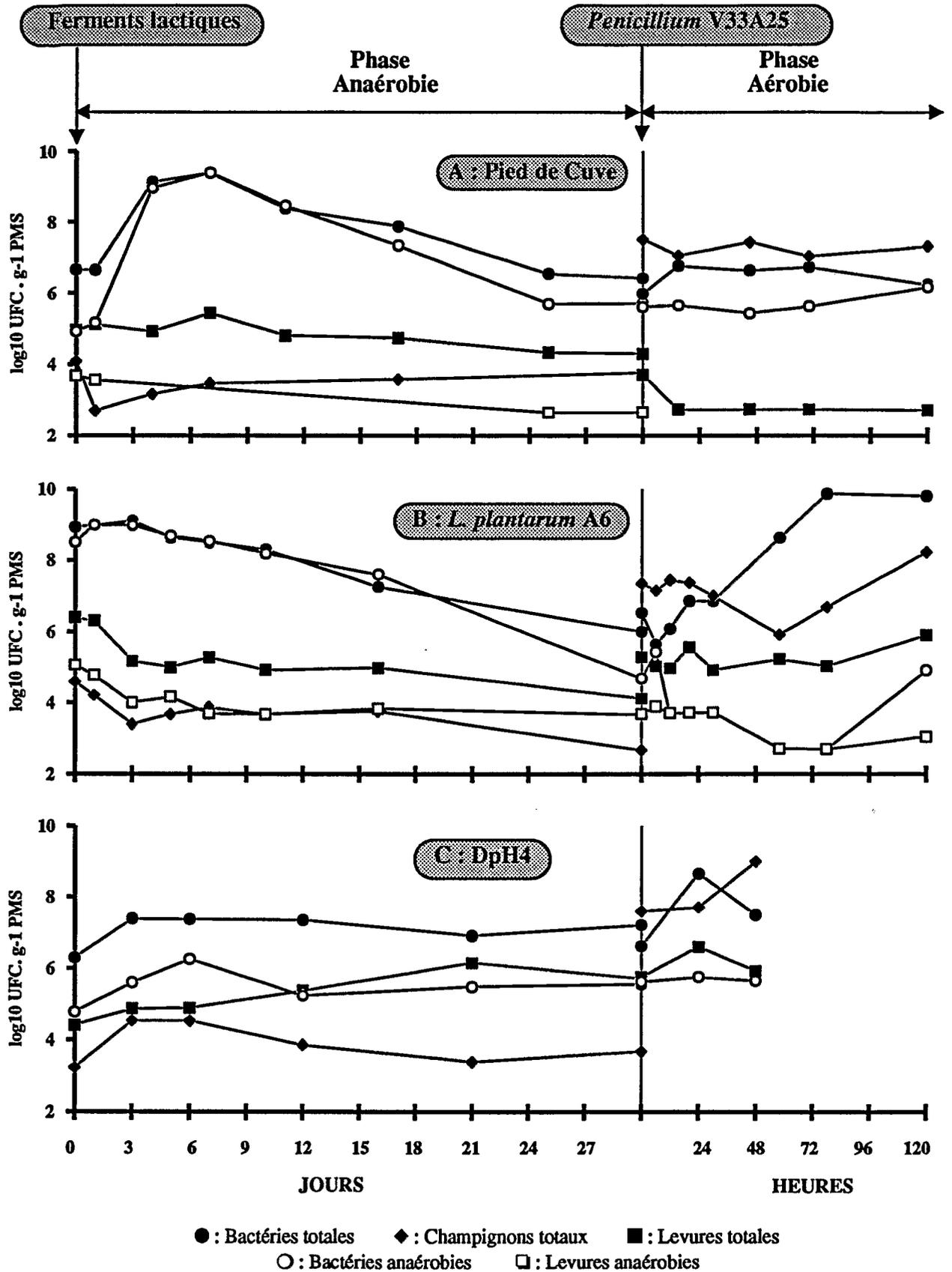
Le procédé utilisé pour la décaféination aérobie de ces trois lots de pulpe ensilés (PC, A6 et DpH4), est celui décrit au § 3.4.1 avec certaines modifications :

- pas d'ajout de solution minérale, pas de modification de pH, pas d'autoclavage.
- inoculation avec une suspension de spores de *Penicillium* V33A25 ajustée à  $2.10^7$  spores.g<sup>-1</sup> PMS. Cette suspension est centrifugée puis reprise dans un faible volume de surnageant afin de modifier au minimum l'humidité des lots de pulpe ensilés.
- température du fermenteur contrôlée à 25 °C et aération stabilisée à 60 ml.mn<sup>-1</sup> par colonne.

Au cours de ces fermentations, nous avons suivi l'évolution de la microflore totale et plus particulièrement celle de la population lactique. Parallèlement, nous avons suivi les principaux paramètres physico-chimiques (humidité, pH, acide lactique, acide acétique, caféine, sucres réducteurs) ainsi que l'évolution du CO<sub>2</sub>.

### 7.1.1 - Evolution de la microflore

Les bactéries lactiques se maintiennent à un niveau constant ( $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS) au cours des fermentations aérobies réalisées à partir du lot PC et du lot DpH4 (Figure 7.2 A et C). Par contre, au cours de la fermentation réalisée à partir du lot A6, les bactéries lactiques diminuent après 12 heures de fermentation pour retrouver leur taux initial en fin de fermentation.



**Figure 7.2 :** Evolution de la microflore au cours des fermentations aérobies inoculées par *Penicillium V33A25* réalisées à partir de trois lots de pulpe ensilée par trois ferments différents (Pied de cuve ; *L. plantarum* A6 ; DpH4). Les microorganismes sont exprimés en Log du nombre par gramme de substrat poids sec.

La population des bactéries aérobies augmente de manière très significative dans le cas du lot A6 après 36 heures environ de culture aérobie. Cette population se développe rapidement dans le cas du lot DpH4. Il en est de même dans le cas du lot PC mais le phénomène est moins marqué.

Les champignons initialement présents dans la pulpe ensilée sont nettement dominés par l'inoculation massive de *Penicillium* V33A25 ( $2.10^7$  spores.g<sup>-1</sup> PMS). L'augmentation du nombre des champignons démarre à des temps variables suivant la nature des lots de pulpe ensilée utilisés comme substrats : 24 heures dans le cas de DpH4, après 60 heures pour A6 et après 96 heures dans le cas de PC.

Quand aux populations de levures, leur nombre n'évolue pas de manière significative (Figure 7.2 B et C) tout au long des procédés de décaféination des lots PC, A6 et DpH4.

### 7.1.2 - Evolution des paramètres physico-chimiques

Au cours de ces trois fermentations aérobies, des observations au microscope ont permis de suivre le développement du *Penicillium* V33A25 et de corrélérer celui-ci au suivi en continu de la production de CO<sub>2</sub> (Figure 7.4). Parallèlement, l'évolution des principaux paramètres physico-chimiques a été analysée (Figure 7.3).

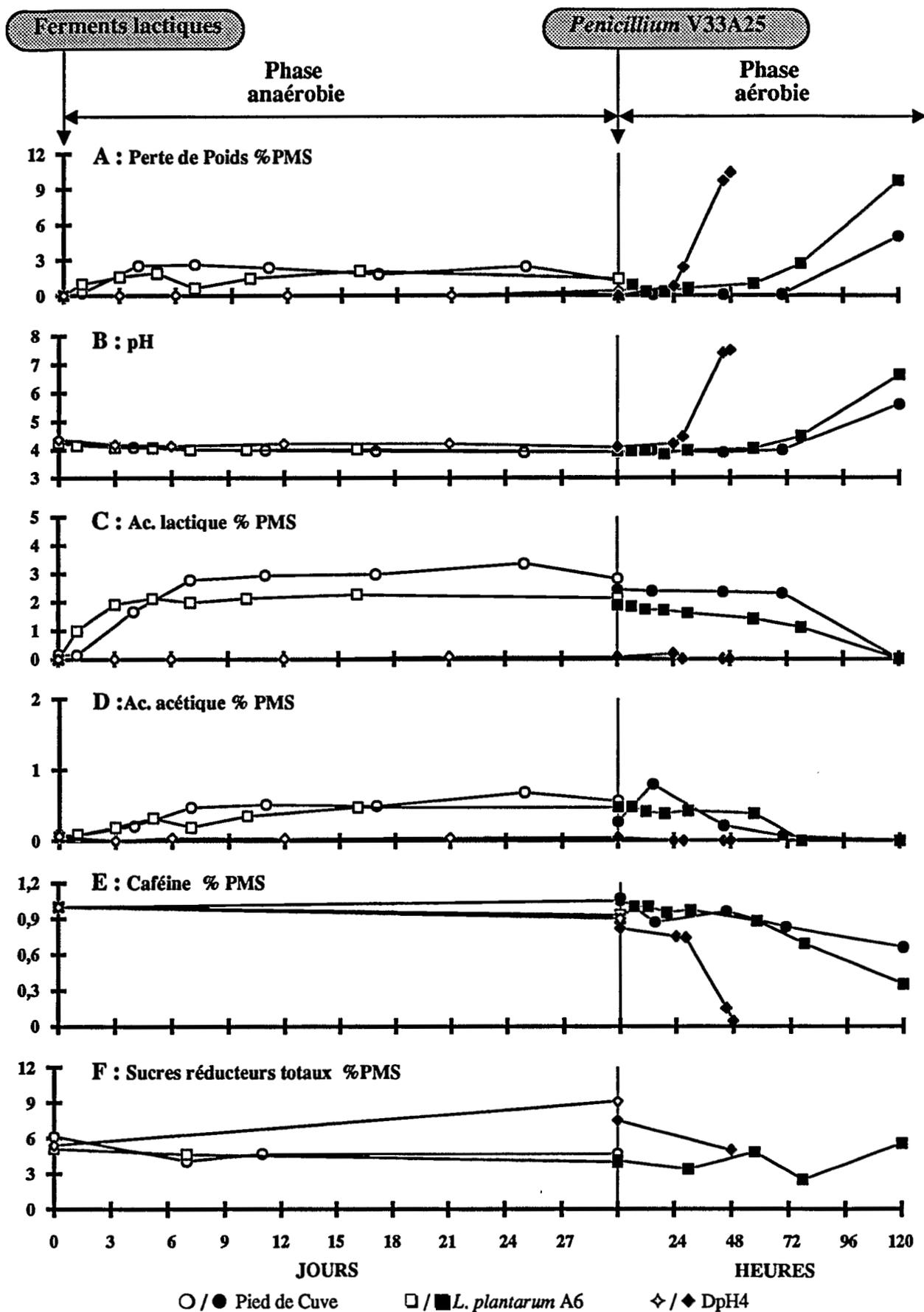
Quelque soit le ferment lactique utilisé, il n'y a pas eu dégradation de la caféine au cours des trois ensilages correspondant à la phase anaérobie (Figure 7.3 E). Le taux de la caféine est de 1 % PMS dans les trois lots de pulpe de café ensilés (Tableau 7.1). Par la suite, lors des trois fermentations aérobiesensemencées par *Penicillium* V33A25, la dégradation de la caféine a été obtenue à des vitesses différentes (Figure 7.3 E).

Cette dégradation est complète et rapide (48 heures) uniquement pour le lot DpH4. Par contre, il reste encore 0,3 % PMS de caféine après 120 heures de fermentation sur le lot A6. A ce stade de la fermentation, le champignon est prêt à sporuler. Après 120 heures de fermentation aérobie sur le lot PC, il reste encore 0,6 % PMS de caféine mais le *Penicillium* V33A25 est encore en plein développement mycélien, aucune forme de reproduction n'est visible.

Dans les trois cas de fermentation aérobie avec *Penicillium* V33A25 la cinétique de dégradation de la caféine (Figure 7.3 E) est parfaitement corrélée aux trois paramètres suivants :

- augmentation du pH à 7 ( Figure 7.3 B ) ;
- augmentation du pourcentage de perte de poids en matière sèche (Figure 7.3 A) ;
- production maximum de CO<sub>2</sub> par le champignon (Figure 7.4).

On observe surtout que ces paramètres sont étroitement corrélés à la diminution de l'acide lactique, à la disparition de l'acide acétique du milieu de culture (Figure 7.3 C et D) et au développement du *Penicillium* V33A25.



**Figure 7.3** : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux de trois ensilages de pulpe de café inoculés par trois ferments lactiques différents (Pied de cuve ; *L. plantarum* A6 ; DpH4) pendant 30 jours en anaérobiose puis inoculés par *Penicillium V33A25* et fermentés en aérobiose.

Fermentations successives

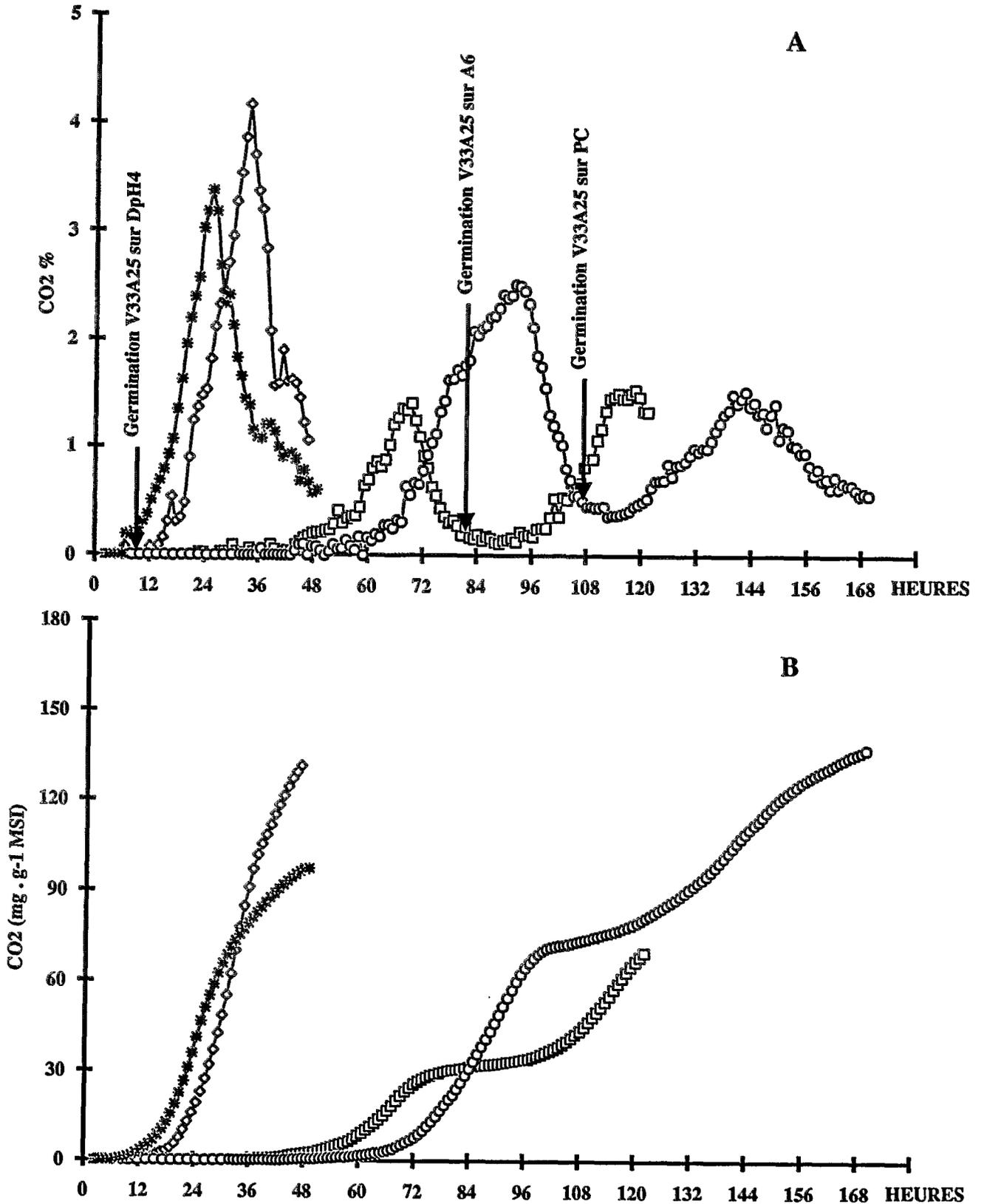


Figure 7.4 : Evolution du CO<sub>2</sub> au cours des fermentations aérobies inoculées par *Penicillium* V33A25, réalisées sur trois lots de pulpe ensilée avec trois ferments lactiques différents : Pied de Cuve (○) ; *L. plantarum* A6 (□) ; DpH4 (◇).  
Comparaison avec une fermentation aérobie témoin (\*) sur de la pulpe non ensilée, stérile et inoculée par *Penicillium* V33A25.

Les courbes de CO<sub>2</sub> obtenues lors des fermentations des lots PC et A6 présentent deux vitesses de production nettement séparées par un pallier (Figure 7.4 B). Sur DpH4, la croissance du champignon est rapide et présente une seule vitesse de production de CO<sub>2</sub>. L'examen microscopique a permis de se rendre compte que les premières vitesses de production de CO<sub>2</sub> avec A6 et PC ne correspondent pas au développement du champignon *Penicillium* V33A25 (Figure 7.4 A). Elles sont certainement dues au développement des bactéries hétérotrophes aérobies dans le cas de A6 (Figure 7.2 B) et donc à une production de biomasse bactérienne. Dans le cas de PC, on n'observe pas d'évolution particulière de la microflore (Figure 7.2 A). La première vitesse de production de CO<sub>2</sub> serait donc due à un découplage énergétique et non à une production de biomasse.

### 7.1.3 - Discussion

Lorsque l'on compare les courbes de production de CO<sub>2</sub> des trois fermentations à une courbe témoin de croissance de *Penicillium* V33A25 sur pulpe de café axénique (Figure 7.4), on remarque que le temps de latence de la fermentation réalisée sur le lot de pulpe ensilée avec DpH4 est légèrement supérieur (13 heures) à celui de la fermentation témoin (10 heures) mais la production totale du CO<sub>2</sub> est 30 % plus élevée. Par contre, les temps de latence des deux autres fermentations sont beaucoup plus longs (48 heures pour A6 et 60 heures pour PC contre 10 heures pour la fermentation témoin).

Rappelons qu'au cours de l'ensilage inoculé par DpH4 (Tableau 7.1), il n'y a pas eu de production importante d'acide lactique (0,08 % PMS), ni d'acide acétique (0,05 % PMS). La germination, le développement du *Penicillium* V33A25 et le profil de dégradation de la caféine sont comparables avec les résultats obtenus au § 6.2 sur une fermentation témoin.

Par contre, dans le cas des ensilages inoculés par PC d'une part, et A6 d'autre part, il y a, en fin d'ensilage, des quantités d'acide lactique significatives (3,35 % PMS pour PC et 2,14 % PMS pour A6), et de l'acide acétique en quantité non négligeable (0,68 % PMS pour PC et 0,48 % PMS pour A6). On remarque que c'est au cours des premières phases de production de CO<sub>2</sub> que débute la diminution des taux d'acides lactique et acétique. La germination du *Penicillium* V33A25 ne commence que lorsque le taux d'acide lactique présent dans le milieu de culture devient inférieur à 1 % PMS (Figure 7.3 C) et que l'acide acétique disparaît totalement (Figure 7.3 D). On observe alors une augmentation lente des valeurs du pH ainsi que le début de la dégradation de la caféine (Figure 7.3 B et E).

L'ensemble des observations précédentes démontre clairement l'effet inhibiteur des acides lactique et acétique sur la germination des spores et le développement mycélien du *Penicillium* V33A25. En particulier, plus les taux d'acides lactique et acétique sont importants dans le milieu de culture, plus le temps de germination du champignon est long. Le phénomène d'inhibition de la germination des champignons et des levures, dû à la présence

d'acide acétique, a déjà été décrit par plusieurs auteurs (MOON, 1983 ; WEINBERG et coll., 1988). Cet acide est connu pour être un agent antimyotique (MOON, 1983) et sa présence est certainement un des facteurs expliquant ce retard de germination.

En ce qui concerne les sucres réducteurs, on remarque que leur concentration n'évolue pas de manière significative au cours de la fermentation aérobie réalisée sur le lot A6 (Figure 7.3 F). La microflore hétérotrophe aérobie, présente dans ce lot, utiliserait les acides lactique et acétique contenus dans le substrat ensilé pour se développer. Dans le cas du lot DpH4, en absence d'acides lactique et acétique, l'utilisation des sucres réducteurs par *Penicillium* V33A25 intervient très rapidement au cours de la fermentation aérobie ce qui provoque une diminution significative de leur concentration.

## 7.2 - Réensilage de la pulpe de café désilée puis décaféinée

Nous étudierons dans ce paragraphe le réensilage uniquement de deux lots A6 et DPH4 de pulpe ensilée puis décaféinée (Figure 7.1 A). La réinoculation des substrats décaféinés se fera avec le même ferment utilisé au cours du premier ensilage.

Nous avons travaillé sur la pulpe inoculée par une suspension de *L. plantarum* A6 ( $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS), ensilée pendant un mois puisensemencée par *Penicillium* V33A25 en aérobiose pendant 120 heures (5 jours). Cette fermentation a été stoppée juste avant la sporulation du champignon en se basant sur la représentation graphique de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> et en imposant des conditions anaérobies. Le pH du substrat fermenté est alors de 6.6, et le taux de caféine de 0,3 % PMS.

Ce substrat décaféiné a été réparti en deux lots. Le premier lot servira de témoin et sera ensilé directement. Le second lot sera réensilée avec addition d'une suspension de bactéries de *L. plantarum* A6 à un taux de  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS suivant le protocole décrit au § 3.4.2.

Parallèlement, nous avons réensilé la pulpe inoculée par DpH4 ( $10^5$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS), ensilée pendant 1 mois puis décaféinée par *Penicillium* V33A25 en aérobiose pendant 48 heures (§ 7.1 A). Cette fermentation a été stoppée juste avant la libération des spores du champignon en se basant sur la représentation graphique de la vitesse de production de CO<sub>2</sub> et en imposant des conditions anaérobies (Figure 7.1 A). Le pH du substrat fermenté est alors de 7.5 et la caféine est complètement dégradée.

Cependant, dans ce cas, nous avons réinoculé cette pulpe avec le ferment commercial DpH4 mais en utilisant une concentration de cellules 1 000 fois supérieure à celle préconisée par le fabricant, soit un taux de  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS (Figure 7.1 A). Ce taux d'ensemencement est donc équivalent à celui utilisé pour le ferment *L. plantarum* A6.

### 7.2.1 - Evolution de la microflore

Avec ou sans réinoculation par *L. plantarum* A6, on observe une augmentation très rapide du nombre des bactéries lactiques au cours des trois premiers jours. Cette population se maintient stable pendant 5 jours environ à des valeurs importantes ( $10^9$  à  $10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS), puis commence à diminuer (Figure 7.5 A et B). On observe d'autre part une diminution significative du nombre des champignons. La population de champignons passe progressivement de  $10^8$  à  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS. La population des levures diminue au cours des premiers jours d'ensilages correspondant au développement des bactéries lactiques. Les levures anaérobies sont peu importantes et n'évoluent pratiquement pas.

Lorsque la pulpe de café ensilée avec DpH4 au taux préconisé par le fabricant soit  $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS, puis décaféinée, est réensilée avec réinoculation de DpH4 à un taux supérieur soit  $10^8$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS environ, on observe une augmentation rapide du nombre des bactéries lactiques (Figure 7.5 C). Après 12 jours d'ensilage, la population des bactéries lactiques a diminué pour atteindre  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS après 21 jours d'ensilage. Comme précédemment, les champignons diminuent de manière très significative ( $10^9$  à  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS) dès les premiers jours d'ensilage. La population des levures reste stable.

### 7.2.2 - Evolution des paramètres physico-chimiques au cours des réensilages

L'évolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux lors du réensilage de la pulpe décaféinée avec ou sans réinoculation est illustrée sur la Figure 7.6.

La perte de poids au cours des réensilages reste inférieure à 5 % PMS (Figure 7.6 A). Elle est un peu plus élevée que celle observée au cours des premiers ensilages (2 % PMS).

Pour les trois ensilages, la diminution du pH est rapide et se stabilise dès le 3ème jour à des valeurs avoisinantes 4.0 (Figure 7.6 B). Cette diminution de pH est corrélée à la production rapide d'acide lactique. Les concentrations en acide lactique sont plus importantes que celles obtenues au cours des premiers ensilages. Les profils de production d'acide acétique sont similaires à ceux de la production d'acide lactique mais en quantité plus faible (Figure 7.6 C et D).

On remarque qu'avec ou sans réinoculation par *L. plantarum* A6, les résultats obtenus sont satisfaisants et similaires. La chute du pH est assez rapide et les valeurs se stabilisent vers 4.3. On observe une production d'acide lactique plus importante qu'au cours des premiers ensilages (environ 4 % PMS). Cependant, on note une production plus importante d'acide acétique (2 % PMS lorsque la pulpe décaféinée est réinoculée par A6, 3 % PMS sans réinoculation).

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le lot DpH4 décaféiné et réinoculé avec une forte concentration du ferment DpH4 (Figures 7.1 et 7.6). On note une chute très rapide du pH, une très forte production d'acide lactique (7 % PMS), une faible production d'acide acétique (1,3 % PMS), pas d'acide butyrique, ni d'éthanol. Ces résultats sont étroitement liés au taux d'inoculation de cet ensilage qui est 1 000 fois supérieur à celui utilisé pour le premier ensilage par DpH4. Celui-ci avait donné des résultats ambigus : les valeurs du pH étaient proches de 4.1 mais les productions d'acide lactique et d'acide acétique étaient très faibles.

La quantité de sucres réducteurs diminue aux cours des ensilages des lots A6 (Figure 7.6 F). Par contre, elle augmente au cours de l'ensilage inoculé par DpH4. Cela est dû à la présence dans ce ferment commercial d'un complexe enzymatique composé de cellulases.

### 7.2.3 - Discussion

Les fermentations successives ont été réalisées sur de la pulpe non stérile à laquelle nous n'avons pas ajouté d'azote minéral ou organique. De ce fait les populations microbiennes ont été amenées à explorer toutes les sources possibles d'azote naturellement présentes et disponibles dans le substrat. Lors des premiers ensilages, les bactéries lactiques ont dû utiliser une partie des protéines et des acides aminés présents dans la pulpe. Mais elles n'ont pas utilisé la caféine. Lors de la fermentation aérobie, *Penicillium* V33A25 a été amené à dégrader la caféine pour l'utiliser comme source d'azote.

En fin de fermentation aérobie, on suppose que tout l'azote disponible a été utilisé par les microorganismes. En effet, la fermentation a été stoppée juste avant la phase de sporulation du *Penicillium* V33A25. L'apparition de cette phase est corrélée à la dégradation totale de la caféine. L'azote serait devenu le facteur limitant de croissance. On note que dans le milieu de culture, il reste dans tous les cas environ 4 % PMS de sucres réducteurs disponibles (Figure 7.6 F).

Or, dès que l'on réinstaura uniquement des conditions anaérobies (Figure 7.5 A), la microflore lactique, qui est restée viable au cours de la fermentation aérobie, se développe rapidement dès les premiers jours ( $10^5$  à  $10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS). Dans le même laps de temps, la population de champignons diminue ( $10^8$  à  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS). On peut supposer que les bactéries lactiques utilisent pour se développer, l'azote assimilé par les champignons. Ce même phénomène a été observé au cours des réensilages de pulpe décaféinée, inoculés par *L. plantarum* A6 ou par DpH4 (Figure 7.5 B et C).

Par ailleurs, la population des bactéries lactiques pour se développer et produire de l'acide lactique utilise les sucres réducteurs présents dans le milieu comme source de carbone et d'énergie. La diminution des sucres observés sur les lots A6 confirme cette hypothèse. Dans

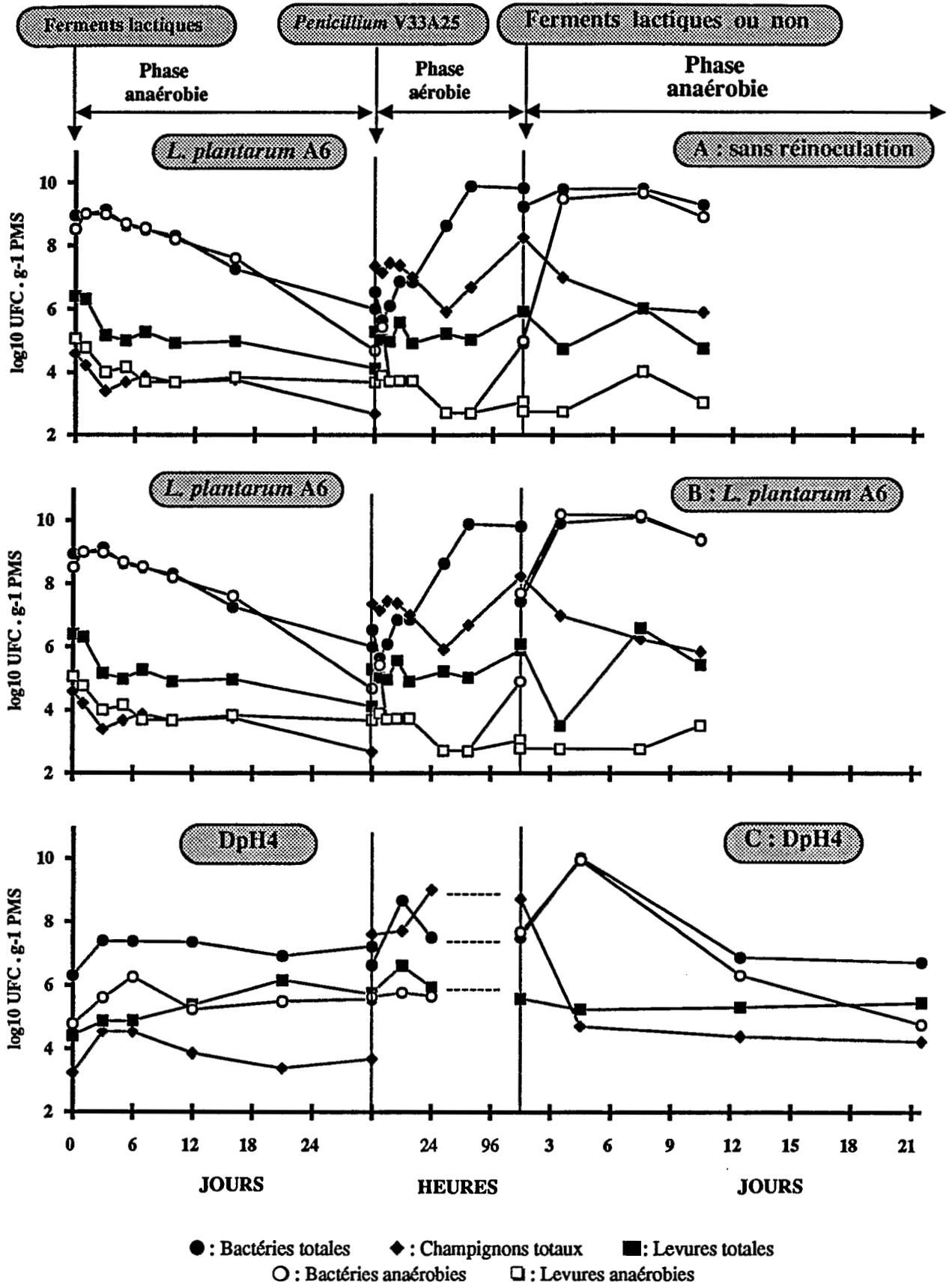


Figure 7.5 : Evolution de la microflore lors du réensilage de la pulpe décaféinée avec ou sans réinoculation avec *L. plantarum* A6 ou DpH4. Les microorganismes sont exprimés en Log du nombre par gramme de substrat poids sec.

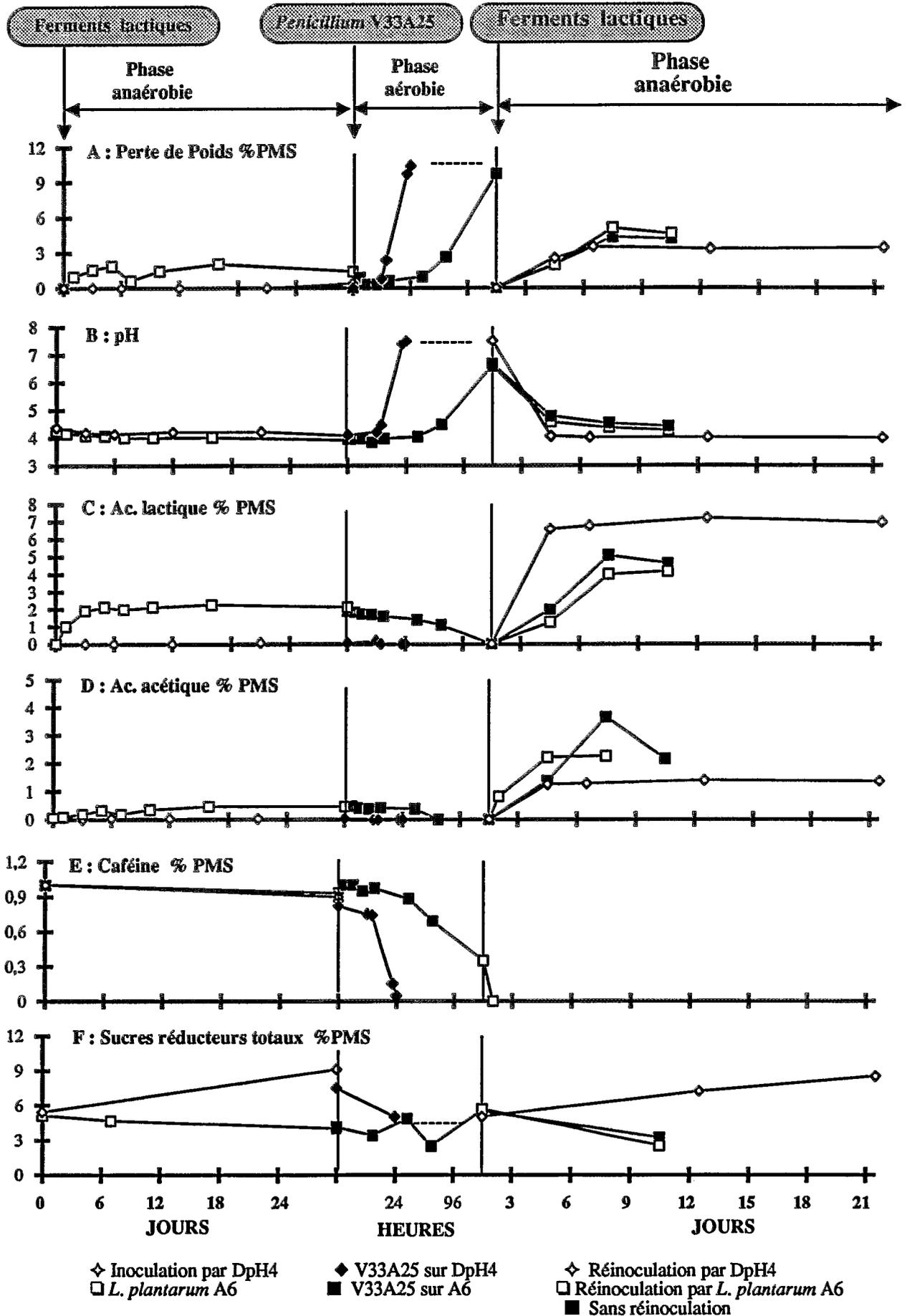


Figure 7.6 : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux lors du réensilage de la pulpe décaféinée avec ou sans réinoculation.

le cas de l'ensilage inoculé par DpH4, ferment commercial contenant des cellulases, la production d'acide lactique est très élevée (7 % PMS). Elle est liée à une augmentation du taux des sucres réducteurs libérés dans le milieu. Ces sucres proviennent de l'hydrolyse des polysaccharides pariétaux sous l'action des enzymes contenus dans le ferment. Cela confirme l'intérêt déjà reconnu de l'adjonction d'un complexe enzymatique à un ferment lactique (VANBELLE et coll., 1994).

Le même phénomène moins marqué est observé sur le lot A6. Il est possible que lors de la décaféination, *Penicillium* V33A25 a produit des enzymes capables d'hydrolyser les polysaccharides de la pulpe en sucres simples. Cela permet d'expliquer l'augmentation du taux d'acide lactique au cours des réensilages, alors que ceux-ci sont réalisés sans apport exogène d'enzymes.

Enfin, la production d'acide acétique est plus importante au cours des réensilages et plus particulièrement pour le lot réensilé de manière naturelle. Cela peut présenter un avantage au cours des désilages. L'acide acétique est connu pour être un composé antimyotique (MOON, 1983). Sa présence limitera pendant un certain temps le développement des champignons et des levures à l'ouverture des silos.

### 7.3 - Ensilage de pulpe de café stérile décaféinée

Afin d'éliminer l'influence de la microflore endogène de la pulpe de café sur l'évolution des populations imposées pour orienter les procédés d'ensilages et de décaféination, nous avons utilisé de la pulpe de café préalablement stérilisée. Cette pulpe stérile a été décaféinée en FMS aérobie par *Penicillium* V33A25 selon le protocole décrit au § 3.4.1.

Ce substrat décaféiné a été réparti en deux lots. Le premier lot sera ensilé avec addition d'une suspension de bactéries de *L. plantarum* A6 à un taux de  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS suivant le protocole décrit au § 3.4.2. Le second lot sera inoculé selon le même protocole par le ferment DpH4 à un taux de  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS (Figure 7.1 B). Au cours des ensilages, nous avons déterminé la microflore et analysé l'évolution des principaux paramètres (humidité, pH, acide lactique, acide acétique, sucres réducteurs).

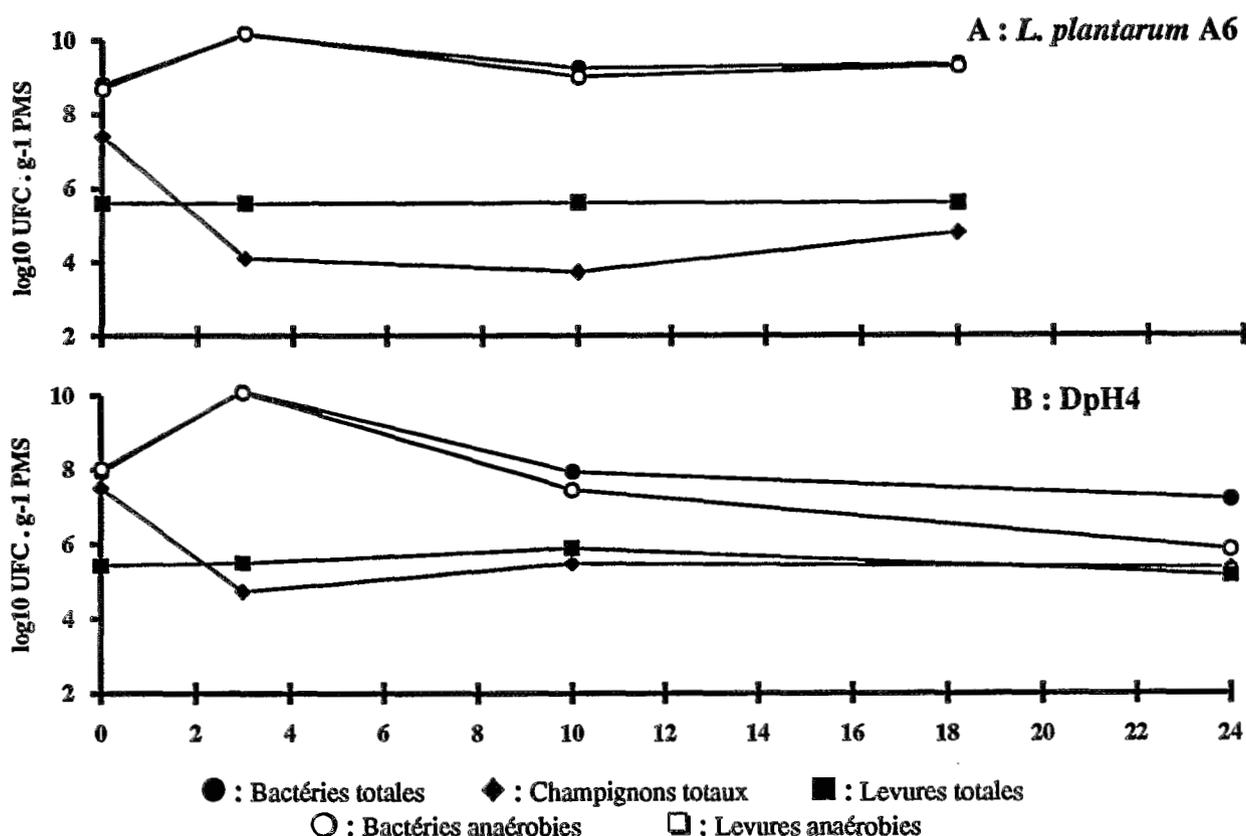
#### 7.3.1 - Evolution de la microflore

La figure 7. 7 présente l'évolution de la microflore totale au cours des deux ensilages qui ont duré trois semaines, réalisés à partir de pulpe de café stérile et décaféinée.

Les bactéries lactiques se sont développées très rapidement et la population passe dans les deux cas de  $10^8$  à  $10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS en trois jours. Après cette période, le taux des bactéries lactiques reste stable pendant trois semaines ( $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS) dans le cas de A6

(Figure 7.7 A). Dans le cas de DpH4, la population lactique diminue régulièrement pour atteindre un taux de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS environ après 24 jours d'ensilage (Figure 7.7 B).

Dans le cas de A6, les bactéries totales dénombrées en aérobiose correspondent à la population de bactéries lactiques inoculée. Il en est de même au cours des premiers jours de l'ensilage inoculé par DpH4. On observe cependant une légère différence en fin d'ensilage (un facteur 10) qui s'expliquerait par une contamination due aux manipulations réalisées en milieu non stérile. La présence de levures au cours des deux ensilages confirme cette hypothèse. Ces microorganismes contaminants se seraient développés au cours de la fermentation aérobie.



**Figure 7.7** : Evolution de la microflore au cours d'ensilages réalisés à partir de pulpe de café décaféinée par *Penicillium V33A25* en aérobiose pendant 30 heures puis inoculés par deux ferments lactiques **A** : *L. plantarum A6* ; **B** : Ferment commercial DpH4  
Les microorganismes sont exprimés en Log du nombre par gramme de substrat poids sec.

On observe une diminution rapide du taux des champignons de  $10^8$  à  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS au cours des trois premiers jours. Cette diminution est corrélée à l'augmentation de la population des bactéries lactiques (Figure 7.7). La population des champignons reste stable jusqu'à la fin des ensilages.

### 7.3.2 - Evolution des paramètres physico-chimiques

L'ensemble des paramètres de la fermentation de décaféination à partir de pulpe stérile et des deux ensilages qui ont suivi sont présentés sur la figure 7.8.

La perte de matière sèche au cours de la fermentation aérobie est significative (7 %). Cette perte est plus faible (inférieure à 3 % PMS) au cours des deux ensilages qui ont suivi (Figure 7.8 A). En absence d'oxygène et d'une source d'azote importante, l'activité fermentaire des microorganismes est faible.

L'évolution du pH est cohérente avec ce que nous avons décrit précédemment. En fin de décaféination, il se situe au environ de 7.0. Après avoirensemencé par des ferments lactiques et imposé des conditions de fermentations anaérobies, le pH décroît très rapidement et se stabilise à des valeurs de 4.0 pour DpH4 et 4.3 pour *L. plantarum* A6. Ces valeurs de pH n'évoluent pas après un mois et demi d'ensilage (Figure 7.8 B).

En ce qui concerne la production d'acides, les résultats obtenus confirment les observations faites au paragraphe précédent (§ 7.2.2). En particulier, la production d'acide lactique est très importante avec DpH4 (6% PMS). Elle est corrélée à une faible production d'acide acétique (1,3 % PMS). Pour l'ensilage réalisé avec A6, la production d'acide lactique est nettement plus faible (3 % PMS) qu'avec DpH4. Par contre, la production d'acide acétique par A6, même si elle quantitativement plus faible (1,8 % PMS), elle est proportionnellement importante par rapport à la production d'acide lactique (Figure 7.8 C).

La caféine est dégradée à 80 % au cours de la fermentation aérobie inoculée par *Penicillium* V33A25 (Figure 7.8 D). La fermentation a été stoppée juste avant la sporulation du champignon. La pulpe de café a alors étéensemencée par des ferments lactiques et fermentée en conditions anaérobies. Le reste de la caféine a été dégradé au cours des premières heures d'ensilage, laps de temps nécessaire à l'instauration des conditions d'anaérobiose.

Les résultats des analyses des sucres réducteurs confirment les observations faites précédemment. On note une stabilisation de la quantité globale des sucres réducteurs avec A6 et une augmentation de ceux-ci lorsque l'ensilage est inoculé par DpH4.

### 7.3.3 - Discussion

Les données relatives à l'évolution de la microflore totale sont très similaires à celles observées lors des réensilages de pulpe de café non stérile, ensilée, puis décaféinée (§ 7.2.1). Bien que la microflore endogène de la pulpe de café soit importante (§ 4.2), celle-ci ne semble pas avoir une influence particulière sur le développement des populations imposées lorsque l'on travaille avec des ferments lactiques ou de champignons filamenteux à haute concentration.

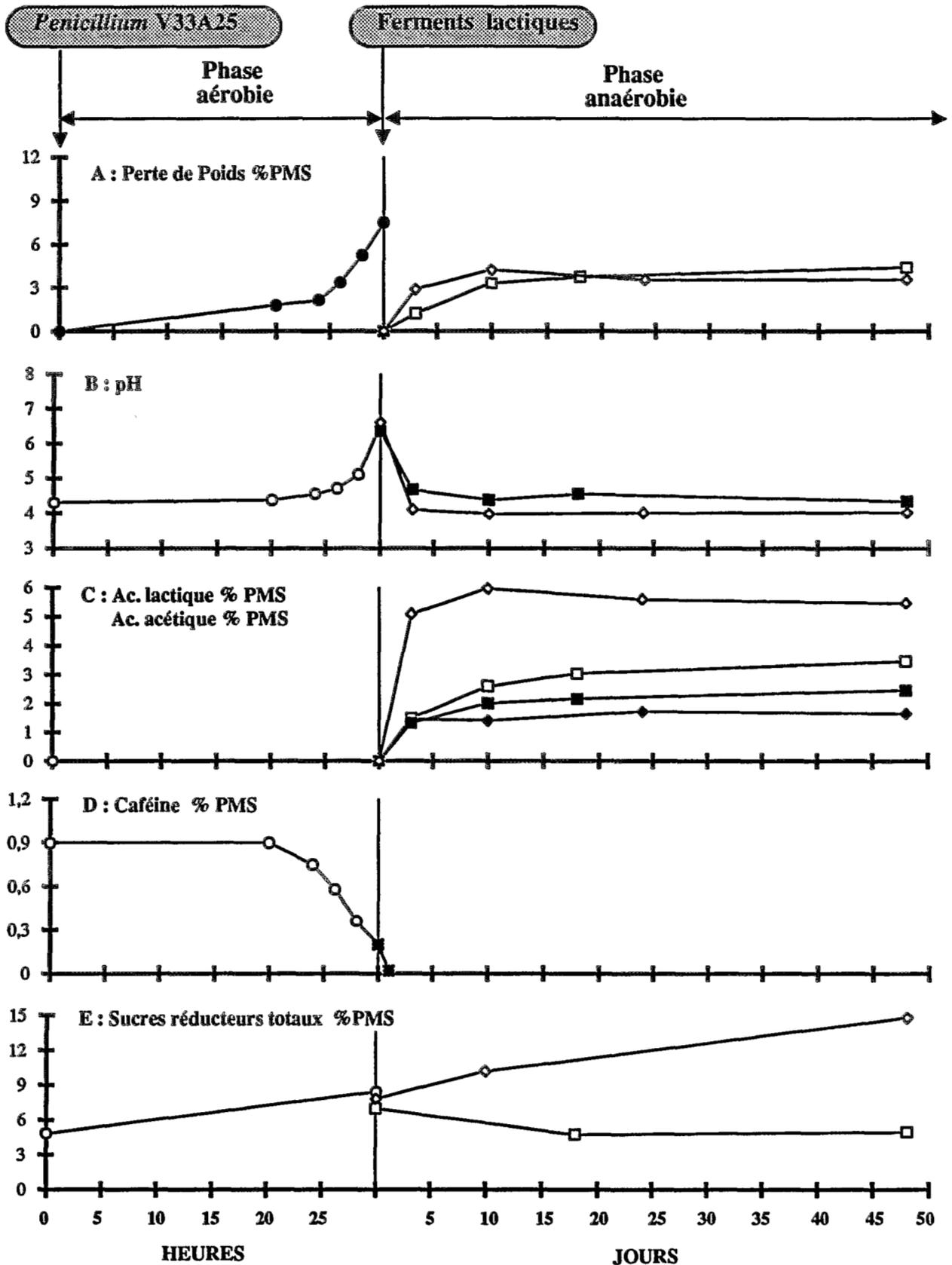


Figure 7.8 : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux de deux ensilages de pulpe de café décaféinée par *Penicillium V33A25* (○) en aérobose pendant 30 heures, puis inoculés par deux ferments lactiques différents *L. plantarum A6* (□ / ■) et *DpH4* (◇ / ◆) pendant 48 jours en anaérobose

Les profils de productions d'acides lactique et acétique ainsi que l'absence d'acide butyrique et d'éthanol confirment les observations faites au paragraphe précédent (§ 7.2.2). En effet, lorsque DpH4 est utilisé comme ferment à un taux de  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS, taux équivalent à celui utilisé pour *L. plantarum* A6, on remarque une production très importante d'acide lactique corrélée à une faible production d'acide acétique. L'ensilage inoculé par DpH4 obéirait à un processus de type homofermentaire.

Dans le cas de l'ensilage inoculé par A6, la production d'acide lactique est plus faible que celle obtenue avec DpH4 mais similaire aux productions précédemment observées sur les autres ensilages inoculés par *L. plantarum* A6. Cette expérience confirme la présence d'une forte concentration en acide acétique. On serait donc, dans le cas de A6, en présence d'un schéma de fermentation de type hétérofermentaire facultatif (DELLAGLIO et coll., 1994) bien que la souche soit connue pour être une bactérie homofermentaire lorsqu'elle est cultivée sur un substrat amylicé (GIRAUD, 1993). Il faut noter qu'il n'y a pas au cours de cet ensilage de production d'éthanol ni d'acide butyrique. Il ne s'agit donc pas d'une souche hétérofermentaire stricte.

Les sucres réducteurs diminuent au cours de l'ensilage avec A6 de la pulpe décaféinée. Au contraire, ils s'accumulent lorsque l'ensilage est inoculé par DpH4. En effet, la présence dans le DpH4 d'un complexe enzymatique composé de cellulases permet d'hydrolyser les sucres pariétaux et de libérer des sucres réducteurs au cours de l'ensilage. Grâce à l'action de ces enzymes la libération des sucres réducteurs et la production d'acide lactique sont importants. L'ensilage se stabilise très rapidement.

Des résultats similaires ont été obtenus concernant l'ensilage de fourrage par des ferments additionnés par des enzymes polysaccharolytiques. L'emploi de ces enzymes permet d'hydrolyser les parois végétales et de libérer dans la masse du fourrage des sucres métabolisables par la microflore lactique (VANBELLE et coll., 1994).

#### 7.4 - Conclusion

Au cours de ce premier chapitre sur les fermentations successives, nous avons pu suivre l'évolution de la microflore et des principaux paramètres physico-chimiques lors de la fermentation en milieu solide, qui correspond à la phase aérobie de croissance de *Penicillium* V33A25 pour la décaféination de la pulpe de café préalablement conservée par ensilage.

Il ressort de cette étude un certain nombre d'observations importantes :

- les taux d'acide lactique et d'acide acétique présents dans le milieu de culture influencent directement la germination des spores du *Penicillium* V33A25 et le procédé de dégradation de la caféine. Tout d'abord la microflore hétérotrophe aérobie consomme ces deux acides et le champignon se développe ensuite lorsque le taux d'acide lactique est inférieur à 1 % PMS et que l'acide acétique disparaît complètement.
- la dégradation de la caféine intervient lorsque les conditions de cultures deviennent favorables pour le développement du *Penicillium* V33A25. Dans ces conditions expérimentales, les champignons filamenteux restent les seuls microorganismes capables de dégrader la caféine en l'utilisant comme source d'azote.
- la corrélation établie précédemment (§ 6.3) entre la dégradation de la caféine, l'augmentation du pH, la sporulation du champignon et la représentation graphique de la vitesse de production du CO<sub>2</sub> obtenue sur des cultures axéniques est confirmée par ces expériences réalisées avec des cultures successives.
- le maintien à un taux stable de la population de bactéries lactiques au cours des fermentations aérobies de décaféination. Le passage en aérobose, le développement du *Penicillium* V33A25, l'augmentation du pH, aucun de ces trois facteurs ne semblent avoir d'influence sur la viabilité de cette population lactique.
- les pertes de poids en matière sèche sont importantes et proche de 12 % PMS. Ces pertes sont étroitement liées à la production de CO<sub>2</sub> par les microorganismes aérobies présents dans le milieu de culture. Mais elles ne sont pas forcément corrélées à la production de biomasse.

Lorsque l'on utilise de la pulpe de café non stérile comme substrat pour réaliser des cultures mixtes qui se suivent dans le temps en imposant des microflore exogènes, nous avons observé que le facteur le plus important a été l'aération des cultures ainsi que la qualité des ferments imposés. En effet, des conditions anaérobies de fermentation, associées à des ferments lactiques sélectionnés permettent d'obtenir une conservation par acidification de la pulpe de café, sans perte importante de matière sèche. Dans ces conditions anaérobies, la microflore hétérotrophe aérobie endogène de la pulpe de café est restée viable après 1 mois d'ensilage. Par la suite, en utilisant des conditions aérobies et en imposant une microflore fongique sélectionnée, il a été possible d'obtenir une décaféination du substrat à des vitesses

différentes en fonction de la concentration des acides lactique et acétique obtenues en fin d'ensilage.

En fin de fermentation aérobie, l'azote deviendrait le facteur limitant de croissance pour les champignons filamenteux. Malgré cela, les bactéries lactiques qui sont restées viables au cours de phase aérobie se développent dès que l'on réinstalle des conditions anaérobies et produisent rapidement de fortes concentrations d'acide lactique. Il est probable qu'elles utilisent comme source d'azote, l'azote issu de la lyse du mycélium des champignons que l'on observe au cours des ensilages.

La parfaite et rapide acidification des ensilages, l'économie réalisée voir l'accumulation des glucides solubles, soulignent tout l'intérêt du contrôle et de l'orientation de la microflore à laquelle il faut parvenir. En effet, lorsque le ferment lactique est additionné d'un complexe enzymatique permettant l'hydrolyse des sucres pariétaux, la production d'acide lactique est optimale et l'ensemble des paramètres de l'ensilage parfaitement satisfaisants.

**CULTURES MIXTES :**

***Lactobacillus plantarum* A6**

**ET**

***Penicillium* V33A25**

## 8 - CULTURES MIXTES : *Lactobacillus plantarum* A6 ET *Penicillium* V33A25

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré le développement et la survie des populations microbiennes au cours de fermentations successives d'ensilage et de décaféination. Au cours de ce chapitre, nous nous attacherons à vérifier l'hypothèse émise au début de ce travail :

" La possibilité d'ensemencer la pulpe de café au temps 0 par un ferment mixte composé de champignons filamenteux et de bactéries lactiques, capable de dégrader la caféine et de stabiliser le produit fermenté par ensilage "

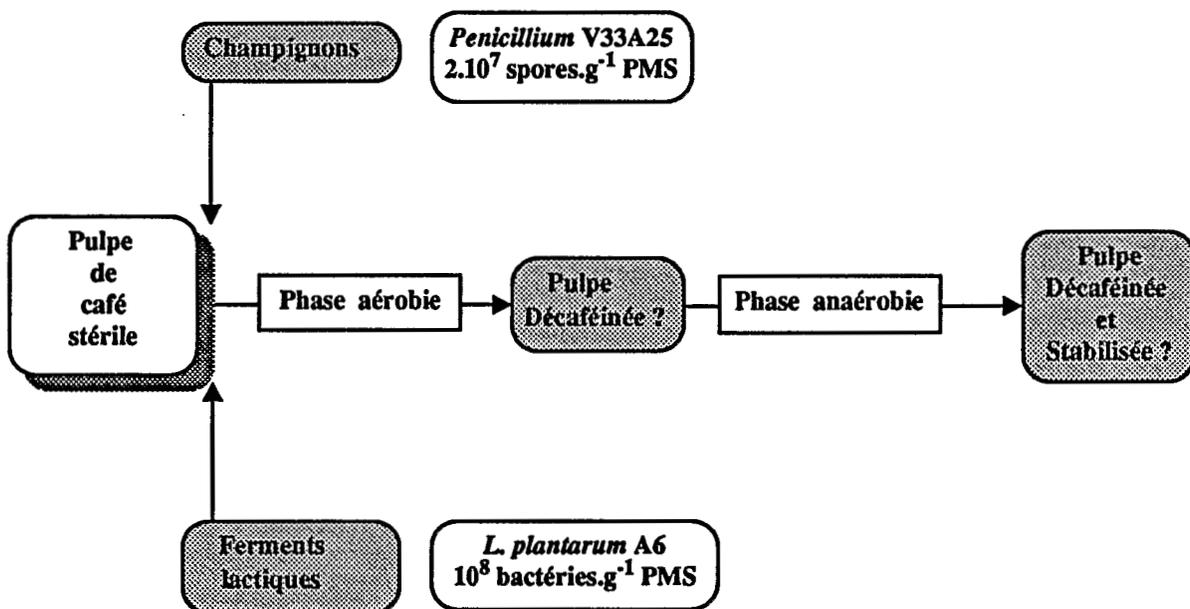


Figure 8.1 : Schéma de l'hypothèse initiale

Afin d'éliminer l'influence du facteur "microflore endogène de la pulpe", nous travaillerons dans ce dernier chapitre avec de la pulpe de café stérile. Nous utiliserons la souche de *Penicillium* V33A25 sélectionnée au cours du chapitre 6 pour ses capacités à dégrader la caféine en condition de fermentation aérobie. Parmi les trois ferments lactiques que nous avons précédemment étudié, nous avons choisi *L. plantarum* A6 car il s'agit d'un ferment ne contenant qu'une seule souche de bactérie lactique.

La pulpe de café stérilisée, est inoculée par une suspension microbienne mixte contenant  $2.10^7$  spores de *Penicillium* V33A25 et  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS de *L. plantarum* A6. La pulpe est d'abord fermentée en aérobose à 25 °C suivant le protocole décrit au § 3.4.1.

Nous avons déterminé tout au long de cette expérience, la microflore totale (bactéries, champignons et levures) en aérobiose (Figure 8.2) mais aussi la microflore lactique en anaérobiose (bactéries et levures).

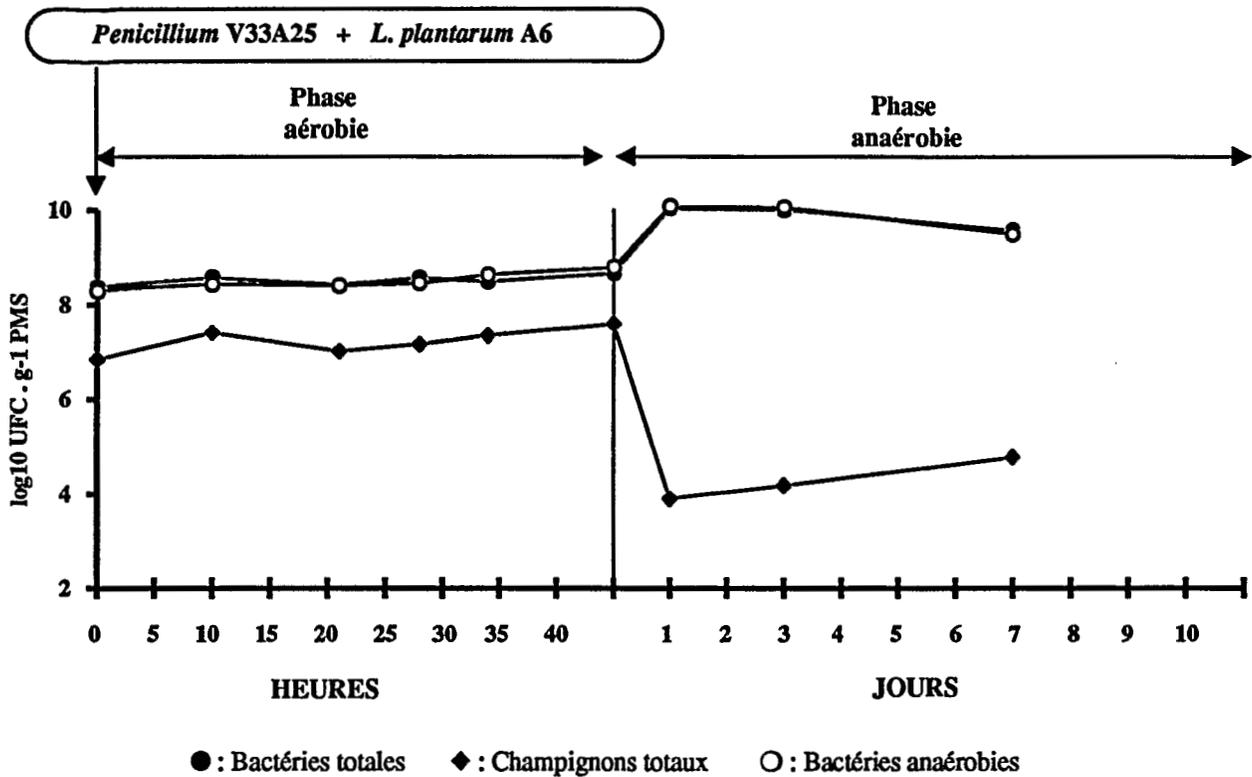
Nous avons suivi au cours de la fermentation aérobie avec *Penicillium* V33A25, l'évolution de la perte de poids, le pH, les taux d'acides lactique et acétique, le taux de caféine et les sucres réducteurs (Figure 8.3). L'analyse en continu de CO<sub>2</sub> (Figure 8.4) a été réalisée uniquement pour le procédé de décaféination à 25°C. Par ailleurs, l'observation microscopique a permis de suivre le développement du champignon. La fermentation a été stoppée lorsque apparaissent les premières formes de reproduction asexuée du champignon. Ce changement morphologique du champignon est corrélé à la phase de déclin de production du pourcentage de CO<sub>2</sub> qui survient après 45 heures de culture aérobie (Figure 8.4). Dès l'apparition de cette phase de déclin, la pulpe de café est immédiatement introduite dans des microsilos afin de la conserver pendant plusieurs semaines à l'obscurité et à 30 °C. Au cours de l'ensilage de la pulpe décaféinée, nous suivrons l'évolution des mêmes paramètres que précédemment.

### 8.1 - Evolution de la microflore

La figure 8.2 présente l'évolution de la microflore totale au cours de la fermentation aérobie puis lors des 7 premiers jours d'ensilage.

Pendant les 45 heures que dure la phase aérobie de cette fermentation, aucune des deux populations microbiennes n'évolue de manière significative. On n'observe pas non plus de phénomène de contamination. Le nombre des bactéries lactiques qui correspond au nombre total des bactéries, reste stable à 10<sup>8</sup> bactéries.g<sup>-1</sup> PMS. Dès que l'on instaure des conditions d'anaérobiose, les bactéries lactiques se multiplient. En 24 heures, elles passent de 10<sup>8</sup> à 10<sup>10</sup> bactéries.g<sup>-1</sup> PMS environ. Cette population reste stable pendant 4 jours environ puis commence à diminuer.

Le nombre des champignons filamenteux n'évolue que très peu au cours de la phase aérobie. Ceci est cohérent avec le fait que le développement du champignon est stoppé avant la phase de sporulation. Après instauration des conditions d'anaérobiose, on observe une chute très rapide (24 heures) et très importante du nombre des champignons. En effet, celui-ci passe de 10<sup>7</sup> à 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> PMS.



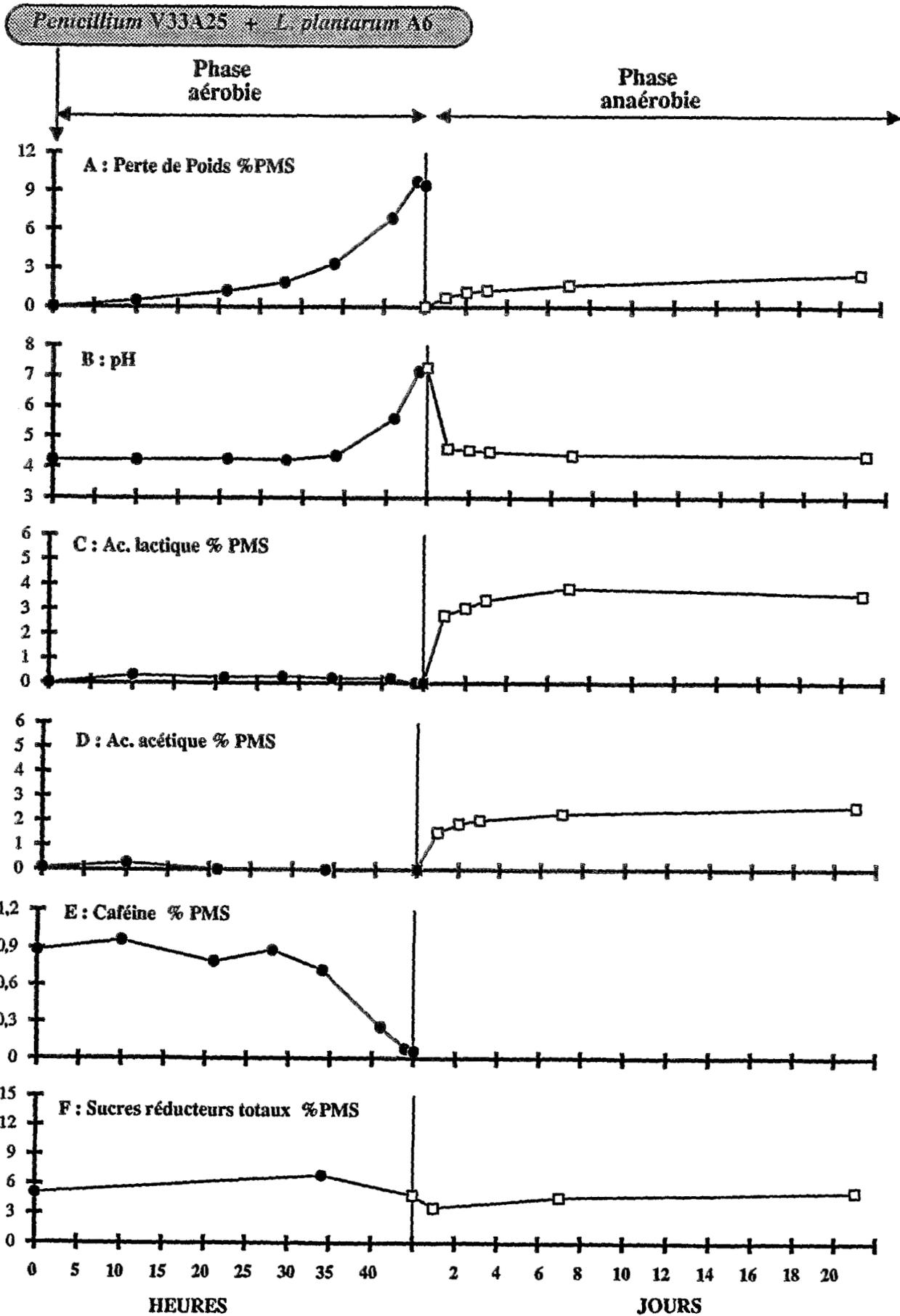
**Figure 8.2 : Evolution de la microflore au cours de la culture mixte**  
 Les microorganismes sont exprimés en Log du nombre par gramme de substrat poids sec.

## 8.2 - Evolution des paramètres physico-chimiques

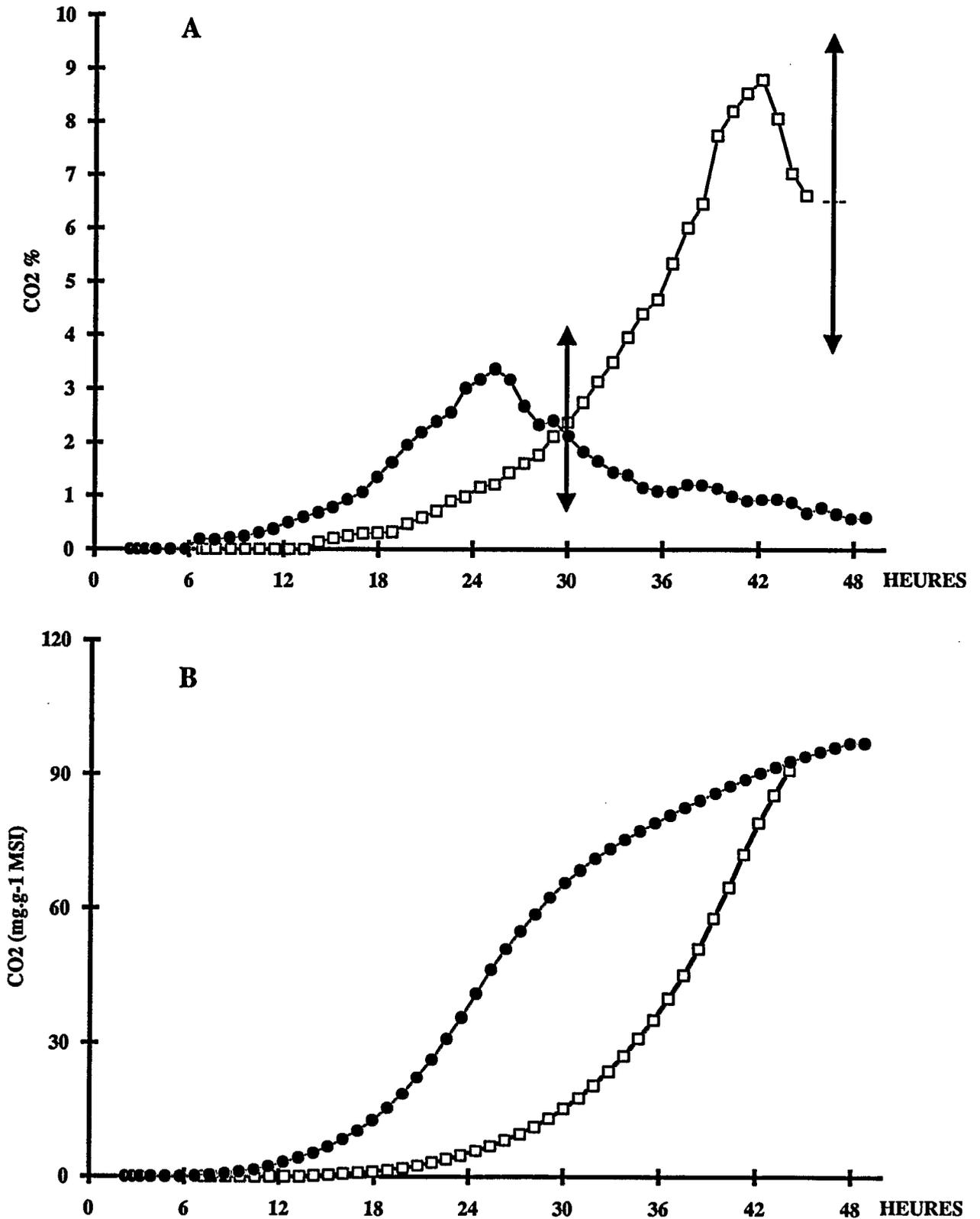
Les résultats sont présentés sur la figure 8.3. Ils sont parfaitement cohérents avec toutes les observations que nous avons pu faire dans les chapitres précédents c'est-à-dire :

- la perte en matière sèche (Figure 8.3 A) est plus importante au cours de la phase aérobie qu'au cours de la phase anaérobie. Elle correspond au développement du champignon et à la production de CO<sub>2</sub>. Lors de l'ensilage, elle reste inférieure à 3 % PMS et atteste d'une bonne conservation du matériel.

- le pH initial de la pulpe de la café reste stable à 4.2 au cours de la phase de germination des spores de champignon. Il augmente rapidement après 35 heures de fermentation aérobie. Cette augmentation est parfaitement corrélée à la dégradation de la caféine et au développement du champignon responsable de cette dégradation. Le pH atteint en fin de fermentation aérobie, une valeur de 7.0 environ. Il décroît très rapidement dès les premières 24 heures de la phase anaérobie correspondant à la mise en microsilos. Le pH se situe alors vers 4.5 et se stabilisera à des valeurs avoisinantes 4.2.



**Figure 8.3** : Evolution de la perte de poids, du pH, de l'acide lactique, de l'acide acétique, de la caféine et des sucres réducteurs totaux au cours de fermentations successives, aérobie (●) et anaérobie (□) de pulpe de café inoculée par un ferment mixte composé de *Penicillium V33A25* et de *L. plantarum A6*



**Figure 8.4** : Evolution du CO<sub>2</sub> au cours d'une fermentation aérobie de pulpe de café inoculée par un ferment mixte composé de *Penicillium V323A25* et de *L. plantarum A6* (□). Comparaison avec une fermentation témoin de pulpe de café inoculée par *Penicillium V33A25* seul (●).  
Les (←→) indiquent le début des phases de sporulation.

- la caféine est complètement dégradée au cours de la fermentation aérobie. Cette cinétique de dégradation est parfaitement corrélée à l'augmentation du pH et à la courbe de production de CO<sub>2</sub>, elle même liée au développement du champignon.
- il n'y a pas d'évolution significative du taux de sucres réducteurs.
- la production d'acide lactique au cours de l'ensilage est cohérente avec les résultats obtenus précédemment sur pulpe de café inoculée par *L. plantarum* A6 soit un pourcentage d'environ 3,5 % PMS. Cette production est rapide (2,75 % PMS d'acide lactique après 24 heures), elle se stabilise dès le troisième jour et reste constante jusqu'au 21ème jour.
- la production d'acide acétique au cours de l'ensilage présente le même profil que celui de l'acide lactique. La concentration d'acide acétique est inférieure à celle de l'acide lactique mais elle est cependant significative (1,5 % PMS après 24 heures). Son taux se stabilise dès le troisième jour à des valeurs avoisinantes 2,3 % PMS.
- au cours de l'ensilage, il n'y a pas de production d'acide butyrique, ni d'éthanol.

La figure 8.4 présente l'évolution du CO<sub>2</sub> au cours de la fermentation aérobie des cultures mixtes en comparaison avec une fermentation témoin de pulpe de café préalablement stérilisée inoculée par *Penicillium* V33A25 uniquement.

Les deux courbes d'évolution du CO<sub>2</sub> exprimé en % des effluents gazeux, sont nettement différentes, qualitativement et quantitativement. Tout d'abord, on remarque un retard de la germination des spores de *Penicillium* V33A25 dans le cas des cultures mixtes par rapport à la fermentation témoin. Ensuite, on note que le pourcentage de CO<sub>2</sub> dans les effluents gazeux des cultures mixtes est nettement plus important.

### 8.3 - Discussion

L'inoculation de pulpe de café préalablement stérilisée, a été réalisé au temps 0 par un ferment mixte contenant une souche de champignon filamenteux *Penicillium* V33A25 et une seule souche de bactérie lactique, *L. plantarum* A6. Ces deux populations ont été choisies pour leur aptitude à décaféiner et à conserver par acidification la pulpe de café.

Afin d'orienter tout d'abord le procédé vers la décaféination, on impose des conditions de culture aérobie pour favoriser la croissance du champignon. Puis, pour permettre la conservation du produit décaféiné, on instaure à un moment précis, des conditions d'anaérobiose pour stopper le développement des champignons et favoriser la croissance des bactéries lactiques.

La population des bactéries lactique reste stable et viable au cours de la phase aérobie. Les principaux facteurs tels que la présence d'oxygène, l'augmentation du pH, le développement du champignon dans le milieu de culture ne semblent pas avoir d'influence

sur la survie de la population des bactéries lactique. Ces observations sont cohérentes avec celles que nous avons pu faire précédemment au cours des fermentations successives (§ 7.1.1). Ce qui confirme que les bactéries lactiques sont des microorganismes particulièrement résistants.

La présence simultanée dans le ferment, de bactéries lactiques et de spores de champignons, provoque un retard de germination du *Penicillium* V33A25. Ce retard de germination par rapport à une culture témoin, représente une durée de 6 heures. Il peut s'expliquer par les légères mais sensibles productions d'acide lactique et d'acide acétique détectées au cours des premières heures de la fermentation aérobie (Figure 8.3 C). La disparition de l'acide acétique se situe entre 10 et 21 heures de culture ; la germination des spores débute après 14 heures de la phase aérobie. Ces observations confirment l'action inhibitrice exercée par l'acide acétique sur la germination des champignons (MOON, 1983).

Lorsque le champignon démarre sa croissance, la production de CO<sub>2</sub> est beaucoup plus élevée que celle observée sur une culture axénique. La durée du développement mycélien du champignon est plus longue. L'acide lactique aurait une action "ralentissante" sur le développement du champignon. On observe également qu'en présence de bactéries lactiques la phase de sporulation est considérablement retardée (18 heures). De ce point de vue, la présence de bactéries lactiques est bénéfique au procédé de décaféination, puisque l'on obtient une dégradation totale de la caféine sans noter pour autant, l'apparition des premières formes de reproduction asexuée du champignon. Ce résultat va dans le sens de notre hypothèse initiale.

Au moment où la décaféination de la pulpe de café a été obtenue, nous avons imposé des conditions anaérobies afin de favoriser le processus d'ensilage. L'absence d'aération a immédiatement déclenché la croissance des bactéries lactiques et inversement provoqué la diminution drastique de la population des champignons. On peut supposer que cette diminution est directement liée à l'état physiologique du *Penicillium* V33A25. A la mise en microsilos, celui-ci se trouvait sous forme de mycélium, donc sous une forme vulnérable étant donné que les formes de résistance des champignons aux agressions extérieures, sont plutôt les spores. Cependant, la population de champignons ne disparaît pas totalement. Elle se maintient à un taux de 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> PMS . Il s'agirait probablement de spores n'ayant pas germées au cours de la phase aérobie.

Pendant la phase anaérobie de cette culture mixte, les principaux paramètres physico-chimiques ont évolué d'une manière cohérente et confirment les résultats précédemment obtenus. En particulier, l'acidification rapide du milieu provient de la production importante d'acide lactique et acétique par *L. plantarum* A6. Le rapport acide acétique / acide lactique est proche de 0,5. Ce résultat confirme que *L. plantarum* A6 se comporte comme une bactérie lactique de type hétérofermentaire facultative lorsqu'elle est cultivée sur un milieu non amylacé et pauvre en azote.

Les sucres réducteurs n'ont pas été utilisés complètement par le champignon au cours de la phase aérobie étant donné que le facteur limitant de sa croissance est l'azote. Lors de l'ensilage qui suit cette décaféination, la production d'acide lactique par *L. plantarum* A6 provient principalement de la transformation de ces sucres fermentescibles. Cependant, on n'observe pas de diminution significative de ces sucres. La production d'acide lactique est pourtant plus élevée que celle obtenue sur un ensilage direct de pulpe de café par *L. plantarum* A6 (§ 5.2). On peut supposer que lors de la croissance du *Penicillium* V33A25, il y a eu production d'enzymes, qui libérées dans le milieu, ont hydrolysé les sucres pariétaux de la pulpe en sucres directement fermentescibles et assimilables par les bactéries lactiques. La légère augmentation du taux des sucres réducteurs au cours de l'ensilage de cette culture mixte confirme cette hypothèse.

#### 8.4 - Conclusion

L'utilisation d'un ferment mixte composé d'un champignon filamenteux et d'une bactérie lactique présélectionnés pour inoculer la pulpe de café axénique, nous a permis d'évaluer le rôle de la microflore imposée dans l'inoculum mixte sur la décaféination et la conservation par ensilage de ce sous-produit agricole.

La population des bactéries lactiques reste stable et viable au cours de la phase aérobie qui correspond à la décaféination. Les principaux facteurs tels que la présence d'oxygène, l'augmentation du pH, le développement du champignon dans le milieu de culture ne semblent pas avoir d'influence sur la survie des bactéries lactiques. Ce qui confirme que les bactéries lactiques sont des microorganismes particulièrement résistants.

La présence simultanée dans le ferment, de bactéries lactiques et de spores de champignons, provoque un retard de germination du *Penicillium* V33A25. Ce retard peut s'expliquer par la présence d'une faible concentration d'acide acétique au cours des premières heures de la fermentation aérobie. La germination des spores ne débute qu'après sa disparition. Ces observations confirment l'action inhibitrice exercée par l'acide acétique sur la germination des spores de champignons (MOON, 1983).

Au cours du procédé de décaféination avec des cultures mixtes la production de CO<sub>2</sub> est très importante, le développement mycélien dure beaucoup plus longtemps. De plus, en présence de bactéries lactiques qui produisent une faible mais détectable quantité d'acide lactique, la phase de sporulation de *Penicillium* V33A25 est considérablement retardée (18 heures). De ce point de vue, la présence de bactéries lactiques est bénéfique au procédé de décaféination, puisque l'on obtient une dégradation totale de la caféine sans noter pour autant, l'apparition des premières formes de reproduction asexuée du champignon. Ce résultat va dans le sens de notre hypothèse initiale.

Pendant la phase anaérobie de cette culture mixte, les principaux paramètres physico-chimiques ont évolué d'une manière satisfaisante et confirment les résultats précédemment obtenus. En particulier, l'acidification rapide du milieu provient de la production importante d'acide lactique et acétique par *L. plantarum* A6. Au désilage, aucun champignon ne s'est développé. Le produit présente une odeur agréable, légèrement acide.

**CONCLUSION**  
**GENERALE**

## 9 - CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons étudié le comportement de populations imposées de bactéries lactiques et de champignons filamenteux associées à la microflore naturellement présente dans la pulpe de café. L'objectif était la décaféination et la conservation par ensilage de ce sous-produit humide de l'industrie du café.

Les cultures mixtes de microorganismes sont des associations de populations microbiennes destinées à travailler conjointement ou successivement dans un écosystème bien défini sans se nuire mutuellement. Elles sont naturellement présentes dans les milieux environnementaux, mais elles peuvent être artificiellement imposées comme par exemple dans de nombreux procédés agro-alimentaire. Dans le milieu naturel, les populations microbiennes se développent spontanément et participent à la minéralisation de la matière organique. La pulpe de café est un substrat agricole, humide, riche en sucres, en protéines, en acides aminés et autres nutriments. L'ensemble de ces facteurs favorise le développement de la microflore endogène à la pulpe de café et pose le problème de sa conservation. Sans intervention extérieure, ce sous-produit se dégrade et contamine l'environnement. La méthode de l'ensilage, procédé de conservation anaérobie par fermentation lactique, serait une solution pour stabiliser la pulpe de café. Cette technique fait intervenir des bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes capables de produire de l'acide lactique et interviennent dans de nombreux procédés agro-alimentaires dont la conservation par acidification des produits végétaux. Ces bactéries anaérobies facultatives produisent, soit exclusivement de l'acide lactique (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérofermentaires facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol, de l'acide butyrique ou du CO<sub>2</sub> (bactéries hétérofermentaire strictes). Ce sont des microorganismes particulièrement exigeants. Outre la présence de sucres fermentescibles, ces bactéries ont également besoin pour se développer de certains acides aminés, de vitamines et d'oligo-éléments. Les bactéries lactiques peuvent aussi exercer une activité inhibitrice sur le développement de microorganismes par la production d'acide organique, de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines.

La pulpe de café présente un autre inconvénient majeur lié à sa composition chimique. En effet, la présence de substances ayant un effet anti-physiologique telles que la caféine et les composés phénoliques pose un problème certain pour son utilisation en alimentation animale. Il sera alors nécessaire de la détoxifier. Différentes techniques de décaféination sont connues. Parmi elles, nous avons utilisé la dégradation biologique de la caféine par des champignons filamenteux.

Les champignons filamenteux sont pour la plupart des microorganismes aérobies stricts, acido-tolérants et présentant une température optimale de croissance comprise entre 10 et 35 °C. Ils peuvent assimiler une large gamme de composés organiques carbonés et azotés grâce à leurs nombreuses enzymes extracellulaires, souvent inductibles. Ils sont capables de

synthétiser leurs propres vitamines mais sont hétérotrophes pour les oligo-éléments impliqués dans des groupements prosthétiques ou dans l'activation d'enzymes. Enfin, les champignons filamenteux se caractérisent par leur aptitude à se développer sur des milieux à faibles activités de l'eau (jusqu'à 0,65). Ils sont à la base de nombreux procédés biotechnologiques.

L'hypothèse initiale de ce travail de thèse était :

**" La possibilité d'ensemencer la pulpe de café au temps 0 par un ferment mixte composé de champignons filamenteux et de bactéries lactiques, capable de dégrader la caféine et de stabiliser le produit fermenté par ensilage."**

Mais au préalable à toute étude de conservation ou de valorisation de ce substrat, il était nécessaire de connaître, d'identifier et de quantifier la microflore endogène de la pulpe, aucune étude détaillée n'ayant été réalisée sur ce sujet.

Dans le premier chapitre de nos résultats, nous avons déterminé une importante microflore naturelle dans la pulpe et les coques de café. Celle-ci varie de  $7 \cdot 10^5$  à  $1,12 \cdot 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS suivant la variété du café, l'origine géographique et le type de traitement appliqué aux cerises de café. La population des levures est dominante dans la pulpe fraîche. Par contre, les bactéries deviennent largement majoritaires sur de la pulpe séchée au soleil. La microflore naturelle évolue très rapidement. La population de bactéries anaérobies a été estimée à  $3 \cdot 10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS sur pulpe de café fraîche. Les bactéries lactiques sont des microorganismes particulièrement résistants. En effet, sur de la pulpe de café séchée au soleil pendant 10 jours, puis stockée à 10 % d'humidité pendant 2 ans environ, on dénombre encore  $10^4$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS. Or, la bibliographie préconise un taux de  $10^5$  bactéries lactiques.g<sup>-1</sup> PMS à la mise en silo pour la réalisation d'un bon ensilage (BERTIN et HELING, 1985). Il est donc possible d'envisager une conservation de la pulpe de café par un ensilage naturel, en orientant les activités de la microflore endogène vers un développement des bactéries lactiques.

La microflore lactique endogène de la pulpe de café s'exprime dès que les conditions environnementales (anaérobiose et humidité) sont favorables. Après deux mois d'ensilage naturel, le taux des bactéries lactiques est de  $2 \cdot 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> PMS. Cette microflore appartient principalement au genre *Lactobacillus*. Les résultats physico-chimiques en fin d'ensilage sont parfaitement acceptables. Le métabolisme fermentaire dominant est de type hétérofermentaire facultatif c'est-à-dire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique mais pas d'acide butyrique, ni d'éthanol. La perte en matière sèche a été peu importante, le pH de la pulpe ensilée est de 3.9.

Nous avons d'autre part étudié les effets de l'apport de trois ferments lactiques différents (Pied de cuve ; *L. plantarum* A6 ; Ferment commercial DpH4) sur l'ensilage de la pulpe de café. Les ensilages de pulpe de café sont satisfaisants dans le cas des inoculations par le Pied de cuve et par *L. plantarum* A6. Cependant, l'influence de l'inoculation par un ferment composé d'une seule souche (*L. plantarum* A6) est peu significative par rapport à

*Conclusion générale*

l'ensilage naturel. L'intérêt réside dans la dominance et l'homogénéité de la population lactique imposées par un fort taux d'inoculation ( $10^8$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS). Par le pied de cuve, bien que le taux d'inoculation soit relativement faible ( $1,5 \cdot 10^4$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS), on introduit des souches performantes naturellement sélectionnées et adaptées au substrat, ce qui explique la réussite de cet ensilage.

Par contre, l'ensilage inoculé par le ferment commercial DpH4 au taux préconisé par le fabriquant ( $10^5$  bactéries.g<sup>-1</sup> PMS) a donné des résultats peu probants (pas de production d'acide lactique et faible développement des bactéries lactiques). On observe cependant, un effet positif de la présence du complexe cellulasique dans le ferment DpH4 par l'augmentation du taux des sucres réducteurs, substances nécessaires à la fermentation lactique.

Ces expériences ont permis de démontrer qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter les ensilages de pulpe de café avec des sources extérieures de sucres. En effet, bien que le taux initial de sucres directement fermentescibles dans la pulpe de café soit relativement faible (5 % PMS) par rapport au taux préconisé dans la littérature (12 à 13 %), on observe une conservation du taux de ces sucres au cours des ensilages. La production d'acide dépend donc de la dégradation des constituants des parois cellulaires du substrat, d'où l'intérêt d'utiliser des ferments lactiques associés à des complexes enzymatiques.

Quelque soit le type d'ensilage réalisé, la caféine de la pulpe de café présente à la mise en silos, n'a pas été dégradée. Dans la mesure où l'on souhaite utiliser ce substrat en alimentation animale, il est nécessaire de décaféiner la pulpe de café. Des chercheurs de l'ORSTOM et de la UAM d'Iztapalapa à Mexico ont sélectionné huit souches de champignons filamenteux capables de dégrader la caféine. Après un criblage en FMS de ces huit souches, nous avons choisi de continuer notre étude avec *Penicillium* V33A25, cette souche ayant déjà fait l'objet de plusieurs études et correspondant aux critères recherchés. Ce microorganisme dégrade la caféine de la pulpe de café à 94 % après 30 heures de fermentation aérobie et ceci avant de sporuler.

Au cours des Fermentations en Milieu Solide sur pulpe de café, nous avons recherché un facteur nous permettant de suivre la dégradation de la caféine et d'estimer le moment de la sporulation de *Penicillium* V33A25. La respirométrie est un facteur parfaitement corrélé au développement du champignon, donc à la dégradation de la caféine. On peut visualiser cette représentation sur un écran de moniteur tout au long de la fermentation sans effectuer de prélèvements et donc sans perturber le milieu.

La planification expérimentale nous a permis de déterminer l'effet relatif de différents facteurs sur la sporulation que l'on souhaite tardive, sur la dégradation de la caféine, sur la production de CO<sub>2</sub> ainsi que sur le pH final de la fermentation que l'on espère moindre, en vue d'associer *Penicillium* V33A25 à un procédé de conservation par ensilage. Le facteur essentiel est la température qui doit se situer vers 25 °C. Mais le résultat principal de cette expérience est que la stérilisation de la pulpe de café est sans influence sur la dégradation de la caféine.

Puisque *Penicillium V33A25* est capable de dégrader la caféine en présence de la microflore endogène de la pulpe de café, nous avons dans la suite de ce travail étudié l'évolution des populations microbiennes au cours de « fermentations successives ». Il s'agit de cultures mixtes de microorganismes qui se suivent dans le temps sans subir un arrêt définitif de croissance par une intervention externe (température, stérilisation). Dans un premier temps, nous avons imposé à la microflore endogène, des conditions anaérobies et l'apport de ferments lactiques qui ont permis d'obtenir une conservation par acidification sans perte importante de matière sèche. Puis, afin d'obtenir un produit décaféiné, le substrat a été inoculé massivement par *Penicillium V33A25* et cultivé en aérobiose. Dans un dernier temps, le produit décaféiné a été réensilé avec ou sans apport de ferments lactiques dans des conditions anaérobies. Il ressort de cette étude un certain nombre d'observations :

- le maintien à un taux stable de la population de bactéries lactiques au cours des fermentations aérobies de décaféination. Le passage en aérobiose, le développement du *Penicillium V33A25*, l'augmentation du pH, aucun de ces trois facteurs ne semble avoir d'influence sur la viabilité de cette population lactique.
- les taux d'acide lactique et d'acide acétique présents dans le milieu de culture influencent directement la germination des spores du *Penicillium V33A25* et le procédé de dégradation de la caféine. Tout d'abord, la microflore hétérotrophe aérobie consomme ces deux acides et le champignon se développe ensuite lorsque le taux d'acide lactique est inférieur à 1 % PMS et que l'acide acétique disparaît complètement.
- la dégradation de la caféine intervient lorsque les conditions de cultures deviennent favorables pour le développement du *Penicillium V33A25*. Dans ces conditions expérimentales, les champignons filamenteux restent les seuls microorganismes capables de dégrader la caféine en l'utilisant comme source d'azote.
- la corrélation entre la dégradation de la caféine, l'augmentation du pH, la sporulation du champignon et la représentation graphique de la vitesse de production du CO<sub>2</sub> est confirmée par ces expériences réalisées avec des cultures successives.
- au cours des phases aérobies, les pertes de poids en matière sèche sont importantes et proches de 12 % PMS. Ces pertes sont étroitement liées à la production de CO<sub>2</sub> par les microorganismes aérobies présents dans le milieu de culture. Mais elles ne sont pas forcément corrélées à la production de biomasse. Au cours des phases anaérobies, les pertes en matières sèches sont peu importantes et atteste d'une bonne conduite des ensilages. En effet, ces pertes sont dues en grande partie à l'activité fermentaire des bactéries et peuvent varier considérablement en fonction des souches impliquées. Elles peuvent atteindre 22 % avec *Enterobacter* (GOUET, 1994), alors qu'elles sont réduites au minimum avec *Lactobacillus plantarum* (1,1 à 2,9 % selon le fourrage).
- en fin de fermentation aérobie, l'azote serait devenu le facteur limitant. Malgré cela, les bactéries lactiques qui sont restées viables au cours des phases aérobies, se développent

dès que l'on réinstaura des conditions anaérobies et produisent rapidement de fortes concentrations d'acide lactique. Il est probable qu'elles utilisent comme source d'azote, l'azote issu de la lyse du mycélium des champignons que l'on observe au cours des ensilages.

- lorsque le ferment commercial DpH4 est utilisé à un taux de  $10^8$  cellules.g<sup>-1</sup> PMS, taux équivalent à celui utilisé pour *L. plantarum* A6, on remarque une production très importante d'acide lactique corrélée à une faible production d'acide acétique. L'ensilage inoculé par DpH4 obéirait à un processus de type homofermentaire. Par contre, la production d'acide acétique est importante au cours des ensilages inoculés par *L. plantarum* A6. Le rapport acide acétique sur acide lactique est de 0,5 environ. Le ferment *L. plantarum* A6 se comporterait sur un substrat non amylicé comme une bactérie de type hétérofermentaire facultative (pas de production d'acide butyrique, ni d'éthanol).

- le taux des sucres réducteurs augmente lorsque l'ensilage est inoculé par DpH4. En effet, la présence dans ce ferment d'un complexe enzymatique composé de cellulases permet d'hydrolyser les sucres pariétaux et de libérer des sucres réducteurs au cours de l'ensilage. Grâce à l'action de ces enzymes, la libération des sucres réducteurs et la production d'acide lactique sont importants. L'ensilage se stabilise très rapidement.

- *Penicillium* V33A25 produit vraisemblablement au cours de sa croissance des enzymes capables d'hydrolyser les polysaccharides de la pulpe de café en sucres simples. En effet, pour les ensilages réalisés sans apport exogène d'enzymes, la production d'acide lactique est plus importante lorsque ceux-ci sont effectués sur de la pulpe de café décaféinée par *Penicillium* V33A25. Elle est moindre lorsque le substrat est de la pulpe de café non décaféinée. Ces productions d'acide lactique sont liées à des concentrations en sucres réducteurs plus importantes.

Des expériences réalisées à partir de pulpe stérilisée ont permis de confirmer que bien que la microflore endogène de la pulpe de café soit importante, celle-ci ne semble pas avoir une influence particulière sur le développement des populations imposées lorsque l'on travaille avec des ferments lactiques ou de champignons filamenteux à haute concentration.

Lorsque l'on impose des microflores exogènes sur de la pulpe de café non stérile avec l'objectif d'obtenir un produit décaféiné et stabilisé, le facteur le plus important est l'aération des cultures ainsi que la qualité des ferments imposés. La faible perte en matière sèche due à la présence dans les ferments de *L. plantarum* ainsi que la parfaite et rapide acidification des ensilages, l'économie réalisée voire l'accumulation des glucides solubles, soulignent tout l'intérêt du contrôle et de l'orientation de la microflore à laquelle il faut parvenir en conditions anaérobies. Lorsque l'on impose des conditions aérobies et un ferment fongique adapté, on obtient une décaféination du substrat à des vitesses différentes en fonction de la concentration des acides lactiques et acétique présentes dans le milieu de culture.

Dans un dernier chapitre, nous avons suivi l'évolution d'un inoculum mixte de bactéries lactiques et de champignons filamenteux inoculé à de la pulpe de café stérilisée. Nous avons imposé successivement des conditions d'aérobiose puis d'anaérobiose qui ont permis d'orienter la croissance et le métabolisme des populations vers la dégradation de la caféine puis vers la production d'acide lactique en vue de conserver le produit décaféiné.

La population des bactéries lactiques reste stable et viable au cours de la phase aérobie qui correspond à la décaféination. Ce qui confirme que les bactéries lactiques sont des micro-organismes particulièrement résistants.

La présence simultanée dans le ferment, de bactéries lactiques et de spores de champignons, a provoqué un retard de germination du *Penicillium* V33A25. La présence d'une faible concentration d'acide acétique au cours des premières heures de la fermentation aérobie explique ce retard de germination. En effet, les spores ne germent qu'après la disparition de cet acide dans le milieu. Ces observations confirment l'action inhibitrice exercée par l'acide acétique sur la germination des champignons (MOON, 1983).

Au cours du procédé de décaféination avec des cultures mixtes, la production de CO<sub>2</sub> est très importante, le développement mycélien dure plus longtemps, la phase de sporulation de *Penicillium* V33A25 est considérablement retardée (18 heures). Or, les bactéries lactiques produisent au cours de cette phase aérobie une faible mais détectable quantité d'acide lactique. Leur présence est donc bénéfique au procédé de décaféination, puisque l'on obtient une dégradation totale de la caféine sans noter pour autant, l'apparition des premières formes de reproduction asexuée du champignon. Ce résultat va dans le sens de notre hypothèse initiale.

Pendant la phase anaérobie de cette culture mixte, les paramètres physico-chimiques ont évolué d'une manière satisfaisante et ont confirmé les résultats précédemment obtenus. En particulier, l'acidification rapide du milieu provient de la production importante d'acide lactique et acétique par *L. plantarum* A6. Ces productions sont liées à la consommation de sucres réducteurs. Leur concentration dans le milieu reste pourtant stable. Ces sucres résultent très certainement de l'hydrolyse des sucres pariétaux par des enzymes fongiques. Au désilage, aucun champignon ne s'est développé. Le produit présente une odeur agréable, légèrement acide.

En conclusion, ce travail nous a permis de démontrer qu'il est possible d'inoculer la pulpe de café naturelle avec un ferment mixte composé de bactéries lactiques et de champignons filamenteux sélectionnés. On obtient par FMS un produit décaféiné et par ensilage sa stabilisation par acidification.

Quelques analyses préliminaires réalisées en HPLC nous permettent de penser qu'au cours de l'ensilage, la majeure partie des composés phénoliques de la pulpe de café est dégradée. Une des poursuites de ce travail sera la confirmation de cette hypothèse par l'analyse de ces composés et la détermination de leur taux dans un produit final décaféiné et conservé par ensilage.

Un autre volet de recherche pourrait être de définir les enzymes produites par les champignons (décaféinases, pectinases, cellulases, ...) et orienter la sélection des souches en prenant en compte l'activité de ces enzymes.

Le stockage en l'état frais de la pulpe décaféinée permettrait de résoudre outre le problème de toxicité de ce substrat, le problème occasionné par la nature saisonnière de la production de ce résidu agricole. Nous envisageons donc la poursuite de ce travail en utilisant comme substrat de la pulpe de café fraîche. Si l'ensemble de nos hypothèses se vérifiait, il sera alors possible d'envisager d'effectuer des tests nutritionnels à partir de ce sous produit détoxiqué et ensilé.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## 10 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS M.R., DOUGAN J. (1981) Biological management of coffee processing wastes. *Tropical Sciences*, 23 (3), 177-196.
- AGUILAR M.D.P. (1983) Estudios sobre la utilizacion de carbohidratos por *Aspergillus niger* en sistema de fermentacion solida, usando pulpa de café como sustrato y diferentes niveles de fuentes de nitrogeno. Thèse Chimie Biologie, Université de San Carlos, Guatemala. 79 p.
- AGUIRRE B.F. (1966) La utilizacion industrial del grano de café y de sus subproductos. *Investigaciones Tecnológicas del ICAITI*, Guatemala, 1, 43 p.
- AIDOO K.E, HENDRY R., WOOD J.B. (1982) Solid substrate fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 28, 201-237.
- AINSWORTH G.C., SPARROW F.K., SUSSMAN A.S. (1973) The fungi, an advanced treatise. Volume 4 A. A taxonomic review with keys : Ascomycètes and fungi imperfecti. Academic Press, New York, San Francisco, London.
- ALEXOPOULOS C.J., MIMS C.W. (1979) Introductory mycology. Third Edition. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. 340-342.
- ANANDA ALWAR R.P., KRISHNAMURPHY RAO W., RAMAIAH P.K. (1990) Treatment methods of waste water emaning from modified pulper cum washer and their economics. *Indian Coffee*, 54 (3), 7-12.
- ANONYME (1991) Production mondiale de café vert en 1988/89 et 1989/90 (d'après F.O. Litch's International Coffee Report, Oct. 1990). *Café Cacao Thé*. 35 (1), 81.
- AQUIAHUATL M.A (1992) Detoxificacion de la pulpa de café : morfologia, fisiologia y bioquimica de hongos filamentosos que degradan la cafeina. Tesis de maestria en biologia. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. 72 p.
- AQUIAHUATL M.A., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., TREJO M.R. (1988) Coffee pulp detoxification by solid state fermentation : isolation, identification and physiological studies. *in* Proceedings of the seminar Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials, Raimbault M., ORSTOM (Eds), Montpellier, France, 13-26.
- ARCILA F. (1979) Investigaciones de CENICAFE sobre el uso y tratamiento de los residuos del beneficio del café. Publication CENICAFE, Bogota.
- ARIMA K. (1964) Microbial enzyme production. *in* Global impact of applied microbiology. Starr M.P. (Ed.), John Wiley and Sons Inc., New York, 277-294.
- ARNAUD M.J. (1987) The pharmacology of caffeine. *Progress in Drug Research*. 31, 273-313.
- ARNOULD R., BERTIN G., VANBELLE M., WATHELET J.M., RIVAS A. (1981) L'utilisation d'amidon et d'amylase comme conservateur d'ensilage. *Revue de l'Agriculture*, 34 (4), 953-971.

- ASHBELL G.C., PAHLOW B., DINTER B., WEINBERG Z.G. (1987) Dynamics of orange peel fermentation during ensilage. *Journal of Applied Bacteriology*, **63**, 275-279.
- ASHBELL G., WEINBERG Z.G. (1992) Top silage losses in horizontal silos. *Canadian Journal of Agricultural Engineering*, **34** (2), 171-175.
- ASHBELL G., WEINBERG Z.G. (1993) The effect of applying ammonia to corn, wheat, and sorghum upon ensiling. *Canadian Journal of Agricultural Engineering*, **35** (2), 113-117.
- AURIA A., HERNANDEZ S., RAIMBAULT M., REVAH S. (1990) Ion exchange resin : a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques*, **4** (6), 391-396.
- AURIA R., PALACIOS J., REVAH S. (1992) Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, 898-902.
- AX R.L., LODGE J.R. (1976) Effects of dietary caffeine on the reproductive performance of chickens. *Illinois Research, Illinois Agricultural Experimental Station, Université of Illinois*, **4**, 18-19.
- BAILLY H., SALLEE B., GARCIA GARCIA S. (1992) Protecto de tratamiento de aguas residuales de beneficios humedos. I. Diagnostico de la contaminacion. *Café Cacao Thé*, **26** (2), 129-136.
- BAJRACHARYA R., MUDGETT R.E. (1979) Solid-substrate fermentation of alfalfa for enhanced protein recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, **21**, 551-560.
- BAJRACHARYA R., MUDGETT R.E. (1980) Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 2219-2235.
- BARRIOS-GONZALEZ J., TOMASINI A., VINIEGRA-GONZALEZ, LOPEZ J. (1988) Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, **10**, 793-798.
- BARRIOS-GONZALEZ J., RODRIGUEZ G.M., TOMASINI A. (1990) Environmental and Nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, 329-333.
- BARSTOW L.M., DALE B.E., TENDERDY R.P. (1988) Evaporative temperature and moisture control in solid substrate fermentation. *Biotechnology Techniques*, **2** (4), 237-242.
- BECK (1972) Die quantitative und qualitative zusammensetzung milchsaurerebakterienpopulation im garfutter. *Sonderhefte zur Landwirtschaftlicher Forschung*, **27**, 55-63.
- BELIARD E., THUAULT D. (1989) Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. in *Microbiologie Alimentaire*, Bourgeois C.M., Larpent J.P. (Eds), Lavoisier Paris, **2**, 283-297.
- BELIARD E., THUAULT D., BOURGEOIS C. (1991) Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques : application à la conservation des produits carnés. Actes du Colloque Lactique 91, Caen, France, 12-13 septembre, 205-212.
- BELLET S., KERSHBAUM A., ASPE J. (1965) The effect of caffeine on free fatty acid. *Archives International Medical*, **116**, 750-752.

- BENDAÑA G.G. (1977) Efecto de tratamientos alcalinos por remojo o por contacto sobre el valor nutritivo y composición química de la pulpa de café fresca o ensilada. Tesis Maestría CESNA/INCAP, Guatemala.
- BERTIN G. (1986) Utilisation des enzymes polysaccharolytiques dans les milieux d'ensilage. Moyen de sélection et résultats pratiques. Thèse d'Etat en sciences. Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 209 p.
- BERTIN G., HELLINGS P.H. (1985) in : Symposium " L'ensilage : nouveaux aspects biologiques ", Paris 18 janvier, p. 59.
- BLANES R. (1982) Fermentation anaérobie de la pulpe de café avec production de méthane. Thèse de Doctorat es Science, USTL, Université de Montpellier, France. 121 p.
- BLECHER R., LINGENS F. (1977) The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* Strain. *Hoppe-Seyler's Z. Physiology Chemistry*, 358, 807-817.
- BOCCAS F., ROUSSOS S., GUTIERREZ M., SERRANO L., VINIEGRA G.G. (1994) Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system : selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of Food Science and Technology*, 31, (1), 22-26.
- BOHKENFOR B., FONSECA H. (1974) Calidad de ensilado con pulpa de café conteniendo diferentes niveles de humedad y varios aditivos. in Primera Reunion Internacional sobre la Utilizacion de Subproductos del Cafe en la Alimentacion Animal y otras Aplicaciones Agricolas e Industriales. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 41 p.
- BOLSEN K.K., LIN C., BRENT B.E., FEYERHERM A.M., URBAN J.E., AIMUTIS W.R. (1992) Effect of silages additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. *Journal of Dairy Science* , 75, 3066-3083.
- BOLSEN K.K., DICKERSON J.T., BRENT B.E., SONON R.N.Jr., DALKE B.S., LIN C., BOYER J.E.Jr. (1993) Rate and extent of top spoilage losses in horizontal silos. *Journal of Dairy Science*, 76, 2940-2962.
- BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY P., LARPENT J.P., VEAU P. (1985) Moisissures utiles et nuisibles. Paris, Masson.
- BRAHAM J.E. (1978) Pulpa de café en otras especies. in : Pulpa de café : composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 89-96.
- BRAHAM J.E., JARQUIN R., GONZALEZ J.M., BRESSANI R. (1973) Pulpa y pergamino de café. 3. Utilización de la pulpa de café en la alimentación de ruminantes. *Turrialba*, 23, 41-47.
- BRAHAM J.E., BRESSANI R. (1978) Pulpa de café : composición, tecnología y utilización. Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP.
- BRAUMAN A., TRECHE S., LEGROS O. (1992) Amélioration de la qualité des aliments fermentés à base de manioc. Opération Congo. Rapport de fin d'études dans le cadre d'un programme CEE-STD2 (contrat n° TS2A-0226), 54 p.

- BRESSANI R. (1978a) Subproductos del fruto de café. *in* Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 9-17.
- BRESSANI R. (1978b) Posibles usos de los subproductos del grano de café. *in* Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 31-43.
- BRESSANI R. (1978c) Factores antifisiologicos en la pulpa de café. *in* Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 143-152.
- BRESSANI R., ESTRADA E., JARQUIN R. (1972) Pulpa y pergamino de café. 1. Composicion química y contenido de aminoacidos de la proteina de la pulpa. *Turrialba*, 22 (3), 299-304.
- BRESSANI R., ESTRADA E., ELIAS G., JARQUIN R., DE VALLE L.U. (1973) Pulpa y pergamino de café. 4. Efecto de la pulpa de cafe deshidratada en la dieta de ratas y pollos. *Turrialba*, 23, 403-409.
- BRESSANI R., CABEZAS M.T., JARQUIN R., MURILLO B. (1974) The use of coffee processing waste as animal feed. *in* Proceedings Conf. Anim. Feeds Trop. Subtrop. Orig., London : Tropical Products Institute, 107-117.
- BRESSANI R., ELIAS L.G. (1976) Utilizacion de desechos de café en alimentacion de animales y materia prima industrial. Exposicion Pecuaria del Istmo Centroamericano (EXPICA 76), San Salvador, El Salvador, Document INCAP, Guatemala, 25 p.
- BUITRAGO (1987) Evaluacion del tratamiento de la pulpa de cafe por fermentacion en estado solido. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, 171 p.
- CABEZAS M.T., GONZALES J.M., BRESSANI R. (1974) Pulpa y pergamino de café. 5. Absorcion y retencion de nitrogeno en terneros alimentados con raciones elaboradas con pulpa de café. *Turrialba*, 24, 90-94.
- CABEZAS M.T., ESTRADA E., MURILLO B., GONZALEZ J.M., BRESSANI R. (1976) Pulpa y pergamino de café. 12. Efecto del almacenamiento sobre el valor nutritivo de la pulpa de café para terneros. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 26 (2), 203-215.
- CABEZAS M.T., FLORES A., EGANA J.E. (1978) Uso de pulpa de café en alimentacion de rumiantes. *in* Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 45-67.
- CALDERON G. (1981) Estudio sobre el posible mejoramiento químico nutricional de la pulpa de café por fermentacion oxidativa. Thèse Chimie Biologie, Université de San Carlos, Guatemala. 72 p.
- CALLE V.H. (1954) Estado actual de los trabajos sobre propagacion de microorganismos alimenticios en pulpa y mucilago de café. *Boletin Informativo Cenicafé*, 5, 22-29.
- CALLE V.H. (1957) Combustible methane gas from coffee pulp. *Indian Coffee*, 21 (7), 208-209.
- CALLE V.H. (1974a) Como producir gas combustible con pulpa de café. *Boletin Tecnico, Cenicafé*, 3, 11 p.

- CALLE V.H. (1974b) Proceso industrial para propagacion de levaduras. Federacion Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones del Café, Chinchina, Caldas, Colombia.
- CALLE V.H. (1977) Subproductos del cafe. *Boletin Tecnico, Cenicafé*, 6, 84 p.
- CAMPABADAL C. (1987) Utilizacion de la pulpa de café en la alimentacion de animales. 3ème Simposio International sobre utilizacion integral de los subproductos del café. Guatemala.
- CARPINTERO C.M., HENDERSON A.R., McDONALD P. (1979) The effect of some pretreatments on proteolysis during the ensiling of herbage. *Grass and Forage Science*, 34, 311-315.
- CARRIZALEZ V., RODRIGUEZ H., SARDINA I. (1981) Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 321-333.
- CARRIZALES V., FERRER J. (1984) Recycling agroindustrial waste by lactic fermentations : coffee pulp silage. Symposium International "Las fermentaciones lacticas en la industria alimentaria" 21-29 nov., Mexico. 26 p.
- CARRIZALES V., GONZALEZ J. (1984) Aprovechamiento de la pulpa de café. Estudio Experimental. Reporte final. Fundacion CIEPE, San Felipe, Venezuela.
- CASSAIGNE MENDOZA J. (1989) Evaluacion economica de la valorizacion biotecnologia de la pulpa de café. Informe final de Servicio Social, Universidad Autonoma Metropolitana Mexico, 54 p.
- CASTILLO M., BAILLY H., VIOLLE P., POMMARES P., SALLEE B. (1993) Traitement des eaux résiduaires d'usines de transformation du café par voie humide. Analyse d'un projet pilote dans la région Xalapa-Coatepec (Mexique). Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 15ème Colloque, Montpellier, 370-379.
- CASTRILLON M., SHIMADA A., CALDERON F. (1978) Manipulacion de la fermentacion en ensilajes de cana de azucar y su valor alimenticio para borregos. *Tec. Pec. Mex.* 35, 48.
- CATCHPOOLE V.R., HENZELL E.F. (1981) Silage and silage-making from tropical herbage species. *Herb. Abstr.*, 41, (3), 213-221.
- CELANIE E. (1982) Etude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Université Pierre et Marie Curie, 57 p.
- CHAMBERLAIN D.G. (1988) Effect of added glucose and xylose on the fermentation of perennial ryegrass silage inoculated with *L. plantarum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46, 129-138.
- CHAPLIN M.F. (1976) The use of ninhydrin as a reagent for the reversible modification of arginine residues in proteins. *Biochemistry Journal*, 155, 457-459.
- CHEN K.H., McFEETERS R.F., FLEMING H.P. (1983) *Journal of Food Science*, 48, 967.

- CHRISTEN P., RAIMBAULT M. (1991) Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters*, **13**, 521-526
- CHRISTENSEN M.S. (1981) Preliminary tests on the suitability of coffee pulp in the diets of Common Carp (*Cyprinus carpio* L) and Catfish (*Clarias mossambicus* peters). *Aquaculture*, **25**, 235-242.
- CLARKE R.J., MACRAE R. (1985) Coffee. Volume 1 : Chemistry. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York.
- CLAUDE B. (1979) Utilisation des sous-produits du café. *Café Cacao Thé*, **23** (2), 146-152.
- CLIFFORD M.N. (1985) Chlorogenic acids. in Clarke R.J., Macrae R. (Eds), Coffee. Vol. 1, Chemistry, London, Elsevier, 153-202.
- CLIFFORD M.N., RAMIREZ-MARTINEZ J.R. (1991) Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry*, **40**, 35-42.
- COCHET N., TYAGI R.D., GHOSE T.K., LEBEAULT J.M. (1984) ATP measurement for cellulase production control. *Biotechnology Letters*, **6** (3), 155-160.
- CORZO B.G., SIMAN G.E., RIVERA G.C., FONSECA A.Q., GUIJARRO I.A. (1986) Evaluacion economica de la produccion de pectinasas y cellulastas por fermentacion en medio solido en Mexico. Document UAM-I (Universidad Autonoma Metropolitana), Depart. Biotechnology, Mexico.
- COSTE R. (1989) Cafésiers et Cafés. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T. (Eds), Paris, 373 p.
- CUEVAS R. (1976) Optimizacion y factibilidad economica del proceso de decafeinizacion de la pulpa de café. Thèse Ciencias de alimentos y nutricion animal, Université de San Carlos, Guatemala, 57 p.
- CZAJKOWSKA D., ILNICKA OLEJNICZAK O. (1988) Biosynthesis of protein by microscopic fungi in solid state fermentation. 1. Selection of *Aspergillus* strain for enrichment of starchy raw materials in protein. *Acta Biotechnology*, **8** (5), 407-413.
- DAQUI L.E. (1975) Características químicas y nutricionales de la pulpa de café ensilada con pasto napier y planta de maiz. Tesis de Maestria. Universidad de San Carlos de Guatemala, facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, INCAP/CESNA, Guatemala.
- DAVIES O.D., HAIGH P.M. (1993) A comparison of formic acid and an acid-salt type additive on the performance of dairy cows in early lactation. *Grass and Forage Science*, **48**, 64-69.
- DAVILA A., ARANGO B. (1991) Produccion de lombrices sobre pulpa de café. in Memorias II Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (II SIBAC), Manizales, Colombia. sous presse
- DE LEON R. (1988) Brief description of SSF processes at Icaiti. in Proceedings of the seminar Solid State fermentation in bioconversion of agroindustrial raw materials, Raimbault M., ORSTOM (Eds), Montpellier, France. p. 139-143.
- DE LEON R., CALZADA F., HERRERA R., ROLZ C. (1980) Fungal biomass production from coffee pulp juice. *Journal of Fermentation and Technology*, **58** (6), 579-582.

- DELLAGLIO F., DE ROISSART H., TORRIANI S., CURK M.C., JANSSENS D. (1994) Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *in* Bactéries Lactiques, de Roissart H., Luquet F.M. (Eds), Loriga, Grenoble, France, 1, 25-116.
- DEMARQUILLY C. (1985) *in* Symposium " L'ensilage : nouveaux aspects biologiques ", Paris 18 janvier, p. 23.
- DE MENEZES H.C., SAMAAAN F.S., CLIFFORD M.N., ADAMS M.R. (1993) The fermentation of fresh coffee pulp for use in animal feed. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 15ème Colloque, Montpellier.
- DE MEO M., LAGET M., PHAN-TAN-LUU R., MATHIEU D., DUMENIL G. (1985) Applications des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation. *Biosciences*, 4, 17-20.
- DENIS S. (1992) La dégradation de la caféine par deux champignons filamenteux : *Aspergillus oryzae* et *Penicillium roqueforti*. Rapport de DEA, faculté des Sciences, Université de Montpellier, 30 p.
- DE ROISSART H. (1986) *in* Laits et Produits Laitiers. Luquet F. (Ed), Lavoisier Tec et Doc, 343.
- DE ROZO M.P., VELEZ J., GARCIA L.A. (1985) Efecto de los polifenoles de la pulpa de café en la absorcion de hierro. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 35, 287-296.
- DEWAR W.A., McDONALD P., WHITTENBURY R. (1963) Hydrolysis of grass hemicelluloses during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14, 411-417.
- DICKERSON J.T. (1986) Yield, composition and nutritive value of forage sorghum silages : hybrid and stage of maturity effects. M. Sc.Thesis, Kansas State University, Manhattan, KS.
- DOELLE H.W. (1975) Bacterial Metabolism. 2nd ed., Academic Press, New York.
- DOELLE H.W. (1985) Biotechnology of Solid Substrate fermentation in the production of Food, *ASEAN Food Journal*, 1 (1), 10-14.
- DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.H. (1980) Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- DUFOUR D. (1990) Contribution à l'étude de la physiologie des champignons pectolytiques, cultivés en milieu solide, en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases. Thèse Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, 262 p.
- DURAND A., CHEREAU D. (1988) A new pilot reactor for solid state fermentation : application to the protein enrichment of sugar beet pulp, *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 476-486.
- DURAND A., DE LA BROISE D., BLACHERE H. (1988) Laboratory scale bioreactor for solid state processes. *Journal of Biotechnology*, 8, 59-66.
- DUTHIL J. (1967) La production fourragère. 2nd ed., J.B. Ballière & fils eds, Paris, 294-310.

- ELIAS L.G. (1978) Composicion quimica de la pulpa de café y otros subproductos. *in Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion*, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 19-29.
- ELSON L.A., MORGAN W.T.J. (1933) A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochemistry Journal*, 27, 1824-1829.
- ELY L.O., MOON N.J., SUDWEEKS E.M. (1982) Chemical evaluation of *Lactobacillus* addition to alfalfa, corn, sorghum and wheat forage for ensiling. *Journal of Dairy Science*, 65, 1041-1046.
- ETCHELLS J.L., FLEMING H.P., BELL T.A. (1975) *in Lactic acid bacteria in beverages and food*, Carr, Cutting and Whiting (Eds), Academic Press london, p 281.
- FAVELA E., HUERTA S., ROUSSOS S., OLIVARES G., NAVA G., VINIEGRA G.G., GUTIERREZ M. (1989) Produccion de enzimas a partir de pulpa de café y su aplicacion en el beneficio humedo. *in Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC)*, Roussos, Licono y Gutierrez (Eds), Xalapa, Mexico, 145-151.
- FENLON D.R., WILSON J., WEDDELL J.R. (1989) The relationship between spoilage and *Listeria monocytogenes* contamination in bagged and wrapped big bale silage. *Grass and Forage Science*, 44, 97-100.
- FERRER (1984) Preservacion de la pulpa de café. Proyecto PI-051. Reporte final. Fundacion CIEPE, San Felipe, Venezuela.
- FINNEY A. (1989) Technologie de traitement du café Arabica «fully washed». Notes sur les pratiques d'usage appliquées en plantations privées en Afrique orientale. 1. Technologie de dépulpage, fermentation et lavage. *Café Cacao Thé*, 33 (2), 117-124.
- FLEMING H.P., McFEETERS R.F. (1981) *Food Technology*, 1, 84.
- FLORES R.A., GLATZ B.A., BERN C.J., VAN FOSSEN L.D. (1985) Preservation of high-moisture corn by microbial fermentation. *Journal of Food Protection*, 48, (5), 407-411.
- FLORES RECINOS F. (1976) Uso de la pulpa de café en la alimentacion de bovinos de carne y leche. CENTAMAG, El Salvador, 27 p.
- FUKUSHIMA D. (1982) Koji as an important source of enzymes in the orient and its unique composite systems of proteinases and peptidases. Use of enzymes in food technology, Versailles, CNERNA ( CNRS), 381-388.
- GAIME-PERRAUD I., ROUSSOS S., MARTINEZ-CARRERA D. (1993) Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micologia Neotropical Aplicada*, 6, 95-103.
- GARCIA R.C., BAYNES D.R. (1974) Cultivo de *Tilapia aurea* (Staindachner) en corrales de 100 m<sup>2</sup>, alimentada artificialmente con gallinazas y un alimento preparado con 30 % de pulpa de café. Ministerio de Agricultura y Ganaderia, Dir. Gen. de Pecursos Nat. Ren., El Salvador, 23 p.
- GERVAIS P., BAZELIN C. (1986) Development of a solid substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. *Biotechnology Letters*, 8, (3), 191-196.

- GERVAIS P., BENSOUSSAN M., GRAJEK W. (1988) Water activity and water content : comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 27, 389-392.
- GERVAIS P., SARRETTE M. (1990) Influence of age of mycelium and water activity of the medium on aroma production by *Trichoderma viride* grown on solide substrate. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69 (1), 46-50.
- GIBBONS W.R., WESTBY C.A. (1988) Technology and economics of ethanol production from fodder beets via solid-phase fermentation, *Biotechnology Letters*, 10, 665-670.
- GIBSON T., STIRLING A.C., KEDDIE R.M., ROSENBERGER R.F. (1958) Bacteriological changes in silage made at controlled temperatures. *Journal of General Microbiology*, 19, 112-129.
- GIRAUD E. (1993) Contribution à l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté. Thèse de Doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I, France, 139 p.
- GIRAUD E., BRAUMAN A., KELEKE S., LELONG B., RAIMBAULT M. (1991) Isolation and physiological study of amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 36, 379-383.
- GOMEZ F.R. (1978a) Evaluacion sobre el aprovechamiento de la pulpa de café en la dieta de alimentos balanceados para animales y abono organico en agricultura. Direccion adjunta de Recepcion e Industrializacion de Café. Gerancia de Produccion Industrial, 3, 75-79.
- GOMEZ F.R. (1978b) Planeamiento general en el manejo, tratamiento y aprovachamiento de residuos de café. Document IMNECAFE.
- GOMEZ-BRENES R.A. (1978) Procesamiento de pulpa de café : tratamientos quimicos. in Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 125-142.
- GONZALEZ J.M. (1973) VIII. Preparacion de ensilaje de pulpa de café. Boletin informativo de la Division de Ciencias Agricolas y de Alimentos del INCAP. AGA, 16-19.
- GONZALEZ-BLANCO, SAUCEDO-CASTAÑEDA G. VINIEGRA-GONZALEZ G. (1990) Protein enrichment of sugar cane byproducts using solid-state cultures of *Aspergillus terreus*. *Journal of Fermentation and Technology*, 70, 351-354.
- GOPALAKRISHNA RAO N., NATARAJAN C.P. (1974) Utilization of coffee by-products. *Indian Coffee*, 38 (1),
- GOUET P. (1979) Les bactéries des ensilages. La conservation des ensilages. Cycle approfondi d'alimentation animale. ADEPRINA-INRA, Chaire de Zootechnie, Paris, 18-40.
- GOUET P. (1994) Bactériologie des ensilages. in Bactéries Lactiques, De Roissart H., Luquet F.M. (Eds), Lorica, Grenoble, France, 2, 257-270.
- GRAJEK W. (1988) Cooling aspects of solid state cultures of mesophilic and thermophilic fungi. *Journal of Fermentation and Technology*, 66 (6), 675-679.

- GRAZIA L., SUZZI G. (1984) A survey of lactic bacteria in italian silage. *Journal of Applied Bacteriology*, **56**, 373-379.
- GUZMAN A.A.E. (1983) Efectos de nivel y naturaleza de fuentes de nitrogeno sobre el mejoramiento de la calidad quimico nutricional de la pulpa de café por fermentacion solida usando *Aspergillus niger*. Thèse Chimie Biologie, Université de San Carlos, Guatemala. 84 p.
- GUZMAN G., MARTINEZ-CARRERA D. (1985) Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café. *Ciencia y Desarrollo*, **65**, 41-48.
- HAIGH P.M. (1990) Effect of herbage water-soluble carbohydrate content and weather conditions at ensilage on the fermentation of grass silages made on commercial farms. *Grass and Forage Science*, **45**, 263-271.
- HANG Y.D., WOODAMS E.E. (1987) Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system, *Biotechnology Letters*, **9**, 183-186.
- HARM W. (1967) Differential effects of acriflavine and caffeine on various ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* strains and T1 phage. *Mutation Research*, **4**, 93.
- HAWKINGS G.E., DAVIS W.E (1970) Changes in plasma free fatty acids and triglycerides in dairy cattle after dosing with coffee or caffeine. *Journal of Dairy Science*, **53**, 52-55.
- HENDERSON A.R., McDONALD P. (1977) The effect of cellulase preparation on the chemical changes during the ensilage of grass in laboratory silos. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **28**, 486-490.
- HENDERSON A.R., McDONALD P. (1984) The effect of a range of commercial inoculants on the biochemical changes during the ensilage of grass in laboratory studies. *Research and Development in Agriculture*, **3**, 167-171.
- HERON S.J.E., WILKINSON J.F., DUFFUS C.M. (1993) Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**, 13-17.
- HESELTIME C.W. (1977a) Solid state fermentation - Part I. *Process Biochem.* **4**, 24-27.
- HESELTIME C.W. (1977b) Solid state fermentation - Part II. *Process Biochem.* **6**, 29-32.
- HESELTIME C.W. (1987) Solid State Fermentation - An Overview. *Int. Biodeterioration*, **23**, 79-89.
- HIMMELBLAU D.M. (1969) Process analysis by statistical methods. John Wiley, New York, 463 p.
- HRISTOV A.N. (1993) Effect of a commercial enzyme preparation on alfalfa silage fermentation and protein degradability. *Animal Feed Science and Technology*, **42**, 273-282.
- HUBERT J.C., DUPUY P. (1994) Conservation des fruits et des légumes. in *Bactéries Lactiques*, de Roissart H., Luquet F.M. (Eds), Lorica, Grenoble, France, **2**, 233-244.

- HUERTA OCHOA S. (1984) Efecto de la transferencia de masa y la acumulacion del calor metabolico en la fermentacion de cultivos solidos. Tesis Maestria en Ciencias, Ingenierio Quimico, Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico, 147 p.
- HUTCHINSON R.M. (1958) How gas helps coffee growers. *Indian Coffee*, **22**, 411-412.
- JACOBS J.L., McALLAN A.B. (1991) Enzymes as silage additives. 1. Silage quality, digestion, digestibility and performance in growing cattle. *Grass and Forage Science*, **46**, 63-72.
- JAFFE W., ORTIZ D.S. (1952) Notas sobre el Valor Alimenticio de la Pulpa de Café. *AGRO, Vénézuéla*, **23**, 31-37.
- JAKHMOLA R.C., WEDDELL J.R., GREENHALGH J.F.D. (1990) Ensiling grass with straw. 1. Effect of straw, cellulase enzyme and urea on chemical composition of grass/legume silages. *Animal Feed Science and Technology*, **28**, 39-50.
- JAKHMOLA R.C., WEDDELL J.R., GREENHALGH J.F.D. (1993) Ensiling grass with straw. 2. Effect of urea and enzyme additives on the feeding values of grass and straw silages. *Animal Feed Science and Technology*, **41**, 87-101.
- JARQUIN R. (1978) Pulpa de café en la alimentacion de cerdos. in Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 69-87.
- JARQUIN R., GONZALEZ J.M., BRAHAM J.E., BRESSANI R. (1973) Pulpa y pergamino de café. 2. Utilizacion de la pulpa en la alimentacion de rumiantes. *Turrialba*, **23**, 41-47.
- JARQUIN R., ROSALES F.A., GONZALEZ J.M., BRAHAM J.E., BRESSANI R. (1974) Pulpa y pergamino de café. 9. Uso de la pulpa de café en la alimentacion de cerdos en la fase de crecimiento y acabado. *Turrialba*, **24**, 41-46.
- JARQUIN R., BRESSANI R. (1977) Evaluacion nutricional en cerdos de la pulpa de café sometida a varios procesos de almacenamiento. *Turrialba*, **27**, 385-391.
- JARQUIN R., GOMEZ-BRENES R.A., BERDUCINO I.L., BRESSANI R. (1977) Efecto de los niveles proteicos y de la pulpa de café en raciones para cerdos criollos. *Turrialba*, **27**, 179-185.
- KARANTH N.G. (1991) Definition and characteristics of solid state fermentation. in Short term course on solid state fermentation. Karanth N.G. (Ed.), Central Food Technological Research Institute, Mysore, 12.1-12.2.
- KENNEDY S.J. (1990) An evaluation on three bacterial inoculants and formic acid as additives for first harvest grass. *Grass and Forage Science*, **45**, 281-288.
- KNAPP J.S., HOWELL J.A. (1980) Solid substrate fermentation. *Topics Enzyme Fermentation and Biotechnology*, Wiseman A. (Ed.), John Wiley, 4.
- KOSTENBERG D., MARCHAIM U. (1993) Solid waste from instant coffee industry as a substrate for anaerobic thermophilic digestion. *Water Science Techniques*, **27** (2), 97-107.
- KUMAR P.K.R., LONSANE B.K. (1987a) Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. *Biotechnology Letters*, **9**, 179-182.

- KUMAR P.K.R., LONSANE B.K. (1987b) Gibberellic acid by solid state fermentation : consistent and improved yields. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**, 267-271.
- KUNG L.Jr., SATTER L.D., JONES B.A., GENIN K.W., SUDOMA A.L., ENDERS G.L.Jr., KIM H.S. (1987) Microbial inoculation of low moisture alfalfa. *Journal of Dairy Science*, **70**, 2069-2077.
- KUNG L.Jr., CHEN J.H., KRECK E.M., KNUTSEN K. (1993) Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3763-3770.
- KURTZMAN R.H., SCHWIMMER S. (1971) Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experimentia*, **127** (4), 481-482.
- LACEY J. (1971) The microbiology of moist barley storage in unsealed silos. *Annals of Applied Biology*, **69**, 187-212.
- LADER M., BRUCE M. (1986) States of anxiety and their induction by drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **22**, 251-261.
- LANGSTON C.W., BOUMA C., CONNER R.M. (1962) Chemical and bacteriological changes in grass silage during early stages of fermentation. 2. Bacteriological changes. *Journal of Dairy Science*, **45**, 618-624.
- LARDES G. (1984) Aprovechamiento de los subproductos del café : el caso del El Salvador. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café (ISIC), Memoria del VI Congreso Nacional de Ingeniera. San Salvador.
- LARROCHE C., DESFARGES C., GROS J.B. (1986) Spore production of *Penicillium roquefortii* by simulated solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, **8**, 453-456.
- LARROCHE C., GROS J.B. (1989) Strategies for spore production by *Penicillium roquefortii* using solid state fermentation techniques. *Process Biochemistry*, 97-103.
- LAUKEVICS J.J., APSITE A.F., VIESTURS U.S., TENDERDY R.P. (1984) Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 1465-1474.
- LEQUERICA J.L., LAFUENTE B. (1977) Aprovechamiento de subproductos citricos. II. Fermentacion en medio semisolido de corteza de naranja por *Candida utilis*. *A.T.A.*, **17** (1), 71-77.
- LESDEMA O.V., DE RUIZ HOLGADO A.P., OLIVIER G. (1977) A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **42**, 123-133.
- LESINS K., SCHULZ F.H. (1968) Some effects of bacterial inoculation on silage making. *Canadian Journal of Animal Science*, **48**, 15-25.
- LEVEAU J.Y., BOUX M. (1980) La flore lactique. in "Techniques d'analyses et de contrôle dans les Industries Agroalimentaires", 3. Le contrôle microbiologique. Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (Eds) Technique documentation, Paris ADRIA, 106-129.

- LI X., HANSEN W.P., OTTERBY D.E., LINN J.G., KUEHN C.S. (1992) Effect of additives on fermentation of corn silage containing different amounts of added nitrate nitrogen. *Journal of Dairy Science*, **75**, 1555-1561.
- LIN C., BOLSEN K.K., BRENT B.E., HART R.A., DICKERSON J.T., FEYERHERM A.M., AIMUTIS W.R. (1992a) Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *Journal of Dairy Science*, **75**, 2484-2493.
- LIN C., BOLSEN K.K., BRENT B.E., FUNG D.Y.C. (1992b) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**, 375-387.
- LINDENFELSER L.A., CIEGLER A. (1975) Solid substrate fermentation for ochratoxin-A production. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, **30**, 30-35.
- LINDGREN S., LINGVALL P., KASPERSSON A., DE KARTZOW A., RYDBERG E. (1983) Effects of inoculants, grain and formic acid on silage fermentation. *Swedish Journal of Agricultural Research*, **13**, 91-100.
- LINDGREN S., PETTERSSON K., JONSSON A., LINGVALL P., KASPERSSON A. (1985) Silage inoculation. Selection strains, temperature, wilting and practical application. *Swedish Journal of Agricultural Research*, **15**, 9-18.
- LINDGREN S., BROMANDER A., PETTERSSON K. (1988) Evaluation of silage aditives using scale-model silos. *Swedish Journal of Agricultural Research*, **18**, 41-49.
- LONSANE B.K., GHILDYAL N.P., BUDIATMAN S., RAMAKRISHNA S.V. (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiology and Technology*, **7**, 258-265.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- LUIS L., RAMIREZ M. (1985) Estudio de los principales grupos de microorganismos presentes en los ensilados de pastos de estrella de jamaicano (*Cynodon nlemfuensis*). Silos y su relacion con parametros bioquimicos. *Pastos y Forrajes*, **8** (1), 141-155.
- MANDELS M., WEBER J. (1969) The production of cellulase advance. *Chemical Serie*, **95**, 391-414.
- MARTINEZ-CARRERA D., MORALES P., SOBAL M. (1989) Produccion de hongos comestibles sobre pulpa de café a nivel comercial. in *Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC)*, Roussos, Licona y Gutierrez (Eds), Xalapa, Mexico, 177-184.
- MARTINSSON K. (1992) A study of the efficacy of a bacterial inoculant and formic acid as additives for grass silage in terms of milk production. *Grass and Forage Science*, **47**, 189-198.
- MAYNE C.S. (1993) The effect of formic acid, sulphuric acid and a bacterial inoculant on silage fermentation and the food intake and milk production of lactating dairy cows. *Animal Production*, **56**, 29-42.

- MAYNE C.S., STEEN R.W.J. (1990) Recent research on silage additives for milk and beef production. Sixty-third annual report of the Agricultural Research Institute of Northern Ireland, 31-42.
- McCULLOUGH M.E. (1977) Silage and silage fermentation. *Feedstuffs*, 49-52.
- McDONALD P., HENDERSON A.R., RALTON I. (1973) Energy changes during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24, 827-834.
- McDONALD P., HENDERSON A.R., HERON S.J.E. (1991) *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed., Chalcombe Publications, Marlow, England. 340 pp.
- MEESKE R., ASHBELL G., WEINBERG Z.G., KIPNIS T. (1993) Ensiling forage sorghum at two stages of maturity with the addition of lactic acid bacterial inoculants. *Animal Feed Science and Technology*, 43, 165-175.
- MEGIAS M.D., GALLEGO J.A., MARTNEZ-TERUEL A., SANCHEZ M. (1992) Estudio comparativo de diferentes aditivos en el ensilado del subproducto de naranja. *Archivos de Zootecnia*, 41 (152), 179-182.
- MEGIAS M.D., MARTINEZ-TERUEL A., GALLEGO J.A., NUÑEZ J.M. (1993a) Chemical changes during the ensiling of orange peel. *Animal Feed Science and Technology*, 43, 269-274.
- MEGIAS M.D., MARTINEZ-TERUEL A., GALLEGO J.A., OLIVER P. (1993b) Fermentation and nutritive changes during artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-product ensilage. *Bioresource Technology*, 43, 237-239.
- MEIERING A.G. (1986) Pressure compensation for oxygen control in sealed silos. *Transactions of the ASAE*, 29 (1), 218-222.
- MIDDELHOVEN W.J., BAKKER C.M. (1982) Degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* Strain C3024. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15, 214-217.
- MILLER G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- MISRA M.C. (1991) Monitoring and control of parameters in solid state fermentation. *in* Short term course on solid state fermentation. Karanth N.G. (Ed.), Central Food Technological Research Institute, Mysore, 12.1-12.2.
- MOLINA M.R. (1978) Secado de pulpa de café. *in* Pulpa de café : composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 111-124.
- MOLINA M.R., DE LA FUENTE G., BATTEN M.A., BRESSANI R. (1974a) Decaffeinization; a process to detoxify coffee pulp. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 22 (6), 1055-1059.
- MOLINA M.R., DE LA FUENTE G., GUDIÉL H., BRESSANI R. (1974b) Pulpa y Pergamino de Café. 8. Estudios Básicos sobre la Deshidratación de la Pulpa de Café. *Turrialba*, 24 (3), 280-284.

- MOON N.J. (1981) Effect of inoculation of vegetable processing wastes with *Lactobacillus plantarum* on silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **32**, 675.
- MOON N.J. (1983) Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixture. *Journal of Applied Bacteriology*, **55**, 453-460.
- MOO-YOUNG M., MOREIRA A.R., TENDERDY R.P. (1983) Principles of solid-substrate fermentation. in *The filamentous fungi. Fungal technology*. Smith J.E., Berry D.R., Kristiansen B (Eds.) Edward Arnold Publisher, London, **4**, 117-144.
- MORALES A.I., CHACON G. (1981) Produccion de biogas a partir de pulpa de café. Document CICAFAE, San José, Costa Rica, 1-13.
- MORALES-OLGUIN J.J. (1989) Tratamiento de aguas residuales, reutilizacion y prensado de pulpa en el beneficio de café. in *Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC)*, Roussos, Licon y Gutierrez (Eds), Xalapa, Mexico, 77-93.
- MUCK R.E. (1989) Initial bacterial numbers on lucerne prior ensiling. *Grass and Forage Science*, **44**, 19-25.
- MUDGETT R.E. (1986) Solid-state fermentation. in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain A.L., Solomon N.A. (Eds.), Washington, American Society for Microbiology, 66-84.
- MURILLO B (1974) composicion quimica y fraccionamiento de los componentes celulares de la pulpa de café ensilada con aditivos. in *Reunion Internacional sobre la Utilizacion de Subproductos del Café en la Alimentacion Animal y otras Aplicaciones Agricolas e Industriales*. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 41 p.
- MURILLO B. (1978) Ensilaje de pulpa de café. in *Pulpa de café : composicion, tecnologia y utilizacion*, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 97-110.
- MURILLO B., DAQUI L., CABEZAS M.T., BRESSANI R. (1976) Pulpa y pergamino de café. 11. Caracteristicas quimicas de la pulpa de café ensilada con pasto napier y planta de maiz. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, **26**, 33-45.
- MURILLO B., CABEZAS M.T., JARQUIN R., BRESSANI R. (1977) Effect of bisulfite addition on the chemical composition and cellular content fractions of deshidrated coffee pulp. in *INCAP, Annual Report*.
- NARAHARA H., KOYAMA Y., YOSHIDA T., PICHANGKURA S., UEDA R., TAGUCHI H. (1982) Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Technology*, **60** (4), 311-319.
- NARAHARA H., KOYAMA Y., YOSHIDA T., ATTHASAMPPUNNA P., TAGUCHI H. (1984) Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Technology*, **62** (5), 453-459.
- NEGI S.C., LI W., JOFRIET J.C., OGILVIE J.R. (1992a) Physical characteristics of barley silage in tower silos. *Canadian Journal of Agricultural Engineering*, **34** (2), 165-169.

- NEGI S.C., JOFRIET J.C., ZHAO Q., LAW G.J. (1992b) Measurements of the at-rest pressure ratio of silage and grains. *Journal of Agriculture Engineering Research*, **52**, 273-283.
- NICHOLSON J.W.G., McQUEEN R.E., CHARMLEY E., BUSH R.S. (1991) Forage conservation in round bales or silage bags : effect on ensiling characteristics and animal performance. *Canadian Journal of Animal Science* , **71**, 1167-1180.
- NICHOLSON J.W.G., CHARMLEY E., BUSH R.S. (1992) Effect of moisture level on ensiling characteristics of alfalfa in big bales or chopped and compacted in plastic tubes. *Canadian Journal of Animal Science* , **72**, 347-357.
- NILSON P.E. (1956) some characteristics of silage microflora. *Archives of Microbiology*, **24**, 396-411.
- NISHIO N., TAI K., NAGAI S. (1979) Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation, *European Journal of Applied Microbiology* , **8**, 263-270.
- NOUT M.J.R., BOUWMEESTER H.M., HAAKSMA J., VAN DIJK H. (1993) Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *Journal of Agricultural Science*, **121**, 323-326.
- OGUR M., ROSEN G. (1950) Nucleic acids of plants tissues. 1. Extraction of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Archives of Biochemistry*, **25**, 265-276.
- OHYAMA Y., HARA S. (1975) Growth of yeast isolated from silages on various media and its relationship to aerobic deterioration of silages. *Japanese Journal of Zootechny Science*, **4**, 173.
- OHYAMA Y., MASAKI S., HARA S. (1975a) Factors influencing deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**, 1137.
- OHYAMA Y., MORICHI T., MASAKI S. (1975b) The effect of inoculation with *Lactobacillus plantarum* and addition of glucose at ensiling on the quality of aerated silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**, 1001-1008.
- O'KIELY P. (1992) The effect of ensiling sugarbeet pulp with grass on silage composition, effluent production and animal performance. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, **31**, 115-128.
- ORIOLE E. (1987) Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l' eau. Thèse de Doctorat Microbiologie, Institut National Sciences Appliquées de Toulouse, France, 133 p.
- ORIOLE E., RAIMBAULT, ROUSSOS S., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1988) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, **27**, 498-503.
- PACKER H.L., THOMAS C.R. (1990) Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **35**, 870-881.

- PAHLOW G. (1982) Improvement of the aerobic stability of silage by inoculant. *Das Wirtschaftseigene Futter*, 28, 107-122.
- PAHLOW G. (1991) Microbiology of inoculants, crops and silages. *Proceedings of Eurobac Symposium, Uppsala, 1986*, 9-18.
- PANDEY A. (1992) Recent process developments in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 27, 109-117.
- PATHAK N.N., MOHAN K., RANJHAN (1974) Voluntary intake and nutritives value of silage made of poultry droppings and green maize. *Indian Journal of Animal Science*, 45, 934.
- PEÑALOZA W. (1981) Fermentacion solida de la pulpa de café. Thèse Centro de Estudios Superiores en Nutricion y Ciencias de Alimentos (CESNA). Université de San Carlos, Guatemala. 51 p.
- PEÑALOZA W., MOLINA M.R., GOMEZ-BRENES R., BRESSANI R. (1985) Solid-State Fermentation : An alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Applied and Environnemental Microbiology*, 49 (2), 388-393.
- PERRY C.M., DONNELLY C.W. (1990) Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. *Journal of Food Protection*, 53, 642-647.
- PETTERSSON K.L., LINDGREN S. (1990) The influence of the carbohydrate fraction and additives on silage quality. *Grass and Forage Science*, 45, 223-233.
- PITT J.I. (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- PITT R.E., MUCK R.E., LEIBENSPERGER R.Y. (1985) A quantitative model of the ensilage process in lactate silages. *Grass and Forage Science*, 40, 279-303.
- PORRES C., ALVAREZ D., CALZADA J. (1993) Caffeine reduction in coffee pulp through silage. *Biotechnology Advances*, 11, 519-523.
- PORTER M.G. (1992) Comparison of sample preparation methods for the determination of the gross energy concentration of fresh silage. *Animal Feed Science and Technology*, 37, 201-208.
- PREBOIS J.P., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. (1985) Biofermenteur statique pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide. Brevet Français n° 7606677.
- PUTRAMENT A., BARANOWSKA H., BILINSKI T., PRAZMO W. (1972) On the specificity of caffeine effects. Inhibition by caffeine of RNA and protein synthesis in yeast and *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.*, 118, 373-379.
- RAIMBAULT M. (1980) Fermentation en Milieu Solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Thèse de Doctorat es Sciences, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291 p.

- RAIMBAULT M., ALAZARD D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **9**, 199-209.
- RAIMBAULT M., ROUSSOS S., ORIOL E., BARRIOS J., GUTIERREZ-ROJAS M., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1989) Procédé de culture de microorganismes sur supports solides imprégnés, en vue de la production et l'extraction d'enzymes et de métabolites. Brevet Français n°89.06558.
- RALL T.W. (1980) Central nervous stimulants. *in* The Pharmacological Basis of Therapeutics, Gilman A.G., Goodman L.D. & Gilman (Eds), Mac Millan, New York, 592-607.
- RAMIREZ-MARTINEZ J.R. (1988) Phenolic compounds in coffee pulp : quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , **43**, 135-144.
- RAMIREZ-MARTINEZ J.R., CLIFFORD M.N. (1990) Acidos fenolicos en pulpa de café. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 13ème Colloque, Paris, 205-210.
- RAPER K.B., FENNEL D.I. (1965) The genus *Aspergillus*. Krieger R.E. Publishing Compagny, Malabar, Florida.
- RATHBUN B.L., SHULER M.L. (1983) Heat and mass transfer effects in static-substrate fermentations chambers, *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 929-938.
- REVAH S., LEBEAULT J.M. (1988) Cheese flavours by solid state fermentation. *in* Proceedings of the seminar Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials, Raimbault M., ORSTOM (Eds), Montpellier, France, 53-61.
- RHODES R.A., NORTON W.L. (1975) Solid substrate fermentation of feedlot waste combined with feed grains. *Transactions of the ASAE*, 728-733.
- RIBEREAU-GAYON P. (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Dunod (Ed), Paris, 254 p.
- ROCHE N., VENAGUE A., DESGRANGES C., DURAND A. (1993) Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*, **11**, 677-683
- RODRIGUEZ J.A., RUIZ M.E., FONSECA H. (1974) Calidad del ensilaje de pulpa de café, con o sin melaza y efecto del tiempo de exposicion al ambiente de la pulpa previo a su ensilaje. *in* Primera Reunion Internacional sobre la Utilizacion de Subproductos del Cafe en la Alimentacion Animal y otras Aplicaciones Agricolas e Industriales. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 42 p.
- RODRIGUEZ J.A., TORRES A., ECHEVARRIA J., SAURA G. (1991) Energy balance in solid state fermentation processes. *Acta Biotechnology*, **11** (1), 9-14.
- ROLZ C., MENCHU J.F., CALZADA F., DE LEON R., GARCIA R. (1982) Biotechnology in washed coffee processing. *Process Biochemistry*, **17** (2), 8-10.
- ROLZ C., DE LEON R., DE ARRIOLA M.C. (1988a) Solid substrate growth of white rot fungi on coffee pulp. *Acta Biotechnology*, **13**, 211-223.

- ROLZ C., DE LEON R., DE ARRIOLA M.C. (1988b) Biological pretreatment of coffee pulp. *Biological Wastes*, **26**, 97-114.
- ROOKE J.A., BELL S.L., ARMSTRONG D.G. (1985) The chemical composition of grass silages prepared with and without pre-treatment with inoculants containing *Lactobacillus plantarum*. *Animal Feed Science and Technology*, **13**, 269-279.
- ROUSSOS S. (1982) Mise au point d'une méthode pour la taxonomie numérique de certains genres de champignons imparfaits. I. Les caractères morphologiques et biochimiques. *Cahiers ORSTOM, Série Biologie*, **45**, 25-34.
- ROUSSOS S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases, Thèse Doct. ès Sci., Université de Provence, France, 193 p.
- ROUSSOS S., AQUIAHUATL A., CASSAIGNE J., FAVELA E., GUTIEREZ M., HANNIBAL L., HUERTA S., NAVA G., RAIMBAULT M., RODRIGUEZ W., SALAS J.A., SANCHEZ R., TREJO M, VINIEGRA-GONZALEZ G. (1989) Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. in *Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC)*, Roussos, Licona y Gutierrez (Eds), Xalapa, Mexico, 121-143.
- ROUSSOS S., TREJO M.R., AQUIAHUATL A., GAIME-PERRAUD I., RAIMBAULT M., GUTIERREZ M., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1991) Decafeinización de la pulpa de café por fermentación sólida. in *Memorias II Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (II SIBAC)*, Manizales, Colombia. sous presse
- ROUSSOS S., RAIMBAULT M., GEOFFROY F., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B.K. (1992) Potential of ensiling for efficient management of spent residue from solid state fermentation system. *Biotechnology Techniques*, **6**, 87-90.
- ROUSSOS S., GAIME I., DENIS S., MARIN B., MARAKIS S., VINIEGRA G. (1993a) Biotechnological advances on coffee byproducts utilization. in *IFCON*, 7-12 septembre, 17 p.
- ROUSSOS S., RAIMBAULT M., PREBOIS J.P., LONSANE B.K. (1993b) Zymotis a large scale solid state fermenter : design and evaluation. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*, **42**, 37-52.
- ROUSSOS S., HANNIBAL L., AQUIAHUATL M.A., TREJO M., MARAKIS S. (1994a) Caffeine degradation by *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation of coffee pulp : critical effect of additional inorganic and organic nitrogen sources. *Journal of Food Science and Technology* , **31** (4), 316-319.
- ROUSSOS S., HANNIBAL L., DURAND A., DIEZ M., SAUCEDO G. (1994b) Enrichissement en protéines du tourteau de coprah : sélection de champignons filamenteux en FMS. *Oléagineux*, **49** (5), 235-247.
- ROUSSOS S., AQUIAHUATL M.A., TREJO-HERNANDEZ M.R., GAIME-PERRAUD I., FAVELA E., RAMAKRISHNA M., RAIMBAULT M., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1995) Biotechnological management of coffee pulp - isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, 756-762.

- RUIZ M.E., RUIZ A. (1977) Efecto del consumo de pasto verde sobre el consumo de pulpa de café y ganancia de peso en novillos. *Turrialba*, **27**, 23-28.
- RUST S.R., KIM H.S., ENDERS G.L. (1989) Effects of a microbial inoculant on fermentation characteristics and nutritional value of corn silage. *Journal of Production Agriculture*, **2**, 235-241.
- RUXTON G.D., GIBSON G.J. (1993) A critical introduction to mathematical modelling of the aerobic deterioration of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **62**, 209-217.
- RUXTON I.B., McDONALD P. (1974) The influence of oxygen on ensilage. I. Laboratory studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **25**, 107-115.
- RYOO D., MURPHY V.G., KARIM M.N., TENDERDY R.P. (1991) Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation. *Biotechnology Techniques*, **5** (1), 19-24.
- SALAZAR A.J., MESTRE M.A. (1991) Utilizacion del humus de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*, Sav.), obtenido a partir de pulpa de café como sustrato para almacigos de café. in *Memorias II Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (II SIBAC)*, Manizales, Colombia. sous presse
- SANCHEZ J.E. (1983) Etude de la fermentation du cacao "Essai de deux techniques nouvelles", Thèse Ing. Doct., Ecole National Supérieure Agronomique de Montpellier, France, 163 p.
- SANCHEZ J., YOUNG M.A., BERISTAIN B. (1985) Panorama general de producción y aprovechamientos de residuos agrícolas y agroindustriales en México. in *Memorias del taller regional PNUMA (CEPAL) Geplacea sobre : Utilizacion de residuos agrícolas y agroindustriales en América Latina y el Caribe* Hurtubia J., Monroy O. (Eds), 379-406.
- SATO K., NAGATANI M., NAKAMURA K., SATO S. (1983) Growth estimation of *Candida Lipolytica* from oxygen uptake in a solid state fermentation with forced aeration. *Journal of Fermentation and Technology*, **61** (6), 623-629.
- SATO K., YOSHIZAWA K. (1988) Growth and growth estimation of *Saccharomyces cerevisiae* in solid state ethanol fermentation. *Journal of Fermentation and Technology*, **66** (6), 667-673.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G. (1987) Contribucion al estudio de la fermentacion solida: Enriquecimiento proteico y conservacion por ensilaje, Tesis Maestria en Ciencias Ingenieria Quimica, Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico, 169 p.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G. (1991) Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castelii* cultivé sur support solide. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 212 p.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., GONZALEZ P.B., REVAH S. VINIEGRA G., RAIMBAULT M. (1990a) Effect of lactobacilli inoculation on Cassava (*Manihot esculenta*) Silage : fermentation pattern and kinetic analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **50**, 467-477.

- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., GUTIERREZ-ROJAS M., BACQUET G., RAIMBAULT M., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1990b) Heat transfer simulation in solid substrate fermentation.. *Biotechnology and Bioengineering* , 35, 802-808.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G. RAIMBAULT M. VINIEGRA-GONZALEZ G. (1990c) Energy of activation in cassava silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, 559-562.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., TREJO-HERNANDEZ M.R., LONSANE B.K., ROUSSOS., DUFOUR D., RAIMBAULT M. (1992) Analyse et contrôle des gaz en fermentation solide. 3ème Congrès de la Société Française de Microbiologie, Lyon, France.
- SAVOIE P., McGECHAN M.B., KNIGHT A.C. (1993) Feasibility of alternative grass silage systems . 1. Description of models. *Journal of Agriculture Engineering Research*, 56, 121-136.
- SCHWIMMER S., KURTZMAN R. H., HERTMANN E. (1971) Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 147, 109-113.
- SCHWIMMER S., KURTZMAN R. H. (1972) Fungal decaffeination of roast coffee infusions. *Journal of Food Science*, 37, 921-924.
- SEALE D.R. (1986) Bacterial inoculants as silages additives. *Journal of Applied Bacteriology*, Suppl., 9S-26S.
- SELMER-OLSEN I. (1993) Assessment of silage additives using fresh or freeze-stored silage crops. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, 7, 41-53.
- SELMER-OLSEN I., HENDERSON A.R., ROBERTSON S., MCGINN R. (1993) Cell wall degrading enzymes for silage. 2. Aerobic stability of enzyme-treated laboratory silage. *Grass and Forage Science*, 48, 55-63.
- SENEZ J.C., RAIMBAULT M., DESCHAMPS F. (1980) Enrichissement en protéines de substrats amylicés par fermentation en milieu solide. *Zootchnie*, 35, 36-39.
- SETÄLÄ J. (1989) Enzymes in grass silage production. *Food Biotechnology*, 2, 211-225.
- SHARPE E.M. (1981) The genus *Lactobacillus*. in *The prokaryotes*, Starr M.P. et coll. (Eds.), Springer Verlag Berlin.
- SHIMADA A. (1981) Empleo de forrajes de corte ensilados en la alimentacion de rumiantes. *Ganadero*, 6, p 1.
- SIVETZ M., DESROSIER N.W. (1979) Coffee technology. AVI Publishing Compagny, 715 p.
- SMITH E.J., HENDERSON A.R., OLDHAM J.D., WHITAKER D.A., AITCHISON K., ANDENSON D.H., KELLY J.M. (1993) The influence of an inoculant/enzyme preparation as an additive for grass silage offered in combination with three levels of concentrate supplementation on performance of lactating dairy cows. *Animal Production*, 56, 301-310.
- SMITH J.E., BERRY D.R. (1975) The filamentous fungi. Volume 1. Industrial mycology. Edward Arnold, London.

- SMITH P.R. (1980) the determination of chitin. A short literature review in relation to quantification of mould growth. *The British food manufacturing industries research association*, 124, 1-11.
- SNYMAN L.D., JOUBERT H.W. (1992) Near-infrared reflectance analysis of the fermentation characteristics of silage prepared by chemical treatment to prevent volatilisation of fermentation end products. *Animal Feed Science and Technology*, 37, 47-58.
- SOCCOL C. (1992) Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique. Thèse de Doctorat, UTC Compiègne, France, 218 p.
- SOCCOL C.R., RODRIGUEZ J.A., MARIN B., ROUSSOS S. RAIMBAULT M. (1993) Growth kinetics of *Rhizopus arrhizus* in solid state fermentation of treated cassava. *Biotechnology Techniques*, 7, 563-568.
- SOLIS-PEREIRA S.E. (1988) Obtencion y usas de mutantes hiperproductivas de *Aspergillus sp.*, en la produccion de pectinasas extracelulares a partir de desechos agro industriales. Thesis Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico.
- SOLOMON B.O., ERICKSON L.E., YANG S.S. (1983) Estimation of biomass concentration in the presence of solids for the purpose of parameter estimation. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 2469-2477.
- SOMOGYI J.C., NAGELI U. (1976) Antithiamine effect of coffee. *International Journal of Veterinary Nutrition Research*, 46, 149-153.
- SPOELSTRA S.F. (1991) Chemical and biological additives in forage conservation. in Forage conservation towards 2000. Braunschweig 1991.
- STIRLING A.C., WHITTENBURY R. (1963) Sources of lactic acid bacteria occurring in silage. *Journal of Applied Bacteriology*, 26, 86-90.
- SUAREZ DE CASTRO F. (1960) Valor de la pulpa de café como abono. ISIC, Boletin Informativo Suplemento, 5.
- SUGAMA S., OKAZAKI N. (1979) Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. *Journal of Fermentation and Technology*, 57, 408-412.
- SUZUKI T., WALLER G.R. (1988) Metabolism and analysis of caffeine and other methyl-xanthines in coffee, tea, cola, guarana and cacao. in Linskens H.F. & Jackson J.F. (Eds) Modern methods of plant analysis, New serie, Vol. 8, Analysis of nonalcoholic beverages, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 184-220.
- SZIGETI J. (1979) Contribution to the theory and practice of the acidification of feed and food. *Acta Alimentaria*, 8, 25-40.
- TAPIA I.M., HERRERA R., VINIEGRA G., GUTIERREZ M., ROUSSOS S. (1989) Pulpa de cafe fermentada : su uso como aditivo en la alimentacion de rumiantes. in Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC), Roussos, Licona y Gutierrez (Eds), Xalapa, Mexico, 153-175.

- TAUK S.M. (1986) Estudio da decomposiçao da polpa de café a 45°C através do uso de microorganismos isolados da polpa. *Turrialba*, 36 (3), 271-280.
- THIERRY A., CHICHEPORTICHE R. (1988) Use of ATP bioluminescence measurements for the estimation of biomass during biological humidification. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 28, 199-202.
- TILLEY J.M., TERRY R.A. (1963) A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 18, 104-111.
- TREJO-HERNANDEZ M.R. (1986) Produccion de zenzimas pecnicas po'r fermentacion en cultivo solido. Tésis de licenciatura, Universidad Autonoma de Mexico, 106 p.
- TREJO-HERNANDEZ M.R. (1992) Physiologie de croissance de souches de *Claviceps* : Production d'alcaloides par fermentation en milieu solide. Thèse de Doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I, France, 161 p.
- UNTEREINER S. (1989) Etude théorique de la fermentation du chou en choucroute, Diplôme de fin d'études, ENSIA-Massy France.
- VACCARINO C., LO CURTO R., TRIPODO M.M., PATANE R., LAGANA G., SCHACHTER S. (1989) SCP from orange peel by fermentation with fungi - Submerged and 'surface' fermentations. *Biological Wastes*, 29, 279-287.
- VANBELLE M, BERTIN G. (1989) in Enzymes systems for lignocellulose degradation. Coughlan M.P. (Ed.), Elsevier. 359.
- VANBELLE M., LADURON M., BERTIN G., HELTINGS P. (1994) Utilisation d'enzymes dans l'ensilage des fourages. in Bactéries Lactiques, de Roissart H., Luquet F.M. (Eds.), Lorica, Grenoble, France, 2, 271-292.
- VANDERGETEN J.P., VANSTALLEN (1979) La valorisation d'un sous-produit de sucrerie : la pulpe surpressée, I.B.A.B., 3, 119-.
- VAN VUUREN A.M., BERGSMA K., KROL-KRAMER F., VAN BEERS J.A.C. (1989) Effect of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of grass silage. *Grass and Forage Science*, 44, 223-230.
- VARGAS E. (1974) Valor nutritivo de la pulpa de café. Thèse Magister, Université de San Carlos, Faculté de Medecine Vétérinaire et de Zootechnie, Guatemala, 74 p.
- VARGAS E., CABEZAS M.T., MURILLO B., BRAHAM J.E., BRESSANI R. (1982) Efecto de altos niveles de pulpa de cafe deshidratada sobre el crecimiento y adaptacion de novillos juvenes. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 32, 973-989.
- VAUGHIN R.H. (1975) in Lactic acid bacteria in beverages and food. Carr, Cutting and Whiting (Eds.), Academic Press london, p 307.
- VELEZ A.J., GARCIA L.A., DE ROZO M.P. (1985) Interaccion in vitro entre los polifenoles de la pulpa de café y algunas proteinas. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 35 (2), 297-305.

- VERNET M. (1987) Les résidus de traitement du café : Analyse chimique et tentatives de valorisation. Mémoire Bibliographique. Maîtrise de Sciences et Techniques de Biologie Appliquées aux I.I.A., Brest, 38 p.
- VILLAGRAN L. (1981) Evaluacion quimica de tratamientos microbiologicos anaerobicos para reducir los factores antifisiologicos de la pulpa de café. Thèse Chimie Biologie, Université de San Carlos, Guatemala.
- VINIEGRA-GONZALEZ G., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1991) Fermentations en milieu solide comme moyen de valorisation des produits agricoles tropicaux au Mexique. *ORSTOM Actualités*, 34, 23-25.
- VITZTHUM O.G., BARTHELS M., KWASNY H. (1974) Détermination rapide de la caféine dans le café décaféiné ou non par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur d'azote. *Zeitschr. f. Lebensm. Unters. u. Forsch (Munich)*, 154 (3), 135-140.
- VOHARA P., KRATZNER F.M., JOSLYN M.A. (1966) The growth depressing and toxic effects of tannins to chicks. *Poultry Science*, 45, 135-142.
- WEINBERG Z.G., ASHBELL G., LISKER N. (1987) The effect of addition of lactic acid bacteria inoculum to wheat and corn silages in Israel. *Agronomie*, 7 (9), 709-713.
- WEINBERG Z.G., ASHBELL G., AZRIELI A. (1988) The effect of applying lactic bacteria at ensilage on the chemical and microbiological composition of vetch, wheat and alfalfa silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 64, 1-7.
- WEINBERG Z.G., ASHBELL G., AZRIELI A., BRUKENTAL I. (1993) Ensiling peas, ryegrass and wheat with additives of lactic acid bacteria (LAB) and cell wall degrading enzymes. *Grass and Forage Science*, 48, 70-78.
- WHITTENBURY R. (1961) An investigation of the lactic acid bacteria, Ph. D. Thesis, University of Edinburgh.
- WHITTENBURY R. (1968) Microbiology of grass silage. *Process of Biochemistry*, 3, 27-30.
- WILBAUX R. (1956) Les caféiers au Congo Belge. Technologie du café, Arabica et Robusta. Publication de la direction de l'agriculture, des forêts et de l'élevage. Bruxelles, 213 p.
- WINDHOLZ M., BUDAVARI S., BLUMETTI R.F., OTTERBEIN E.S. (1983) The Merck Index. Merck & Co (Eds), Rahway, N.J., USA. 10ème édition.
- WOOLFORD M.K. (1984) The Silage Fermentation. Marcel Dekker, Inc., New York, NY. 350 pp.
- WOOLFORD M.K., SAWCZYK M.K. (1984) An investigation into the effects of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 2. Use of selected strains in laboratory-scale silages. *Grass and Forage Science*, 39, 149-158.
- WOOLFOLK C.A. (1975) Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* Strain isolated by enrichment of caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *Journal of Bacteriology*, 123 (3), 1088-1106.

- YANG S.S., LING M.Y. (1989) Tetracycline production with sweet potato residue by solid state fermentation, *Biotechnology and Bioengineering* , **33**, 1021-1028.
- ZADRAZIL F. (1975) Influence of CO<sub>2</sub> concentration the mycelium growth of three *Pleurotus* species. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **1**, 327-335.
- ZULUAGA J. (1981) Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café (*Coffea arabica* L.). Thèse de Doctorat es Science, Faculté des Sciences, Université de Neuchatel, Suisse. 93 P.
- ZULUAGA J. (1989) Utilizacion integral de los subproductos del café. *in* Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC), Roussos, Licono y Gutierrez (Eds), Xalapa, Mexico, 63-76.
- ZULUAGA J., BONILLA C., QUIJANO R.M. (1975) Contribucion al estudio y utilizacion de la pulpa de café. 7ème Col. Intern. Quem. Café, Hamburg, ASIC Ed, Paris, 233-242
- ZULUAGA J., FRANCO M.A., ZAMBRANO D.A. (1991) Tratamiento integral del problema de contaminacion en el beneficio del cafe. *in* Memorias II Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (II SIBAC), Manizales, Colombia. sous presse

# ANNEXES

## ANNEXE 1

### COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

**Milieu Plate Count Agar (PCA) :** Produit Difco (Ref : 0479-01-1). 23,5 g.l<sup>-1</sup> ; Chauffer à ébullition pour dissoudre ; pH final 7,0

**Milieu Potatoes Dextrose Agar (PDA) :** Produit Difco (Ref : 0000-00-0). 39 g.l<sup>-1</sup> + l'antibiotique (Chloramphénicol : 0,25 g.l<sup>-1</sup>) ; Chauffer à ébullition pour dissoudre ; pH final 5,6.

**Milieu Sabouraud Dextrose Agar (SAB) :** Produit Difco (Ref : 0109-17-1). 65 g.l<sup>-1</sup> + l'antibiotique (Chloramphénicol : 0,25 g.l<sup>-1</sup>) ; Chauffer à ébullition pour dissoudre ; pH final 5,6.

**Milieu Lactobacilli MRS (MRS) :** Produit Difco (Ref : 0881-01-3). 55 g.l<sup>-1</sup> + 15 g d'agar ; Chauffer à ébullition pour dissoudre ; pH final 6,5

**Milieu gélosé à base d'Amidon :** Amidon : 2 g.l<sup>-1</sup> ; Urée : 0,05 g.l<sup>-1</sup> ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> : 0,15 g.l<sup>-1</sup> ; Agar : 15 g.l<sup>-1</sup> ; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M pour rectifier le pH et l'on ajoute l'antibiotique si nécessaire (Chloramphénicol : 0,25 g.l<sup>-1</sup>).

**Milieu de MANDELS et WEBER (1969) :** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> : 1,4 g.l<sup>-1</sup> ; KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> : 2,0 g.l<sup>-1</sup> ; Urée : 0,3 g.l<sup>-1</sup> ; CaCl<sub>2</sub> : 0,3 g.l<sup>-1</sup> ; Mg SO<sub>4</sub> : 0,3 g.l<sup>-1</sup> ; Carboxyl Méthyl Cellulose : 2,0 g.l<sup>-1</sup> ; Tween 80 : 1 ml.l<sup>-1</sup> ; Extrait de levure : 0,25 g.l<sup>-1</sup> ; Peptone : 0,25 g.l<sup>-1</sup> ; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 5 mg.l<sup>-1</sup> ; MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 1,56 mg.l<sup>-1</sup> ; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 1,40 mg.l<sup>-1</sup> ; CoCl<sub>2</sub> : 2 mg.l<sup>-1</sup> ; Agar : 15 g.l<sup>-1</sup>. On ajuste le pH et on ajoute l'antibiotique si nécessaire (Chloramphénicol : 0,25 g.l<sup>-1</sup>).

**Milieu gélosé à base de Pectine (BOCCAS et coll., 1994) :** Le milieu de culture utilisé contient seulement 2 g de pectine par litre, alors que le milieu initial en contenait 20. Il permet de plus visualiser directement les halos de pectinolyse, en 48 heures, sans avoir à ajouter d'indicateur coloré et sans avoir à utiliser deux couches de milieu comme cela était fait jusqu'alors (SOLIS-PEREIRA, 1988).

**Composition du milieu :** Pectine citrique de marque SIGMA : 2 g.l<sup>-1</sup> ; Urée : 0,05 g.l<sup>-1</sup> ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> : 0,15 g.l<sup>-1</sup> ; Agar : 20 g.l<sup>-1</sup> ; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M pour rectifier le pH ;

**Méthode :** Milieu A : 500 ml d'eau distillée + urée + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> + Agar + l'antibiotique si nécessaire (Chloramphénicol : 0,25 g.l<sup>-1</sup>) et l'on ajuste le pH.

Milieu B : 500 ml d'eau distillée.

Stérilisation des solutions A et B à l'autoclave 15 minutes à 121 °C. On ajoute à B ramené à 50 °C les 2 g.l<sup>-1</sup> de pectine. On dissout en chauffant légèrement (50 °C - 60 °C). Ne pas faire bouillir. Puis on mélange A et B et on coule en boîtes de Pétri.

**Milieu gélosé à base de Pulpe de Café :** Milieu minéral de base : KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> : 1,3 g.l<sup>-1</sup> ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,12 g.l<sup>-1</sup> ; MgSO<sub>4</sub> : 0,3 g.l<sup>-1</sup> ; CaCl<sub>2</sub> : 0,3 g.l<sup>-1</sup>. Préparation du milieu : 40 g de pulpe de café moulue dans 1 litre d'eau que l'on porte à ébullition. Attention aux débordements. Filtration sur papier filtre. On ajoute au filtrat la solution minérale et l'agar (20 g.l<sup>-1</sup>) ainsi que l'antibiotique si nécessaire (Chloramphénicol : 0,25 g.l<sup>-1</sup>). On ajuste le volume final à 1 litre et on rectifie le pH si nécessaire.

**Milieu gélosé à base de Café (CMS) :** C'est le même milieu que celui-ci décrit précédemment. On remplace la pulpe de café par du café moulu du commerce. Nous utilisons ici du café de marque Grand-Mère<sup>®</sup>. On ajoute 2 g.l<sup>-1</sup> de saccharose.

Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C.

**ANNEXE 2**  
**FICHES DESCRIPTIVES**  
**DES SOUCHES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX**  
**CULTIVEES SUR PDA A 25 °C**

## *Penicillium sp. V26A25*

Code utilisé pour la souche : V26A25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de VERACRUZ et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

<u>Aspect du thalle</u>	: Thalle initial blanc, puis apparition d'une couleur vert bleu. Aspect poudreux. Anneau orange en périphérie de la colonie, puis anneau blanc.
<u>Couleur des conidies</u>	: Vert-bleu.
<u>Pigments</u>	: Non
<u>Exsudat</u>	: Non
<u>Couleur sous la colonie</u>	: Orange foncé
<u>Aspect microscopique du mycélium</u>	: Lisse, septé, branché, vide, hyalin avec parfois quelques vacuoles.
<u>Aspect microscopique des conidies</u>	: Grosses, globuleuses, hyalines, lisses.
<u>Aspect microscopique des conidiophores</u>	: Longues ramifications se terminant par des penicilles. Lisses, longs, hyalins.
<u>Forme des pinceaux</u>	: Nombreux, verticillés.
<u>Observations</u>	: Cultivée sur PDA, 25 °C

## *Penicillium sp. V33A25*

Code utilisé pour la souche : V33A25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de VERACRUZ et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

<u>Aspect du thalle</u>	: Plusieurs petites colonies de 3 cm de diamètre. Thalles initial blanc, recouvert d'une couleur vert bronze. Aspect poudreux. Anneau orangé en périphérie.
<u>Couleur des conidies</u>	: Vert
<u>Pigments</u>	: Non
<u>Exsudat</u>	:
<u>Couleur sous la colonie</u>	: Orange clair
<u>Aspect microscopique du mycélium</u>	: Assez gros, vacuolé, septé, branché, lisse.
<u>Aspect microscopique des conidies</u>	: Globuleuses, lisses, de taille et de forme uniformes, vert pâle.
<u>Aspect microscopique des conidiophores</u>	: Assez larges, lisses, septé, comportant de nombreuses ramifications terminées par des pénicilles.
<u>Forme des pinceaux</u>	: Bi ou triverticillés.
<u>Observations</u>	: Cultivée sur PDA, 25 °C

## *Aspergillus sp. C16A25*

Code utilisé pour la souche : C16A25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de CHIAPAS et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

<u>Aspect du thalle</u>	: Mycélium blanc à peine visible, recouvert de têtes conidiennes aériennes de 2 à 3 mm de haut, noires, bien grosses.
<u>Couleur des conidies</u>	: Noires.
<u>Pigments</u>	: Non
<u>Exsudat</u>	: Non
<u>Couleur sous la colonie</u>	: Blanc à jaune très pale
<u>Aspect microscopique du mycélium</u>	:
<u>Aspect microscopique des conidies</u>	: Lisses à légèrement crénelées, grosses, brunes, plus foncées au centre ; plutôt globuleuses.
<u>Aspect microscopique des conidiophores</u>	: Longs, lisses, hyalins.
<u>Forme des têtes conidiennes</u>	: Grosses, globuleuses, radiées. Il est difficile de voir si elles sont uni ou bisériées.
<u>Observations</u>	: Cultivée sur PDA, 25 °C

## *Aspergillus sp. V12A25*

Code utilisé pour la souche : V12A25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de VERACRUZ et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

<u>Aspect du thalle</u>	: Thalle initial blanc, puis développement de têtes conidiennes jaune-vert olive. Les têtes sont souvent hautes (3-4 mm), parfois regroupées en touffes.
<u>Couleur des conidies</u>	: Vert olive.
<u>Pigments</u>	: Non
<u>Exsudat</u>	: Non
<u>Couleur sous la colonie</u>	: Incolore à très légèrement jaune vert
<u>Aspect microscopique du mycélium</u>	: Septié, verruqueux, vacuolé
<u>Aspect microscopique des conidies</u>	: Très grosses, globuleuses, lisses, marron, ôcre au centre.
<u>Aspect microscopique des conidiophores</u>	: Lisses en général, peu larges, longs.
<u>Forme des têtes conidiennes</u>	: Radiées, vésicules globuleuses ou subglobuleuses. Têtes unisériées avec une rangée de phialides assez grosses en forme de quilles.
<u>Observations</u>	: Cultivée sur PDA, 25 °C

## *Aspergillus sp. C17B25*

Code utilisé pour la souche : C16A25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de CHIAPAS et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

### Aspect du thalle

: Mycélium blanc à peine visible, recouvert de têtes conidiennes aériennes de 2 à 3 mm de haut. Les têtes sont bien grosses, rondes, brunes, séparées les unes des autres.

### Couleur des conidies

: Brun.

### Pigments

: Non

### Exsudat

: Non

### Couleur sous la colonie

: Blanc à jaune pâle

### Aspect microscopique du mycélium

: Assez large, bruns, lisses, hyalins, septés, avec quelques branchements.

### Aspect microscopique des conidies

: De façon générale, globuleuses, marron clair, lisses à très légèrement crénelées.

### Aspect microscopique des conidiophores

: Longs, large, verruqueux.

### Forme des têtes conidiennes

: Radiées, bisériées. Vésicules globuleuses. Les conidies sur la tête apparaissent jaune ôcre.

### Observations

: Cultivée sur PDA, 25 °C

## *Aspergillus sp. C11B25*

Code utilisé pour la souche : C11B25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de CHIAPAS et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

### Aspect du thalle

: Thalle initial blanc, duveteux, ras. Mycelium recouvert rapidement de têtes conidiennes vertes très foncées. Aspect poudreux, ras, vert bouteille à noir.

### Couleur des conidies

: Vert très foncé, à tendance noir.

### Pigments

: Non

### Exsudat

: Non

### Couleur sous la colonie

: Beige-vert

### Aspect microscopique du mycélium

: Fin, brun, septé, branché.

### Aspect microscopique des conidies

: Assez petites, globuleuses dans l'ensemble, parfois elliptiques, elles sont de couleur vert-clair, hyalines. Certaines plus grosses sont brunes au centre.

### Aspect microscopique des conidiophores

: Peu larges et longs, hyalins, lisses.

### Forme des têtes conidiennes

: Structure assez petites, têtes à tendance cylindriques, apparemment unisériées. Une rangée de phialides sur lesquelles restent accrochées les conidies en longs faisceaux bien droits. Vésicule.

### Observations

: Cultivée sur PDA, 25 °C

## *Aspergillus sp. C28B25*

Code utilisé pour la souche : C28B25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de CHIAPAS et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

<u>Aspect du thalle</u>	: Thalle à croissance rapide de couleur jaune clair recouvert de grosses têtes conidiennes noires.
<u>Couleur des conidies</u>	: Noires.
<u>Pigments</u>	: Non
<u>Exsudat</u>	: Non
<u>Couleur sous la colonie</u>	: Jaune très pale
<u>Aspect microscopique du mycélium</u>	: Très long, nombreuses ramifications, septé, assez fins
<u>Aspect microscopique des conidies</u>	: Spores globuleuses, rugeuses, légèrement brunes.
<u>Aspect microscopique des conidiophores</u>	: Très long et larges avec de nombreux granules réfringents à l'intérieur.
<u>Forme des têtes conidiennes</u>	: Grosses, globuleuses. Elles sont radiées.
<u>Observations</u>	: Cultivée sur PDA, 25 °C

## *Aspergillus sp. C23B25*

Code utilisé pour la souche : V12A25

Origine et provenance de la souche : Mexico, UAM, Isolat de café, purifié. Souche prélevée dans la région de CHIAPAS et isolée par S.ROUSSOS.

Intérêts : Production de pectinases et dégradation de la caféine

<u>Aspect du thalle</u>	: Mycélium fin, blanc à très légèrement jaune. Têtes conidiennes noires de différentes hauteurs et peu resserrées les unes contre les autres.
<u>Couleur des conidies</u>	: Noires.
<u>Pigments</u>	: Non
<u>Exsudat</u>	: Non
<u>Couleur sous la colonie</u>	: Blanc, très légèrement jaune
<u>Aspect microscopique du mycélium</u>	: Septé, vacuolé, brun.
<u>Aspect microscopique des conidies</u>	: Lisses à légèrement crénelées, globuleuses ou parfois ovoïde. Certaines apparaissent bleutées d'autres marrons avec de petites granulations.
<u>Aspect microscopique des conidiophores</u>	: Longs, larges, hyalins, lisses ou parfois très légèrement verruqueux.
<u>Forme des têtes conidiennes</u>	: Grosses, radiées, bisériées. Vésicules globuleuses. Conidies ôcre à noires.
<u>Observations</u>	: Cultivée sur PDA, 25 °C

## ANNEXE 3

### EXEMPLE DE FICHE TECHNIQUE DE LA MISE EN ŒUVRE D'UNE FMS AEROBIE

**SUPPORT /SUBSTRAT : PULPE DE CAFE      SOUCHE : V33A25**  
**BUT : DEGRADATION DE LA CAFEINE**

**Préparation Substrat :**

Pulpe de Café Mexicaine (A) Séchée au soleil. Humidité : 8,12 %

Broyage - Tamisage 0,8 mm < < 2 mm

**Préparation Inoculum :**

- Répartition du milieu CMS dans des erlens de 250 ml à raison de 40 ml par erlen. Autoclavage 15 mn à 120 °C.

- Autoclavage d'eau twennée.

- Ensemencement dans la masse avec 1,5 ml d'une solution de spore préparée à partir d'un pilulier (Pilulier sur gélose café + 4 ml d'eau twennée stérile)

- Etuve à 25 °C pendant 4 à 5 jours

CMS	g.l <sup>-1</sup>	Vol (ml)	Quantité (g)
Café moulu	40	500	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3	500	0,65
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,12	500	0,06
MgSO <sub>4</sub>	0,3	500	0,15
CaCl <sub>2</sub>	0,3	500	0,15
Agar	20	500	10
Saccharose	2	500	1
pH	5,6		

**Préparation de la solution de spores :**

- Autoclavage d'eau twennée + bille + barreau aimanté + éprouvette + erlen 250 ml

- Erlen sporulé + 50 ou 100 ml d'eau stérile twennée + bille + barreau

- Comptage cellule de Malassez

- Inoculum : 2.10<sup>7</sup> spores.g<sup>-1</sup>PMS

Moy	Cel/ml	Dilution	Cel/ml	Vol(ml)	Cel/erlen
30	3,00E+06	20	6,00E+07	163	9,78E+09

Vol inoculum final souhaité	Vol inoculum a prendre	Quantité d'eau à ajouter	Quantité de spore nécessaire
231	69	162	4,13E+09

Calcul des Quantités	Théorique	Réel
Nombre Colonne	7	7
Souche	V33A25	V33A25
Poids par Colonne (g)	80	80
Total pulpe Humide Théorique (g)	560	560
Total pulpe humide ajustée (g)	650	646
Humidité souhaitée (%)	68	68
Vol Eau (g)	442	439
Vol Sec (g)	208	207
Humidité pulpe (%)	8,12	8,12
Poids de pulpe sèche théorique	226	225
Eau théorique (ml)	424	421
( Sol minerale + sol spore - hum pulpe)		
Sol Spore 2 10.7 spores/g poids sec	4,16E+09	4,13E+09
Volume solution minérale (ml)	190	190
Volume solution de spores (ml)	234	231

**Préparation des colonnes :**

- Préparation de la solution minérale :

	g.l <sup>-1</sup>	Vol théo	Conc	Vol eau
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3	421	0,55	190
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,12	421	0,05	190
MgSO <sub>4</sub>	0,3	421	0,13	190
CaCl <sub>2</sub>	0,3	421	0,13	190

- Autoclavage des colonnes préparées + récipient de mélange + spatule + pince

- Autoclavage de la pulpe de café

- La solution de spores est ajustée à pH 4,4

- Mélange de la pulpe autoclavée avec la solution de spores

- Remplissage des colonnes sur la balance avec environ 80 g de matériel . Noter le poids précis de matériel.

- Faire un poids sec sur le matériel restant

- Stockage du reste du matériel comme T0 au congélateur

**Caractéristiques de la fermentation :**

Humidité                    ~ 68 %

Température                25 °C

Aération                    4 litres heure / 66 ml  
par minute

Poids par colonne        80 grammes

Inoculation :                ~ 10<sup>7</sup> spores .g<sup>-1</sup> PMS

**Planning de la Fermentation**

T0      Mardi                    18 h 45

Col	Mise en route	Prélèvement	Temps
13	Mardi 18 h 45	Mercredi 14 h 45	20 h
17	Mardi 18 h 45	Mercredi 19 h 45	25 h
18	Mardi 18 h 45	Mercredi 24 h 45	30 h
11	Mardi 22 h	Jeudi 11 h	37 h
12	Mardi 22 h	Jeudi 16 h	42 h
14	Mardi 18 h 45	Jeudi 19 h 45	45 h
19	Mardi 18 h 45	Jeudi 19 h 45	45 h

**Lancement du programme d'acquisition CPG :**

Mardi 21 h 1er injection (300) ; 22 h 25 (600)

Voie		Colonne		Temps de latence
1	V33A25A	14	I1 33A	2 h 15
2	V33A25B	19	I2 33B	2 h 15

## ANNEXE 4

### BASE DE CALCUL DES DIFFERENTES QUANTITES POUR UNE FMS AEROBIE

	A	B	C
1	Calcul des Quantités	Théorique	Réel
2	Nombre Colonne	Valeur	Valeur
3	Souche	X	X
4	Poids par Colonne (g)	Valeur	Valeur
5	Total pulpe Humide Théorique (g)	$B2 \times B4$	$C2 \times C4$
6	Total pulpe humide ajustée (g)	$B5 + B4$	$C11 + C12$
7	Humidité souhaitée (%)	Valeur	Valeur
8	Vol Eau (g)	$B6 \times B7 / 100$	$C9 \times C7 / (100 - C7)$
9	Vol Sec (g)	$B6 - B8$	$C11 \times (100 - C10) / 100$
10	Humidité pulpe (%)	Valeur	Valeur
11	Poids de pulpe seche théorique	$(B9 \times 100) / (100 - B10)$	B11
12	Eau théorique (ml)	$B8 - (B11 \times B10 / 100)$	$C8 - (C11 \times C10 / 100)$
13	( Sol minerale + sol spore - hum pulpe)		
14	Sol Spore 2 $10.7$ spores/g poids sec	$2.10^7 \times B9$	$2.10^7 \times C9$
15	Volume solution minérale (ml)	$B9 - (B11 \times B10 / 100)$	B15
16	Volume solution de spores (ml)	B12 - B15	C12 - C15

17



## ANNEXE 6

### DOSAGE DE LA CAFEINE

D'après la méthode de détermination rapide de la caféine dans le café décaféiné ou non par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur d'azote (VITZTHUM et coll., 1974).

#### A - EXTRACTION

La caféine est une base faible, on la déplace en solution aqueuse avec une base forte : la magnésie ( $Mg(OH)_2$ ) (hydroxyde de magnésium).

Les échantillons broyés selon une mouture moyenne (0,5 g à 1,5 g suivant le pourcentage de caféine attendu) sont extraits 10 minutes à ébullition par 50 ml d'eau distillée additionnée de 3 g de magnésie.

#### B - FILTRATION ET PREPARATION DES SOLUTIONS A DOSER

Les échantillons sont filtrés sous vide sur de la célite (poudre de diatomée) dans une fiole jaugée de 100 ml. On rince avec 50 ml d'eau distillée et on ajuste à 100 ml.

Pour le dosage, on met dans une fiole jaugée de 50 ml : 5 ml de l'échantillon filtré + 5 ml de la solution étalon d'aminoquinoléine. Après complément du volume, on injecte 1  $\mu$ l dans le chromatographe.

Lorsque le taux de caféine est inférieur à 0,5 % on met 10 ml de la solution étalon d'aminoquinoléine, puis on filtre sous vide et sur célite l'échantillon. On rince avec de l'eau distillée et on ajuste à 100 ml. 1  $\mu$ l de cette solution est injectée dans le chromatographe.

#### C - PREPARATION DES SOLUTIONS ETALONS

Solution étalon de caféine :

Solution A : 0,75g de caféine dans une fiole de 500 ml. ----->1,5 g.l<sup>-1</sup>

Solution B : On dilue la solution A 10 fois ----> 0,15 g.l<sup>-1</sup> de caféine

Solution étalon d'aminoquinoléine (étalon interne)

0,075 g d'aminoquinoléine dans une fiole de 500 ml -----> 0,15 g.l<sup>-1</sup>

#### Echantillon témoin

Dans une fiole de 50 ml : 5 ml de la solution B de caféine -----> 0,75 mg caféine

5 ml de la solution d'étalon interne -----> 0,75 mg d'aminoquinoléine

#### D - DOSAGE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les différents constituants d'un mélange pour les analyser qualitativement et quantitativement.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- colonne d'acier 80 cm x 1/8 garnie de chromosorb G, HP-AW-HMDS traité, 100-120 mesh, imprégné de 2 % Carbowax 20 M ; température de la colonne 220 °C ; injection directe sur la colonne.

- Gaz vecteur Helium 30 ml. mn<sup>-1</sup>.

- Détecteur à ionisation de flamme sensible à l'azote 35 ml. mn<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>, 230 ml. mn<sup>-1</sup> d'air ; température du détecteur 260 °C.

- Température de l'injecteur 240 °C.

## E - CALCUL

$$\% \text{ caféine} = \frac{A \times C \times E \times 100}{B \times D}$$

où :

A : surface du pic de caféine de l'échantillon

B : surface du pic de 5-aminoquinoline de l'échantillon

C : poids de 5-aminoquinoline ajoutée à l'échantillon en mg

D : poids de l'échantillon en mg

E : Facteur de correction standart

$$E = \text{Facteur de correction standart} = \frac{\text{mg de caféine / solution étalon} \times F}{\text{mg 5-aminoquinoline / solution étalon} \times G}$$

où :

F : surface du pic de 5-aminoquinoline de la solution étalon

G : surface du pic de caféine de la solution étalon

La concentration inférieure encore dosable est 0,005 % par rapport au café. La limite de sensibilité est 0,5 mg de caféine. La sensibilité du détecteur à azote est  $9 \cdot 10^{-12}$  A s.ng<sup>-1</sup> caféine.

## ANNEXE 7

### PROTOCOLE D'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES

#### PREPARATION DES ECHANTILLONS

- 1 - L'échantillon lyophilisé est réduit en poudre avec un broyeur à bille.  
On pèse 10 g que l'on met dans une fiole jaugée de 100 ml.  
On ajuste à 100 ml avec du méthanol 70 % (poids / poids)  
(Le méthanol dissout les phénols, les sucres, la caféine, les amino-acides,...)  
On agite à l'obscurité (papier alu) toute la nuit.
- 2 - Filtration sur fritté (si la solution obtenue n'est pas trop gélatineuse) dans un ballon.  
Rincer la fiole avec du méthanol.
- 3 - Evaporation du méthanol au rotovapor (15 - 20 min) Température max : 40 - 45 °C  
On obtient un concentré (≈ 20 ml)
- 4 - On verse le concentré dans une éprouvette -----> 22 ml  
On ajoute du sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 40 % -----> 22 ml  
(On obtient donc une solution de sulfate d'ammonium à 20 %) -----> 44 ml  
On ajoute 800 µl d'acide phosphorique à 85 % -----> 45 ml
- 5 - Lavage éther de pétrole  
On verse les 45 ml dans une ampoule à décanter  
On ajoute 45 ml d'éther de pétrole pour dépigmenter  
(Les pigments interfèrent dans le dosage final)  
On réalise ce lavage 3 fois  
On récupère la phase aqueuse et on conserve à part les phases éther
- 6 - Lavage chloroforme  
On reprend les 45 ml de la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter  
On ajoute 45 ml de chloroforme pour enlever principalement la caféine mais aussi les cires non solubles dans l'éther de pétrole  
On réalise ce lavage 3 fois  
On récupère la phase aqueuse et on conserve à part les phases chloroforme  
Pour doser la caféine on évapore au rotovapor jusqu'au résidu sec la phase chloroforme et on reprend ce résidu dans 5 ml avec du méthanol 70 %. Injection à l'HPLC.
- 7 - On enlève les traces de solvant au rotovapor. Température max 40 - 45 °C
- 8 - Extraction à l'acétate d'éthyle  
Dans l'ampoule à décanter rincée à l'eau on met : - 45 ml d'acétate d'éthyle  
- les 45 ml de la phase aqueuse  
(Attention à l'agitation. Faire doucement pour éviter l'émulsion)  
On récupère l'acétate d'éthyle (phase supérieure) dans un erlen de 500 ml  
On réalise l'extraction 4 fois en rinçant bien le flacon à chaque fois avec de l'acétate d'éthyle
- 9 - On sèche le résidu d'eau dans l'erlen contenant l'acétate d'éthyle avec deux spatules de sulfate de sodium anhydre (plus une troisième spatule de sécurité)
- 10 - On filtre sur papier filtre et on récupère le filtrat dans un ballon.  
On rince l'erlen et le sulfate de sodium cristallisé avec de l'acétate d'éthyle.
- 11 - Evaporation de l'acétate d'éthyle au rotovapor. Température max 40 °C  
(A surveiller de près, risque « d'explosion »)  
On évapore jusqu'au résidu sec.

**12 - On reprend le résidu sec avec 10 ml de méthanol pur**

**13 - Injection à l'HPLC**

Condition de la chromatographie

Colonne : C18 de 25 cm avec des particules de 5 µm de diamètre

Débit : 1ml par minute

Volume d'injection : 10 µl

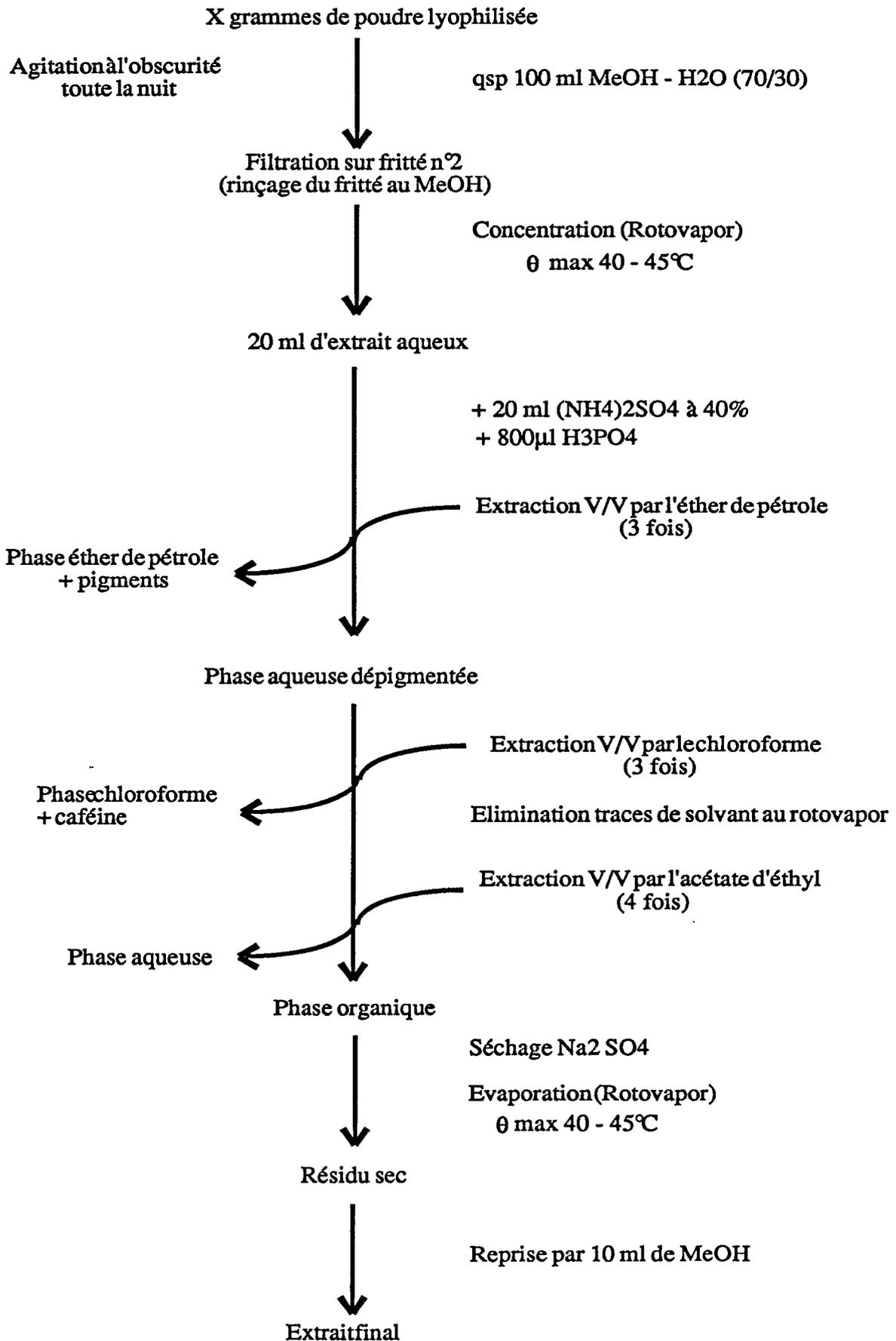
Phase mobile : A : H<sub>2</sub>O, 2 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

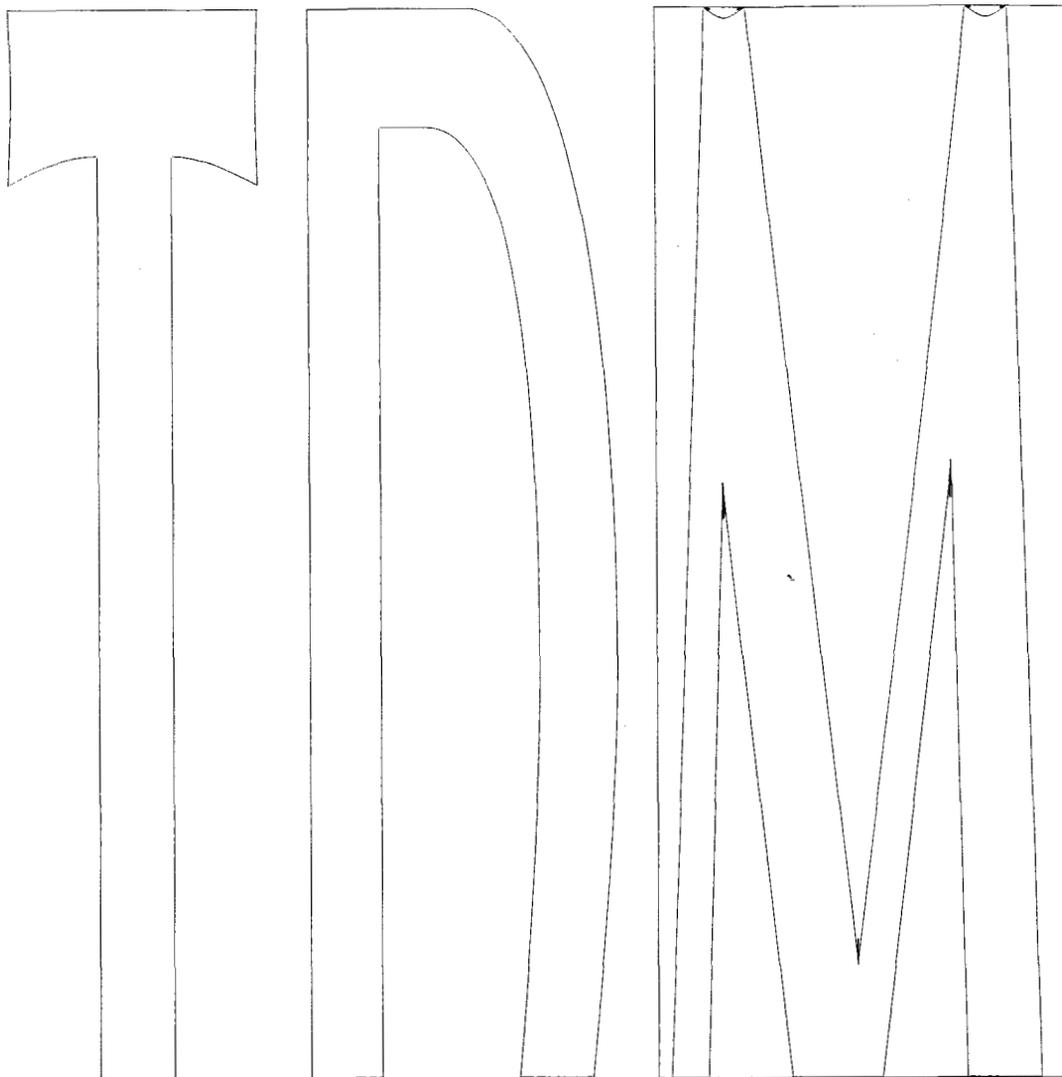
B : Méthanol

Le gradient utilisé, nécessaire à la séparation des polyphénols est le suivant :

- en 48 minutes (de T 0 à T 48 min) on passe de 5 à 100 % de B (méthanol)
- de 48 à 53 minutes on reste à 100 % de méthanol (lavage)

Détecteur : UV (280 nm)





## Thèses et documents microfichés

**Mots-clés**  
Pulpe de café, Fermentation en milieu solide, Ensilage, Bactéries lactiques,  
Champignons filamenteux.

**CRSICOM**  
éditions

209-213, rue La Fayette  
75480 Paris cedex 10

ISSN : 0767-922X  
ISBN : 2-7099-1329-1

Diffusion :  
32, avenue Henri Varagnat  
93143 Bondy cedex