

Caractérisation des levures indigènes et évaluation de la qualité microbiologique de boisson alcoolisée à partir de pommes de *Anacardium occidentale* collectées à Mahajanga, Madagascar

Romuald RAKOTONANDRASANA^{1*}, Zo RANDRIAMAHATODY²,
Jacky Michel ANDRIANASOLONANTENAINA³, Rivo Solotiana RAKOTOMALALA⁴,
Mboahangy RAVONINJATOVO² et Mananjara PAMPHILE³

¹ Université de Mahajanga, Ecole Doctorale Génie du Vivant et Modélisation (EDGVM), 401 Mahajanga, Madagascar

² Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE), 101 Antananarivo, Madagascar

³ Université de Mahajanga, Faculté des Sciences de Technologies et de l'Environnement (FSTE), 401 Mahajanga, Madagascar

⁴ Centre Hospitalier Universitaire Professeur Zafisaona Gabriel de Mahajanga, Laboratoire de Microbiologie, d'Immunologie et Biochimie, 401 Mahajanga, Madagascar

(Reçu le 08 Novembre 2024 ; Accepté le 16 Janvier 2025)

* Correspondance, courriel : romualdrakoto2@gmail.com

Résumé

Anacardium occidentale est cultivée principalement pour son amande. Ces pommes de cajou sont souvent considérées comme un sous-produit de l'industrie de noix de cajou. Le « Drawa », une boisson alcoolisée artisanale, est obtenue par l'auto-fermentation des pommes de cajou. Cette production de boisson alcoolisée artisanale a conduit à étudier les microorganismes responsables de l'auto-fermentation et d'analyser la qualité microbiologique de la boisson ainsi obtenue. Cette étude a pour objectif de caractériser des levures fermentaires indigènes de *Anacardium occidentale* afin de valoriser les boissons alcoolisées normalisées suite du dénombrement des microorganismes d'indice d'hygiène et sécurité. Le dénombrement des souches levuriennes a été effectué après leur isolement. Les caractérisations biochimiques, physiologiques et l'inhibition des souches isolées ont été testés. Le pouvoir fermentaire a été vérifié. Enfin, le test de normalisation de boissons ainsi obtenues a été effectué. Les résultats obtenus ont montré que la boisson fermentée renferme des souches des levures fermentaires. La qualité microbiologique des boissons fermentées est satisfaisante selon les normes exigées. La valorisation des pommes de cajou en boisson alcoolisée constitue un axe stratégique pour le développement économique à Madagascar.

Mots-clés : *Anacardium occidentale*, boisson alcoolisée, levure, normes.

Abstract

Characterization of indigenous yeasts and evaluation of the microbiological quality of alcoholic beverages made from *Anacardium occidentale* apples collected in Mahajanga, Madagascar

Anacardium occidentale is primarily cultivated for its nut. Cashew apples are often considered a by-product of the cashew nut industry. "Drawa," a traditional alcoholic beverage, is produced through the spontaneous fermentation of cashew apples. This artisanal beverage production has prompted research into the microorganisms responsible for the spontaneous fermentation and the microbiological quality of the resulting beverage. The objective of this study is to characterize the indigenous fermentative yeasts of *Anacardium occidentale* to promote standardized alcoholic beverages through the enumeration of microorganisms as hygiene and safety indicators. Yeast strains were enumerated following their isolation. Biochemical, physiological, and inhibitory characterizations of the isolated strains were conducted, and their fermentative capacity was assessed. Finally, a standardization test of the resulting beverages was performed. The results revealed that the fermented beverage contains fermentative yeast strains. The microbiological quality of the fermented beverages meets the required standards. Valorizing cashew apples into alcoholic beverages represents a strategic avenue for economic development in Madagascar.

Keywords : *Anacardium occidentale*, alcoholic beverage, yeast, standards.

1. Introduction

L'anacardier, communément appelé arbre du cajou, est une espèce tropicale et subtropicale appartenant à la famille des Anacardiaceae, au genre *Anacardium* Linn, et à l'espèce *Anacardium occidentale* [1, 2]. Originaire d'Amérique du Sud, plus précisément de la région du Ceará, au nord-est du Brésil, il a été cultivé par les populations autochtones bien avant sa découverte par les explorateurs portugais [3]. Ces derniers, conscients de son potentiel, l'ont introduit dans les colonies africaines, notamment au Sénégal en 1914 dans le cadre d'initiatives de reboisement [4], puis en Asie [5]. Depuis, cette plante a connu une large diffusion mondiale grâce à ses nombreuses applications agricoles, alimentaires et économiques [6]. L'exploitation de l'anacardier s'est longtemps concentrée sur la noix de cajou, qui constitue un produit de grande valeur commerciale en raison de ses qualités nutritionnelles et de sa popularité sous forme de collations [7]. En revanche, les pommes de cajou, bien que riches en composés bioactifs et nutriments essentiels, sont souvent négligées ou considérées comme des sous-produits malgré leur potentiel [8, 9]. Ce paradoxe s'explique notamment par la présence d'une forte concentration en tanins (100 à 300 mg/100 ml de jus), qui confère au jus de pomme de cajou une astringence limitant sa valorisation directe [10]. Malgré ces contraintes, les pommes de cajou représentent une matière première précieuse pour diverses transformations agroalimentaires. À l'instar de nombreux fruits tropicaux, leur transformation en jus est l'une des voies de valorisation les plus prometteuses [11]. Toutefois, cette filière reste sous-exploitée dans plusieurs pays producteurs, en raison d'un manque de techniques adaptées et d'une méconnaissance de leur richesse nutritionnelle [12]. À Madagascar, les pommes de cajou trouvent une application particulière dans la production artisanale de boissons alcoolisées, communément appelées « Drawa ». Ce procédé repose sur une fermentation spontanée, largement dépendante des microorganismes indigènes présents dans le fruit. La caractérisation des levures impliquées dans ce processus est essentielle non seulement pour optimiser la qualité sensorielle et microbiologique du produit, mais également pour comprendre les dynamiques fermentaires spécifiques à ce type de boisson [13]. Par ailleurs, l'évaluation de la qualité microbiologique des boissons issues de cette fermentation artisanale constitue une étape cruciale, notamment dans le cadre de la sécurité alimentaire et de la conformité aux normes internationales [14, 15]. Ainsi, la présente étude vise à caractériser les levures indigènes impliquées dans la fermentation des pommes de *Anacardium occidentale* et à évaluer la qualité microbiologique des boissons obtenues. Les résultats obtenus permettront de valoriser cette ressource souvent sous-exploitée et d'orienter les stratégies de transformation locale vers des pratiques plus durables et innovantes.

2. Méthodologie

2-1. Zone d'étude

Les échantillons ont été collectés dans le secteur Ambondrona et Ambovoay, district Mahajanga I, Région Boeny, Madagascar (*Figure 1*).

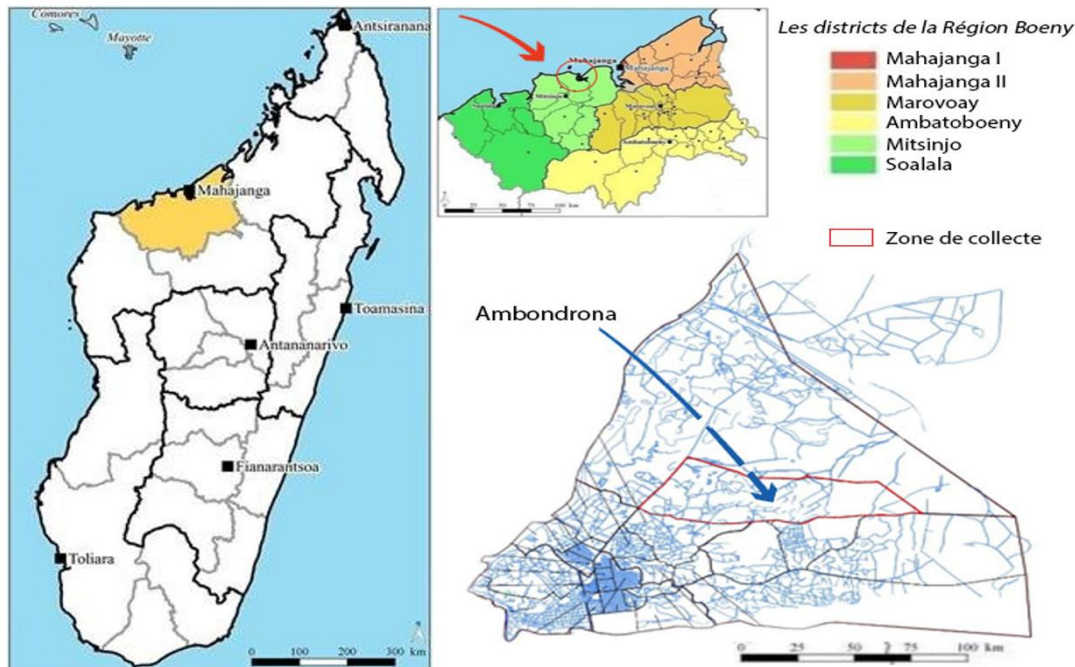


Figure 1 : Localisation de la zone d'étude

Source : [16]

2-2. Matériel biologique

Les pommes de *Anacardium occidentale* ont servi de matières premières pour la production de boisson alcoolisée. Lors de cette étude, les fruits utilisés étaient parfaitement mûrs, sains et intacts. Ils ont été collectés dans le Fokontany Ambondrona, situé dans la Commune Urbaine de Mahajanga, District de Mahajanga-I, Région Boeny, Madagascar (*Figure 2*).



Figure 2 : Pommes de *Anacardium occidentale* collectées

Lors de la cueillette des fruits, des gants stériles ont été utilisés (**Figure 3A**). Les pommes de *Anacardium occidentale* ont été placées dans des sacs stériles, puis conservées dans une glacière (**Figure 3B**) pour leur transport au laboratoire. Des mesures strictes d'hygiène ont été appliquées afin de prévenir toute contamination croisée et d'éviter la dégradation des échantillons.

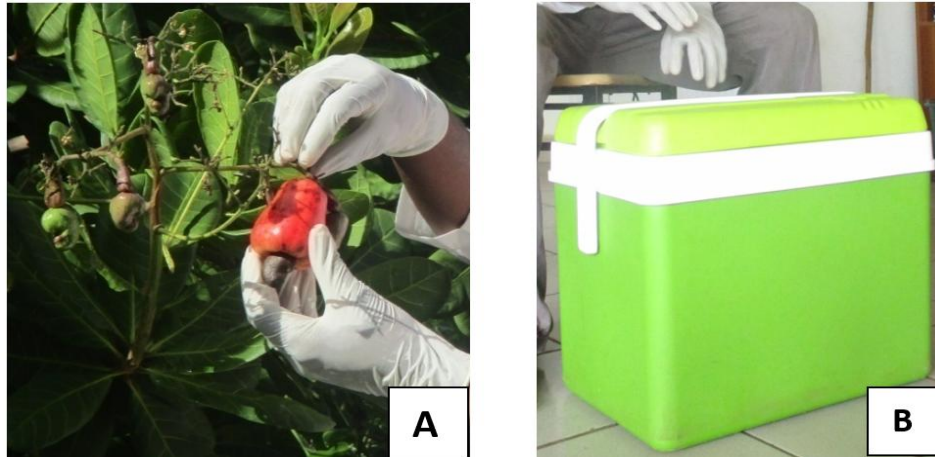


Figure 3 : (A) Collecte, (B) Glacière destinée pour le transport des échantillons

2-3. Préparation des échantillons

Des échantillons de pomme de cajou ainsi collectés ont été analysés. Toutes les préparations ont été réalisées sous hotte afin d'éviter toutes sortes de contaminations de l'extérieur.

2-4. Mise en évidence de la présence des levures dans les échantillons

Pour la mise en évidence de la présence des levures dans les échantillons, 200 ml de milieu YGC (Yeast Glucose Chloramphénicol) liquide stérile ont été répartis dans les flacons. Ensuite, 25 g d'échantillons ont été ajoutés dans chaque flacon, puis incubés à 25 °C pendant 72 heures. Un flacon témoin, sans échantillon, a été incubé dans les mêmes conditions pour vérifier la stérilité des milieux de culture utilisés. La présence des dépôts blancs au fond du flacon témoigne la présence des levures fermentaire dans ces échantillons après incubation.

2-5. Préparation de la suspension microbienne

La suspension mère a été obtenue en diluant 25 g d'échantillon dans 125 ml de Tryptone sel, homogénéisé pendant 2 minutes dans un sac Stomacher. Le mélange a ensuite été incubé à 25 °C pendant 24 heures pour activer et régénérer les levures présentes dans les échantillons [17]. Pour isoler les levures, 1 ml de la suspension a été inoculé sur un milieu YGC solide à l'aide d'une pipette stérile, afin de répartir uniformément la suspension. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25 °C pendant 72 heures. Une boîte témoin, non ensemencée, a été incluse pour vérifier la stérilité du milieu [18, 19].

2-6. Isolement et identification microbiologique des souches de levures

Après une incubation de 72 heures à 25 °C, les colonies de levures blanches isolées ont été prélevées et réensemencées sur des milieux stériles, en respectant des conditions aseptiques près d'un bec Bunsen. Cette méthode, basée sur l'étalement en stries transversales, a permis l'obtention de souches pures après plusieurs passages successifs [17]. Pour identifier les genres, les levures ainsi isolées sur milieu YGC solide ont été testées sur un milieu contenant le vert de bromocrésol. Sur ce milieu, *Saccharomyces cerevisiae* conservent

une coloration vert sombre, tandis que les levures non-*Saccharomyces* réduisent le colorant, en virant à une couleur blanche [20]. Les colonies ont ensuite étéensemencées sur un milieu Yeast Lysine Chloramphénicol (YLC), sur lequel seules les levures non-*Saccharomyces* peuvent se développer, la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* étant inhibée [21]. Le test du pouvoir fermentaire des souches a été évalué dans des tubes contenant un milieu liquide YGC avec des cloches de Durham pour détecter la production de CO₂. Ces tubes ont été incubés à 25 °C pendant 72 heures, avec des tubes témoins sans inoculum [22]. Enfin, l'identification microscopique a permis de caractériser la morphologie cellulaire, le mode de division et la coloration de Gram, différenciant les microorganismes à Gram positif de couleur violette et de Gram négatif coloré en rose [19].

2-7. Transformation des pommes de cajou en boisson alcoolisée

La méthode de transformation des pommes de cajou décrite est basée sur les travaux de [11, 12]. Les pommes de cajou collectées sont d'abord triées pour séparer les fruits sains des pommes blessées et vertes, puis pesées à l'aide d'une balance de précision pour déterminer la quantité à transformer. Elles sont ensuite lavées à l'eau propre afin d'éliminer les impuretés. Le dénoyautage des fruits est réalisé en tournant délicatement la pomme et la noix dans des directions opposées, tandis que l'équeutage se fait par découpe des deux extrémités des fruits, réduisant ainsi l'astringence, selon les recommandations locales [15]. Le jus des pommes de cajou est extrait à l'aide d'un presse-fruit, puis filtré avec une passoire pour séparer les débris solides et récupérer le jus limpide [23]. Le jus obtenu est conditionné dans des flacons vides de sérums physiologiques. Des ballons sont reliés aux flacons pour capter le CO₂ dégagé lors de la fermentation. L'auto-fermentation du jus a duré environ cinq jours, durant laquelle le gaz carbonique produit est récupéré dans les ballons. Après cette étape, les boissons alcoolisées sont transvasées dans des bouteilles en verre stérilisées pour leur conservation.

2-8. Analyses microbiologiques de la boisson alcoolisée obtenu

L'analyse microbiologique permet d'évaluer l'innocuité du produit, de vérifier le respect des bonnes pratiques de fabrication et d'assurer la fraîcheur de la boisson. Elle inclut la recherche de germes indices d'hygiène, tels que FATM [24], Anaérobies-Sulfite-Réducteurs [25], *Escherichia coli* [26], *Staphylococcus aureus* [27] et de sécurité : *Salmonella* [28].

2-8-1. Préparation des échantillons biologiques

Les échantillons doivent être analysés immédiatement, ou dans le plus bref délai après réception au laboratoire. Si exceptionnellement, l'analyse doit être reportée, les échantillons doivent être gardés au réfrigérateur. Les échantillons doivent minutieusement manipulés en respectant l'ensemble des règles de précaution de manière à éviter toute contamination dans les échantillons.

2-8-2. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

Vingt grammes (20 g) de la boisson alcoolisée a été prélevé puis versé dans 180 ml de l'eau peptonée tamponnée pour servir de solution mère. A partir de la solution mère, plusieurs dilutions décimales sont réalisées dans la hotte à flux laminaire. Pour préparer la dilution 10⁻¹, 1 ml de la solution mère est prélevé dans des conditions stériles et mis dans un tube à essai stérile contenant 9 ml d'eau peptone tamponnée, puis agiter quelques secondes sur le vortex pour homogénéiser la solution mère. Par la même technique, on continue jusqu'à la dilution 10⁻⁴.

2-8-3. Dénombrement des flores aérobies mésophiles totales (FAMT) [24]

Le dénombrement des germes aérobies mésophiles a été réalisé selon la norme ISO 4833-1. Des dilutions décimales (10^{-3} et 10^{-4}) de l'échantillon liquide ont été inoculées dans des boîtes de Pétri stériles, sous une hotte près d'un bec Bunsen. Ensuite, 12 à 15 ml de gélose Plate Count Agar (PCA) à 45 °C ont été ajoutés et mélangés lentement à l'inoculum avant refroidissement à température ambiante. Les boîtes ont été incubées en conditions aérobies pendant 72 heures à 30 °C. Les colonies ont été comptées dans les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

2-8-4. Dénombrement des germes Anaérobies-Sulfite-Réducteurs (ASR) [25]

Une quantité précise de l'échantillon liquide a été inoculée dans une boîte de Pétri, suivie de l'ajout du milieu sélectif Tryptone Sulfite Cyclosérine (TSC) par ensemencement dans la masse, puis d'une couche supplémentaire du même milieu. Les boîtes ont ensuite été incubées en anaérobiose à 37 °C (**Figure 4**) pendant 20 ± 2 heures. Après solidification, l'incubation a eu lieu à 37 °C. Les colonies caractéristiques ont été dénombrées après 24 heures d'incubation dans la boîte contenant entre 30 et 300 colonies.



Figure 4 : Bocal servant de milieu anaérobique pendant l'incubation

2-8-5. Dénombrement de *Escherichia coli* [26]

L'échantillon et ses dilutions décimales ont été inoculés en profondeur dans une boîte de Pétri stérile, suivis de l'ajout de 12 à 15 ml de milieu TBX (Tryptone-bile-glucuronide). 1 ml de la solution mère, préalablement agitée au vortex, a été inoculé à l'aide d'une pipette stérile. Les boîtes ont été incubées à 44 °C pendant 24 heures. Une autre boîte a reçu 1 ml de la dilution 10^{-1} , et 12 à 15 ml de milieu TBX refroidi ont été ajoutés. Après agitation douce et solidification à température ambiante, les boîtes ont été incubées à 44 °C pendant 24 heures. Après incubation, les colonies caractéristiques ont été dénombrées dans les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

2-8-6. Dénombrement de *Staphylococcus aureus* [27]

Une quantité déterminée de l'échantillon liquide ou de la suspension mère a été inoculée en surface sur milieu Baird Parker (BP) dans des boîtes de Pétri stériles, suivie de l'ajout de 12 à 15 ml de milieu BP, puis laissée solidifier à température ambiante. L'ensemencement a été effectué par frottement de la solution mère avec une anse stérilisée. Les boîtes ont été incubées à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures. Après incubation, les colonies caractéristiques ont été dénombrées dans les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

2-8-7. Dénombrement de *Salmonella* [28]

La recherche de *Salmonella* suit quatre étapes : pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide, enrichissement sélectif sur bouillon Rappaport Vasiliadis Soja (RVS), isolement sur milieu Hektoen et incubation à 16-22°C pendant 24h, puis confirmation des colonies caractéristiques. Pour le pré-enrichissement, 1 ml de la solution mère est inoculé dans 9 ml d'eau peptone tamponnée et incubé pendant 24h. Après incubation, 100 µl de l'échantillon pré-enrichi est transféré dans 10 ml de RVS, agité, puis incubé à 16-22°C pendant 24h. Après agitation et prélèvement à l'aide d'une anse stérilisée, le milieu Hektoen est ensemencé en stries et incubé à 37°C pendant 16-24h. Toutes les colonies présentes dans la boîte de Pétri contenant 30 à 300 colonies sont dénombrées après incubation.

2-9. Expression des résultats de la charge des microorganismes

Les résultats sont exprimés UFC/ml (Unité Formant Colonie par millilitre) et donnés par la **Relation** suivante :

$$N(\text{UFC}/\text{ml}) = \frac{\sum c}{V (n_1 + 0,1 n_2) d} \quad (1)$$

avec,

- $\sum c$: Somme des colonies comptées sur les boîtes retenues ;
- V : Volume de l'inoculum ;
- n_1 : Nombre de boîtes de Pétri ou tubes ensemencés à la première dilution ;
- n_2 : Nombre de boîtes de Pétri ou tubes ensemencés à la deuxième dilution ;
- d : Dilution retenue ;
- UFC/ml : Unité Formant Colonie par millilitre.

3. Résultats et Discussion

3-1. Boisson alcoolisée à partir des pommes de cajou

Après de deux (02) jours de fermentation, des dépôts blancs ont été observés au fond des bocaux. Les boissons alcoolisées ont été obtenues après cinq (05) jours (**Figure 5**).



Figure 5 : Boissons alcoolisées obtenues

La présence de dépôts blancs au fond des bouteilles contenant la boisson alcoolisée de pomme de *Anacardium occidentale* résulte principalement de la précipitation de protéines et de la sédimentation de levures mortes [29]. Les protéines, naturellement solubles dans le jus, peuvent devenir insolubles en raison de modifications du pH ou de la force ionique, entraînant leur précipitation et formation de dépôts. Parallèlement, lors de la

fermentation, les levures transforment les sucres en alcool et, en fin de cycle, les cellules mortes se déposent par gravité au fond des bouteilles. La présence des levures dans ces pommes de cajou collecté à Mahajanga a été confirmée par les résultats des études antérieures [30, 31].

3-2. Caractéristique des levures fermentaires dans les échantillons

Les tests de stérilité ont été effectués par l'utilisation de milieu sélectif YGC liquide. Ce milieu a une spécificité d'inhiber la multiplication des autres microorganismes autres que les levures. Avant et après incubation du flacon témoin (*Figure 6A*), la stérilité du milieu a été maintenue car il ne présente ni dépôt blanc ni trouble dans le milieu. Après 72 heures d'incubation, l'existence de levures a été confirmée par la présence de dépôt blanc au fond de flacon (*Figure 6B*).



Figure 6 : *Présence des dépôts blanc dans le flacon*

La présence d'espèces levuriennes dans les échantillons confirme que le jus de pommes de cajou constitue un substrat favorable à leur croissance. Cette prolifération s'explique principalement par la richesse en sucres de ce milieu, un facteur déterminant pour le développement des micro-organismes, notamment les levures [30]. Cette observation a également été corroborée par les travaux menés sur les fruits de l'ananas, qui ont démontré que la teneur en sucres influence directement la multiplication des levures [33]. Le jus de pommes de cajou, avec une concentration en sucres réducteurs variant de 7,8 à 8,6 g/100 g de matière fraîche, présente ainsi des conditions propices à leur croissance [34].

3-3. Caractéristiques des souches isolées

Les résultats d'isolement effectués ont permis d'obtenir deux souches différentes dont l'une est de petite taille (*Figure 7A*) et l'autre de grande taille (*Figure 7B*).

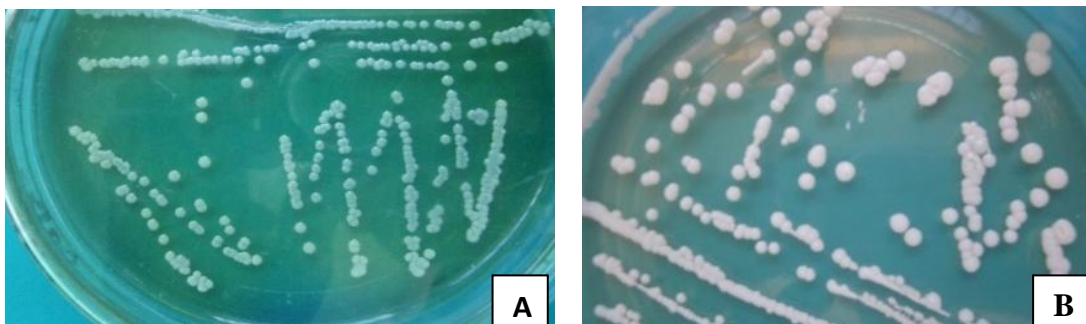


Figure 7 : *(A) Souches des levures isolées de petite taille ; (B) Souches des levures isolées de grande taille*

En observant les caractéristiques de deux souches obtenues, des caractères communs ont été constatés : les colonies sont toutes opaques, crémeuses, lisses, bombées et à contour régulier. Ces caractéristiques sont typiques des levures appartenant aux genres couramment impliqués dans les fermentations alcooliques, tels que *Saccharomyces* ou *Candida* [35, 36]. Par ailleurs, l'apparence crémeuse et bombée des colonies indique souvent une adaptation des levures aux environnements riches en nutriments, comme les milieux de fermentation [37].

3-4. Caractéristiques des souches isolées par le vert de bromocrésol

Les deux souches qui étaient ensemencées dans le milieu YGC solide ont été repiquées sur le milieu YGC additionné par vert de Bromocrésol et incubées parallèlement avec le témoin. Après 72 heures, les résultats ont montré que les souches de petites tailles ne réduisent pas le vert de Bromocrésol qui ont de couleur verte sombre (**Figure 8A**) par contre les souches de grandes tailles le réduisent et virent en couleur blanche (**Figure 8B**). Cela explique que les souches de levure de petites tailles sont fortes probablement du genre *Saccharomyces*.

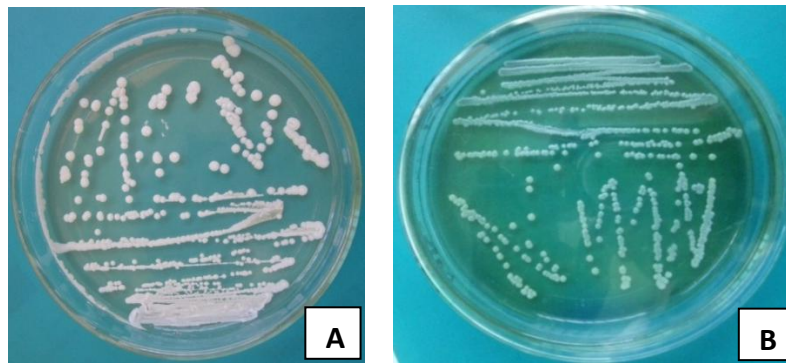


Figure 8 : *Souches des levures colorées par vert de Bromocrésol*

Le vert de bromocrésol est un indicateur de pH utilisé pour détecter les activités métaboliques des micro-organismes, notamment leur capacité à produire ou consommer des composés acides. Les souches de grandes tailles ayant réduit l'indicateur montrent une activité métabolique associée à la production de composés neutres ou basiques, ou à une consommation des acides présents dans le milieu. Ces caractéristiques métaboliques sont souvent observées chez des levures associées à des fermentations spécifiques [20]. En revanche, les souches de petites tailles, qui n'ont pas provoqué de réduction de l'indicateur, suggèrent une voie métabolique différente, davantage compatible avec les levures du genre *Saccharomyces*. Ce genre est bien connu pour son efficacité dans les fermentations alcooliques, où la production d'acide est limitée [35, 38].

3-5. Caractéristiques des deux souches isolées sur le milieu YLC

Après 72 heures d'incubation, on a observé que les souches de petite taille sont inhibées par la lysine (**Figure 9A**) alors que les souches de grande taille y poussent encore (**Figure 9B**).

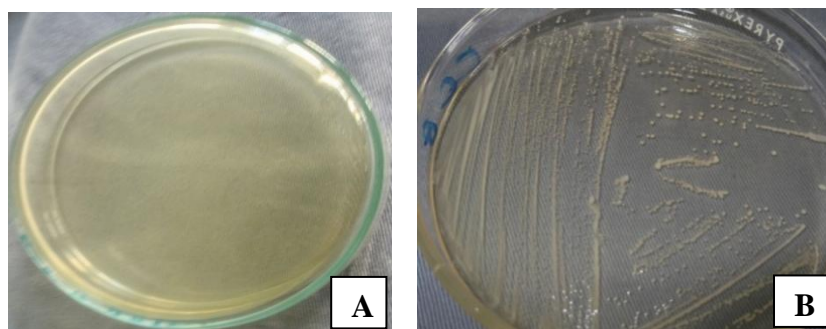


Figure 9 : *Souches des levures sur le milieu YLC*

Ces résultats confirment que la souche de petite taille appartient probablement au genre *Saccharomyces*. Ce genre est caractérisé par son incapacité à utiliser certains acides aminés, comme la lysine, comme source d'azote, un critère fréquemment utilisé pour différencier les genres de levures [21]. Les souches de *Saccharomyces* privilégient généralement d'autres voies métaboliques, comme l'utilisation de sources de carbone fermentescibles. La croissance de la souche de grande taille en présence de lysine indique une capacité enzymatique ou génétique différente, probablement associée à un autre genre de levures. Ces observations sont cohérentes avec les études sur les profils métaboliques des levures, où les différences dans l'utilisation des acides aminés peuvent servir de base à leur identification et classification [35, 36].

3-6. Pouvoir fermentaire des souches isolées de petite et de grande taille

Durant l'incubation, le milieu témoin (T) non inoculé a maintenu sa stérilité. Pour les tubes contenant des inoculum, deux souches (**Figure 10**) de petite (SP) et de grande taille (SG) fermentaires ont été, observé et témoigné par la montée progressive des cloches de Durham vers la surface du tube à essai.

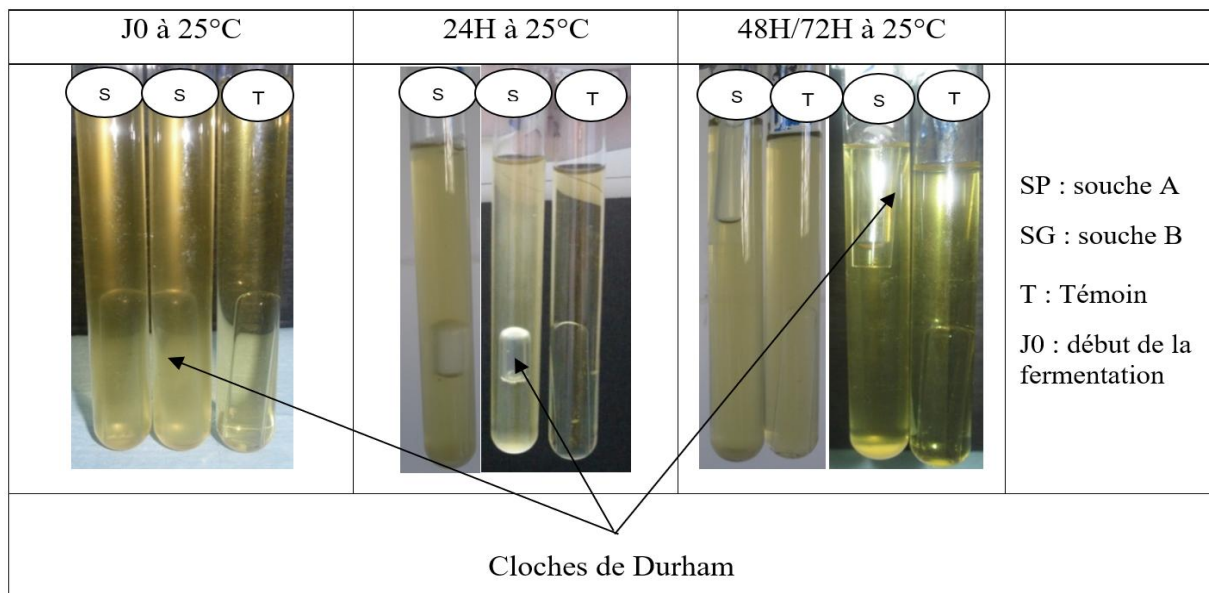


Figure 10 : Évolution de la fermentation témoignée par la montée des cloches de Durham

Ce phénomène est attribué à la production de dioxyde de carbone (CO_2) résultant de la fermentation des sucres présents dans le milieu. Cette observation confirme que les deux souches possèdent des capacités fermentaires, ce qui est typique des levures capables de métaboliser les sucres pour produire de l'éthanol et du CO_2 [39]. Ces résultats suggèrent que les souches appartiennent probablement à des genres fermentaires, tels que *Saccharomyces*, connu pour sa forte activité fermentaire. Les cloches de Durham sont couramment utilisées comme un indicateur simple et efficace pour récupérer la production de gaz au cours de la fermentation, renforçant ainsi la validité de ces observations [22].

3-7. Caractéristiques microscopiques des deux souches étudiées

3-7-1. Observation à l'état frais

L'observation microscopique a pour but d'identifier et de caractériser, les caractères morphologiques des levures et leurs l'état cellulaire et que les levures sont encore en vie durant les études effectuées. Le résultat d'observation a montré qu'elles sont toutes immobiles et leur mode de division est par bourgeonnement unipolaire.

3-7-2. Observation par coloration de Gram

D'autre part, la coloration de Gram nous a permis de différencier si les souches étudiées sont de gram positif et ou négatif et aussi leur morphologie. *Le Figure 11* montre que les cellules colorées en violette sont des cellules à Gram positif. Les renseignements sur les caractères morphologiques des cellules de levure après coloration est résumé sur le *Tableau 1* suivant.

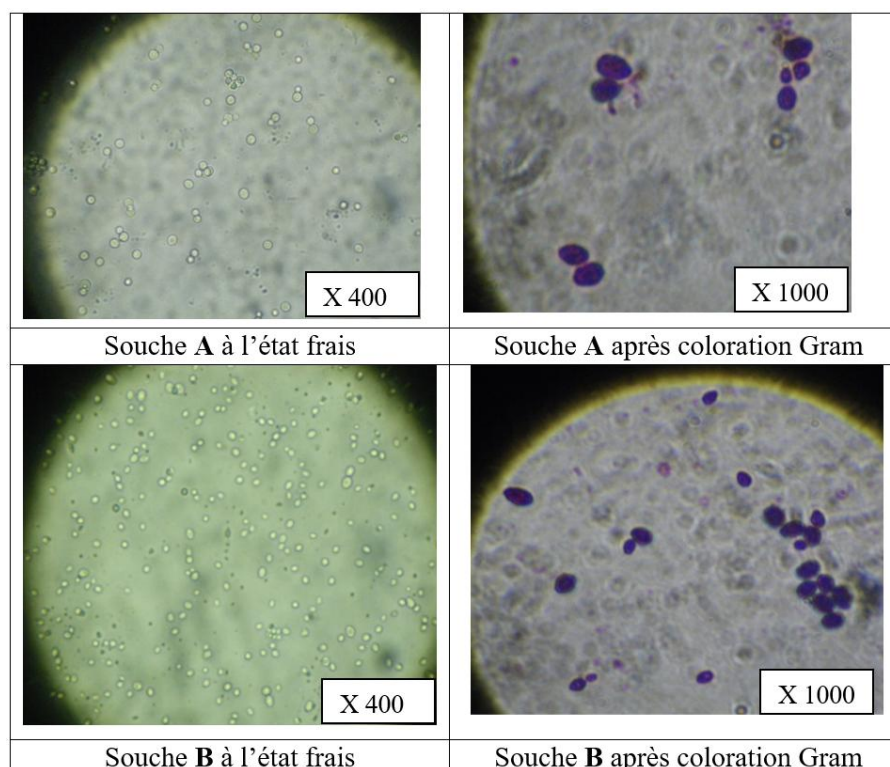


Figure 11 : *Vue microscopique des deux souches A et B isolées*

Tableau 1 : *Récapitulation sur les caractères morphologiques des cellules de levures après coloration de Gram*

Caractères morphologiques	Souche B	Souche A
Forme	Ovale	Ovale
Mode de regroupement	Isolée	Isolée
Taille des cellules	Moyenne	Grande
Mode de division par bourgeonnement	Unipolaire	Unipolaire

Ces observations confirment des descriptions classiques des levures, où l'immobilité et le bourgeonnement unipolaire sont des critères clés d'identification [40]. Par ailleurs, l'organisation en cellules isolées indique un mode de vie adapté aux milieux riches en nutriments, comme ceux utilisés dans les fermentations [41].

3-8. Qualités microbiologiques de boisson alcoolisée

3-8-1. Caractéristiques des Flores Aérobies Mésophiles Totaux (FAMT)

La concentration en FAMT de l'échantillon, à dilution 10^{-4} (*Figure 12B*) a été retenue, avec 4.10^3 de microorganismes par gramme ou par millilitre. Les colonies dénombrées, apparaissent de couleurs blanches sur le milieu PCA (*Figure 12*).

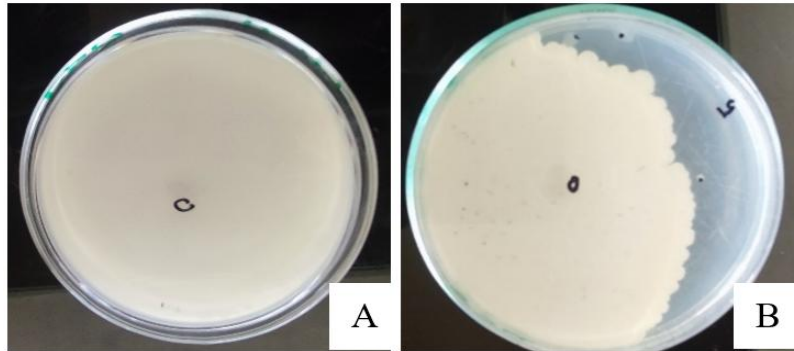


Figure 12 : *Flores Aérobies Mésophiles Totales*

Les résultats de cette étude montrent une concentration relativement faible de Flores Aérobies Mésophiles (FAMT), ce qui est considéré comme normal pour un produit issu d'une fermentation. Selon des études antérieures, ces concentrations peuvent varier en fonction du type de boisson, du processus de fermentation et des conditions de stockage. Une étude sur des boissons fermentées à base de fruits a observé des concentrations similaires, autour de 3.10^3 microorganismes par millilitre dans des boissons alcoolisées artisanales [42]. Cette variation est influencée par la diversité des souches microbiologiques et les conditions environnementales. Une autre étude indique que les niveaux de FAMT peuvent parfois atteindre des valeurs beaucoup plus élevées, notamment en cas de fermentation mal maîtrisée ou de mauvaises conditions de conservation, suggérant alors une contamination bactérienne ou des anomalies dans le processus de fermentation [43]. En comparaison, les faibles niveaux de FAMT observés ici peuvent être interprétés comme un signe de contrôle efficace de la fermentation pendant la production. Ces résultats montrent que les pratiques de fermentation influencent directement la qualité microbiologique des boissons alcoolisées.

3-8-2. Caractéristiques de *Escherichia coli*

Les colonies dénombrées sur le milieu TBX (**Figure 13**), apparaissent de couleurs blanches, avec une concentration moins d'un UFC/ml, inférieure au critère établi.

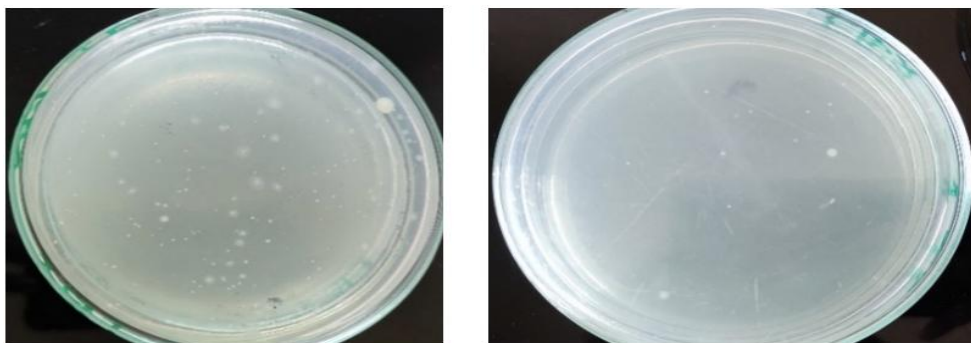


Figure 13 : *Colonies non caractéristiques de *Escherichia coli**

L'analyse microbiologique du jus de pommes de *Anacardium occidentale* a révélé une concentration très faible de *Escherichia coli* (<1 UFC/ml), en deçà des seuils critiques établis, ce qui suggère une bonne qualité hygiénique du produit. Ce résultat témoigne de l'efficacité des mesures de contrôle sanitaire mises en place lors de la production. Des recherches antérieures indiquent que des pratiques d'hygiène rigoureuses, telles que le lavage des fruits et la pasteurisation, permettent de réduire significativement les risques de contamination [44, 45]. En revanche, des niveaux plus élevés ont été observés dans des jus non pasteurisés ou produits dans des conditions sanitaires inadéquates [46].

3-8-3. Caractéristiques de germes Anaérobies-sulfito-réducteurs (ASR)

Les ASR dénombrés sont inférieurs à une colonie par millilitre. Les colonies apparentes sont également de couleurs blanches et il n'y a aucune colonie caractéristique visible à l'œil nu.



Figure 14 : Colonies non caractéristiques des germes Anaérobies-sulfito-réducteur

La détection quasi-absence d'anaérobies sulfite-réducteurs (ASR) dans la boisson alcoolisée de *Anacardium occidentale* témoigne d'une maîtrise rigoureuse des conditions sanitaires et des paramètres de fermentation. Ces résultats soulignent l'importance des bonnes pratiques de fabrication dans la prévention des contaminations microbiologiques et démontrent le potentiel de ce produit à satisfaire les normes de qualité microbiologique requises pour les boissons fermentées.

3-8-4. Caractéristiques de *Staphylococcus aureus*

Le nombre de germes caractéristiques de *Staphylococcus aureus* dénombré est inférieur à une colonie par millilitre ou par gramme. Les colonies apparentes sont également de couleurs blanches, et absence de colonies caractéristiques de *Staphylococcus aureus*, visibles à l'œil nu.

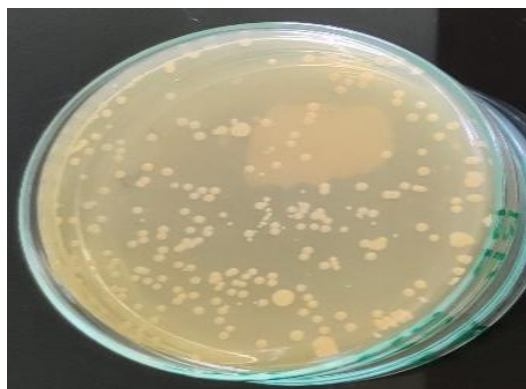


Figure 15 : Colonies non caractéristiques de *Staphylococcus aureus*

L'analyse microbiologique de la boisson alcoolisée de *Anacardium occidentale* a révélé une très faible concentration de *Staphylococcus aureus* (<1 UFC/ml ou g), indiquant une bonne maîtrise des conditions sanitaires et de fermentation. Des recherches ont montré que des protocoles stricts d'hygiène, de décontamination et de contrôle des paramètres de fermentation réduisent efficacement la présence de ce pathogène. Durant la fermentation alcoolique la diminution du pH et la production de l'éthanol limite également sa prolifération [44, 47]. Ces résultats confirment l'importance des protocoles d'hygiène afin de garantir la sécurité microbiologique des boissons fermentées ainsi obtenues.

3-8-5. Caractéristiques de *Salmonella*

L'analyse microbiologique de la boisson alcoolisée de *Anacardium occidentale* a montré l'absence de *Salmonella*, confirmant ainsi la conformité du produit aux critères de sécurité sanitaire (**Figure 16**). Bien que des germes non caractéristiques aient été détectés, leur présence n'affecte pas la qualité microbiologique du produit. Ce résultat montre que les bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène lors de la production ont été efficaces pour empêcher la contamination de *Salmonella* et garantir la sécurité du jus.

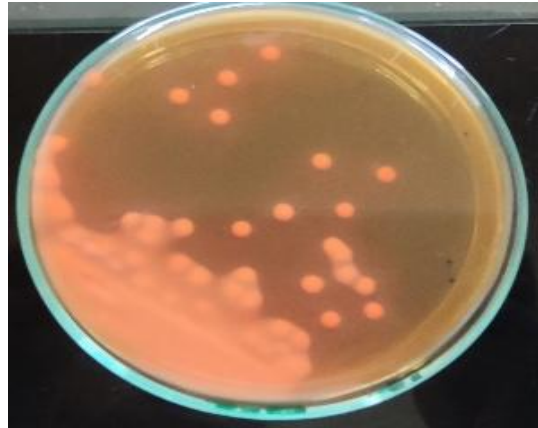


Figure 16 : Colonies non caractéristiques de *Salmonella*

La récapitulation des analyses microbiologiques de la boisson alcoolisée à partir de pommes de *Anacardium occidentale* est représenté sur le tableau suivant :

Tableau 2 : Récapitulation des analyses microbiologiques

Dénombrement	Nombres de colonies	Unité	Méthodes	Critères
FAMT	4.10 ³	UFC/ml	ISO 4833-1 (2013)	<10 ⁵ UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	<1	UFC/ml	ISO 16649-2 (2001)	< Abs/250 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	<1	UFC/ml	ISO 6888 (2021)	<10UFC/g
ASR	<1	UFC/ml	ISO 7937 (2004)	Abs/50 ml
Salmonelles	Non détecté	-	ISO 6579 (2017)	Absent/25ml

Les résultats de l'analyse microbiologique de la boisson alcoolisée de *Anacardium occidentale* ont montré une qualité sanitaire satisfaisante, conforme aux normes en vigueur. La concentration en Flores Aérobie Mésophiles Totales (FATM) était faible, avec environ 4.10³ microorganismes par millilitre, ce qui est considéré comme acceptable pour un produit en fermentation [42]. Les Anaérobies-sulfito-réducteurs (ASR) étaient présents en quantités inférieures à une unité par millilitre, ce qui suggère un bon contrôle des conditions sanitaires [41]. Concernant les pathogènes, le nombre de *Escherichia coli* était inférieur à 1 UFC/ml, ce qui indique une absence de contamination significative [44]. De même, aucune colonie de *Staphylococcus aureus* n'a été détectée, et aucun germe de *Salmonella* n'a été retrouvé dans l'échantillon, assurant ainsi la sécurité microbiologique du produit [44, 45]. Ces résultats soulignent une maîtrise efficace des conditions de production, de fermentation et d'hygiène, garantissant un produit conforme aux critères sanitaires.

4. Conclusion

La présente étude a permis de caractériser les levures indigènes impliquées dans la fermentation des pommes de *Anacardium occidentale* et d'évaluer la qualité microbiologique des boissons alcoolisées obtenues. Les résultats obtenus ont montré que la fermentation spontanée de ces pommes produit des boissons alcoolisées après 5 jours de fermentation, avec l'apparition de dépôts blancs au fond des bocaux, indiquant une activité microbienne. Deux souches (grande et petite) de levures ont été isolées, dont l'une est probablement du genre *Saccharomyces*, en raison de son comportement particulier sur les milieux de culture spécifiques, tels que le vert de bromocrésol et le milieu YLC. L'analyse microbiologique des boissons alcoolisées a révélé une charge microbiologique acceptable, avec une absence de germes pathogènes tels que *Salmonella* et *Staphylococcus aureus*, et une faible concentration de *Escherichia coli* et des anaérobies sulfito-réducteurs. Ces résultats indiquent que la boisson alcoolisée produite par la fermentation spontanée des pommes de cajou présente des qualités microbiologiques satisfaisantes, ce qui souligne son potentiel pour une valorisation plus large. Toutefois, des pratiques de transformation plus rigoureuses et adaptées sont nécessaires pour améliorer la standardisation et la qualité des produits artisanaux locaux. Ces travaux ouvrent la voie à des recherches futures pour optimiser le processus de fermentation et mieux exploiter cette ressource souvent sous-exploitée à Madagascar.

Références

- [1] - M. T. S. TREVISAN, B. PFUNDSTEIN et R. HAUBNER, "Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity" *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 44, N° 2 (2006) 188 - 197 p.
- [2] - E. U. ASOGWA, L. A. HAMMED and T. C. N. NDUBUAKU, "Integrated production and protection practices of cashew (*Anacardium occidentale*) in Nigeria" *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7, N° 25 (2008) 4868 - 4873 p.
- [3] - J. G. OHLER, "Cashew Communication, Department of Agricultural Research, Institut voor de Tropen, Amsterdam, ISBN: 9068320742, (1988) 260 p.
- [4] - M. P. TOUSSAINT, « Expériences et travaux de reboisement forestier et restauration des sols. Les plantations de Darcassou (*Anacardium occidentale*) au Sénégal », CTFT, DEF, (1961) 33 p.
- [5] - M. ADOU, F. A. TETCHI, M. GBANE, P. V. K. NIABA et N. G. AMANI, "Minerals Composition of the Cashew Apple Juice (*Anacardium occidentale* L.) of Yamoussoukro, Cote d'Ivoire". *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 (2011) 1109 - 1114
- [6] - M. M. S AÏNA, « L'anacardier dans le système de production au niveau paysan : une approche de rentabilité économique de la gestion du terroir ». Commune rurale d'Agoua, Sous-Préfecture de Bantè. Département du Zou. Thèse d'Ingénieur Agronome, FSA/UNB, (1996) 209 p.
- [7] - N. LANDING, M. C. MOHAMED, N. LAHAT, D. ABDOULAYE, M. O. T. KHEMES, C. A. NICOLAS and D. MALAINY, "Physicochemical, Biochemical and Antioxidant Potential Characterisation of Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.) from the Agro-Ecological Zone of Casamance (Senegal)" *scientific, research, publishing, journal : Food and Nutrition Sciences*, 13 (2022) 439 - 452
- [8] - ASSUNÇÃO et A. Z MERCADANTE, "Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.)". *Journal of Food Composition and Analysis*, 16 (6) (2003) 647 - 657
- [9] - E. M. LAUTIE, F. DORNIER, M. DE SOUZA et M. REYNES, « Les produits de l'anacardier : caractéristiques, voies de valorisation et marchés ». *Fruits*, 56 (2001) 235 - 248

- [10] - A. ARORA et I. DAS, "Post-harvest processing technology for cashew apple" - A review. *Journal of Food Engineering*, 194 (2016) 87 - 98
- [11] - D. SORO, « Couplage de procédés membranaires pour la clarification et la concentration du jus de pomme de cajou : performances et impacts sur la qualité des produits ». Thèse de Doctorat en Sciences des Procédés-Sciences des Aliments. Institut des Régions Chaudes (France), (2012) 152 p. (p3)
- [12] - S. W. PADONOU, D. OLOU, P. HOUSSOU, K. KARIMOU, M.C. TODOHOUE, J. DOSSOU et G. A. MENSAH, « Comparaison de quelques techniques d'extraction pour l'amélioration de la production et de la qualité du jus de pommes d'anacarde ». *Journal of Applied Biosciences*, 96 (2015) 9063 - 9071, ISSN 1997 - 5902
- [13] - G. H. FLEET, « Yeast interactions and wine flavour ». *International Journal of Food Microbiology*, 86 (1-2) (2003) 11 - 22
- [14] - CODEX ALIMENTARIUS, « General principles of food hygiene ». CAC/RCP 1-1969, Rev. 4. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2013)
- [15] - FAO/WHO, « Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods ». Microbiological Risk Assessment Series. Food and Agriculture Organization of the United Nations, N° 5 (2004)
- [16] - S. TOMBOANONA, J. A. RASOARIVÉLO, J. T. TSIAVAHANANAHARY, C. MAHAROMBAKA et H. L. T. RANARIJAONA, « Perception et impacts du changement climatique dans la ville de Mahajanga (Madagascar) ». 36th Conference of the International Association of Climatology, *ResearchGate*, (2023) 2 p.
- [17] - P. MANANJARA, H. L. TSIRINDRAVO, M. RAHERIMNDIMBY et A. RANDRIANIERENANA, « Etude des levures endogènes de *Evodia bilaha* (Rutaceae) endémique de Madagascar », (2016) 2 p.
- [18] - R. MERABTI, « Isolement et caractérisation des souches levurienne amylolytique à partir du sol Saharien Algérien ». Thèse de magistère. Université de Mentourie Constantine, (2006) 12 - 36 p.
- [19] - COFALEC, « Caractérisation de levures de boulangerie adoptée par comité de fabrication des levures de panification de l'Union Européenne ». Paris, (2006) 1 - 10
- [20] - HANSEN, « Genre *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* et *Saccharomyces uvarum* », (1908) 15 - 34
- [21] - C. BOURGEOIS et R. D. THOUVENOT, « Effet de la lysine sur la synthèse et l'activité de l'arginase et de l'ornithine transaminase chez le *Saccharomyces cerevisiae* » *Fac Science ; Eur. J. Biochem.*, Vol. 15, N°16 (1970) 140 - 145
- [22] - B. BOUTTON, « La physiologie de levure. Ds : Larpent J.P, Biotechnologie de levure ». Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris, (1991) 12 - 127
- [23] - J. DOSSOU, R. H. AHOUANSSOU, C. SANYA, V. AHYI, « Etude des performances techniques d'un filtre-pressé pour la filtration du jus de pomme d'anacarde (*Anacardium occidentale* Lin.) ». *Afr. J. Food Agric. Nutr*, 19 (3) (2019) 14690 - 14707, DOI: 10.18697/ajfand.86.17380, ISSN 1684: 5374
- [24] - NF EN ISO 4833-1: "Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms- Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique". *First édition*, (2013) 09 - 01
- [25] - NF EN ISO 7937, "Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* — Technique par comptage des colonies". Troisième édition, (2004) 08 - 15
- [26] - NF EN ISO 16649-2 : « Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive — Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44°C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate. Première édition », (2001) 04 - 15
- [27] - NF EN ISO 6888-1 : « Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 1 : Méthode utilisant le milieu gélosé de Baird- Parker ». Deuxième édition, (2021) 08

- [28] - NF EN ISO 6579-1, « Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella — Partie 1 : Recherche des Salmonella spp ». Première édition, (2017) 02
- [29] - A. OSHO, « Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice ». *African Journal of Biotechnology*, 4 (7) (2005) 660 - 662
- [30] - C. DIOP, K. G. GUEYE, E. TINE, M. SECK, A. MBAYE, I. O. H'MEIDY et A. TINE, « Étude sur la production d'éthanol à partir du jus d'Anacardium occidentale L. Darkassou » p 4,6
- [31] - V. GBOHAIDA, I. MOSSI, E. S. ADJOU, C. P. A. DOSSA, D. V. WOTTO, F. AVLESSI, D. C. K. SOHOUNHLOUE, « Évaluation du pouvoir fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et de *S. carlsbergensis* dans la production de bioéthanol à partir du jus de la pomme cajou », (2016) 1 p.
- [32] - CATTEAU, « Les Levures, cours de microbiologie des aliments » Institut Pasteur de Lille, France, (1988) 161 - 180 p.
- [33] - A. L. KOUADIO, « Etude de la Microflore de la Pulpe d'Ananas (*Ananas comosus*, variété cayenne lisse) », DEA, Université de Cocody de (Côte d'Ivoire), (1997) 33 p.
- [34] - E. LAUTIE, « Valorisation de la pomme de cajou par déshydratation osmotique sous vide ». Mémoire de Master, École nationale supérieure des Industries alimentaires, Section Industries alimentaires régions chaudes (Ensia-Siarc), Montpellier, France, (2000) 82 p.
- [35] - C. P. KURTZMAN J. W. FELL et T. BOEKHOUT, "The Yeasts: A Taxonomic Study", (5th ed.). Elsevier, (2011), ISBN: 9780080931272
- [36] - J. A. BARNETT, R. W. PAINE and D. YARROW, "Yeast : *Characteristics and Identification*". University Press, Cambridge, (1990) 89 - 91
- [37] - G. H. FLEET, "Yeasts in foods and beverages : impact on product quality and safety". *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2) (2007) 170 - 175
- [38] - J. LODDER, "The Yeasts: A Taxonomic Study". North-Holland Publishing Company, (1970), <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120119>
- [39] - J. P. LARPENT, J. VERGEADE et J. GUIRAUD, "Les levures et leurs aptitudes fermentaires". Techniques et applications en microbiologie industrielle. Éditions Techniques, (1976) 275 - 285 p.
- [40] - A. H. ROSE et J. S. HARRISON, *The Yeasts: Biology of Yeasts*. Academic Press, (1987) 423 p.
- [41] - H. J. PHAFF, M. W. MILLER and E. M. MRAK, "*The Life of Yeasts*". Harvard University Press, (1978) 341 p.
- [42] - P. TUFVESSON, A. EKMAN, R. R. SARDARI, K. ENGDALH & L. TUFVESSON, "Microbiological Quality of Fermented Fruit Beverages: A Study on Yeast and Bacteria Diversity." *Journal of Food Science*, 78 (8) (2013) 1375 - 1381
- [43] - C. P. KURTZMAN et S. DROBY, "Microbiological Evaluation of Alcoholic Beverages : Influence of Microorganisms on the Fermentation Process". *International Journal of Food Microbiology*, 68 (1) (2001) 61 - 70
- [44] - L. R. BEUCHAT, "Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw: A Review". *Food Safety Issues*. FAO, (1998) 42 p.
- [45] - L. J. HARRIS, J. N. FARBER, L. R. BEUCHAT, M. E. PARISH, T. V. SUSLOW, E. H. GARRETT et F. F. BUSTA, "Microbial Safety of Fresh and Processed Fruits and Vegetables." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (1) (2003) 78 - 141
- [46] - M. E. PARISH, L. R. BEUCHAT, T. V. SUSLOW, L. J. HARRIS, E. H. GARRETT et J. N. FARBER, "Microbial Hazards of Freshly Squeezed Juices : A Review." *Journal of Food Protection*, 60 (10) (1997) 1305 - 1314
- [47] - J. M. JAY, M. J. LOESSNER and D. A. GOLDEN, "*Modern Food Microbiology*". 7th Edition, Springer Science and Business Media, Inc., New York, 63 - 90 (2005) 101 - 125