

# IMPACTS DE LA FERMENTATION DU CACAO SUR LA CROISSANCE DE LA FLORE MICROBIENNE ET LA QUALITE DES FEVES MARCHANDES

L. BANKOFFI<sup>1</sup>, G. H. OUATTARA<sup>2</sup>, T. G. KAROU<sup>1,2</sup>, S. TAGRO GUEHI<sup>3</sup>, J. G. NEMLIN<sup>1</sup> et J. K. DIOPOH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CNRA SRT, 08 BP 881 Abidjan 08, Côte d'Ivoire. E-mail : lbankoffi@yahoo.com / lbankoffi@aviso.ci

<sup>2</sup>Université Félix Houphouët Boigny, UFR Biosciences, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup>Université Nangui Abrogoua, UFR Sciences et Technologies des Aliments.

## RESUME

La fermentation du cacao est une opération essentielle dans la production de fèves marchandes pour la fabrication du chocolat. Elle demeure un processus entièrement microbien difficile à contrôler de sorte que la qualité marchande du cacao produit, reste variable et aléatoire. La présente étude a pour objectif d'étudier l'influence du type de fermentation sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. De façon spécifique, il s'agit d'étudier l'impact des fermentations en caisse, sur feuilles de bananier et sur bâche plastique conduites selon les techniques paysannes sur la qualité des fèves marchandes issues de ces trois types de fermentations. Ainsi, la croissance de la flore microbienne (levures et moisissures, bactéries acétiques et lactiques, *bacillus*) impliquée dans le processus de fermentation des fèves de cacao a été évaluée par dénombrement selon la méthode de dilution décimale. Les souches ont été identifiées par des méthodes biochimiques et morphologiques, sur géloses sélectives. Les paramètres physico-chimiques (pH et température) de la masse fermentaire ont été suivis. La technique de Cut Test a permis d'évaluer la qualité des fèves fermentées et séchées. Les résultats ont montré la même succession microbienne mais avec des temps d'apparition variables dans toutes les fermentations. Cependant, les fermentations en caisse et en bâche offraient une meilleure croissance des bactéries acétiques avec des pics de  $8 \cdot 10^6$  et  $44 \cdot 10^4$  UFC/g de fèves, respectivement. De même, la croissance des levures est 17 fois plus importante dans la fermentation conduite sur des feuilles de bananier que dans les fermentations sur bâche et en caisse. Le développement des bactéries lactiques est plus accru au niveau de la fermentation conduite sur bâche ( $891 \cdot 10^9$  UFC/g) que celles conduites en caisse ( $18 \cdot 10^8$  UFC/g) et sur des feuilles de bananier ( $153 \cdot 10^7$  UFC/g). Bien que l'on obtient un cacao globalement de même qualité (Grade I) avec les trois types de fermentation, le pourcentage de fèves brunes, caractéristiques d'un cacao bien fermenté est plus élevé (80 %) dans les fermentations conduites en caisse et sur des feuilles de bananier contre 74 % en fermentation conduite sur bâche. Le pH et la température augmentent et évoluent globalement, de la même façon dans les trois types de fermentations. Les résultats de cette étude montrent que le type de fermentation appliqué aux fèves peut contribuer à l'identification d'espèces microbiennes à haut potentiel technologique pouvant permettre d'obtenir des fèves de qualité marchande satisfaisante et participer à la sélection de starters pouvant intervenir dans les programmes d'amélioration de la fermentation du cacao.

**Mots clés :** Cacao, fermentation, levures, bactéries, *bacillus*, moisissures.

## ABSTRACT

FERMENTATIONS IMPACTS ON MICROBIAL GROWTH AND ON THE FERMENTED DRIED COCOA BEANS

*Cocoa fermentation is a crucial step in the process of technological transformation of cocoa beans into chocolate. Fermentation of cocoa beans is a complex microbial process which is difficult to control and the fermented and dried (FD) cocoa beans obtained are of variable quality. The main objective of this work is to investigate on the influence of the type of fermentation on the microbial growth and on the commercial quality of FD cocoa beans. Specifically, fermentations conducted according to producers practices in wooden boxes, on banana leaves and on tarpaulin are studied in order to find out their impacts on the quality of the fermented beans. Microbial growth (Yeasts and molds, acetic acid and lactic acid bacteria and bacillus) was monitored during fermentation by enumeration using decimal dilution and plate count method. Strains were identified by biochemical and morphological methods on selective agar. Temperature and pH were also*

monitored during fermentation process. Cut test technique allowed assessment of the cocoa quality from the different fermentations. Results show the same microbial succession pattern in the three fermentations. A raise in the pH and temperature evolving in the same way is globally observed in the three types of fermentations. However, wooden box and tarpaulin fermentations provided a better growth of acetic acid bacteria with a peak of  $8 \cdot 10^6$  and  $44 \cdot 10^4$  UFC/g of beans compared to banana leaves fermentation. The growth of yeasts was 17 folds more important in banana leaves fermentation than in wooden box and tarpaulin fermentations. The development of lactic acid bacteria was more pronounced in tarpaulin ( $891 \cdot 10^9$  UFC/g) than in wooden box ( $18 \cdot 10^8$  UFC/g) and banana leaves ( $153 \cdot 10^7$  UFC/g). Although the same quality is globally recorded in the three fermentations (Grade I), brown cocoa bean characterizing a good fermentation was more elevated in wooden box and banana leaves fermentation (80 %) than in tarpaulin one (74 %). Together, all these results suggest that the type of fermentations applied on cocoa beans could contribute to select microbial strains with high technological potentiality leading to a good quality of fermented and dried cocoa beans and also, could help to select starters strains for improving cacao beans fermentation process.

**Keys word :** Cacao, fermentation, yeast, bacteria, bacillus, fungi.

## INTRODUCTION

Le cacao est un produit agricole de rente de grande importance économique pour la Côte d'Ivoire (Guehi *et al.*, 2007). Sa transformation technologique en chocolat et produits dérivés nécessite un processus primaire de manutention post-récolte comprenant l'écabossage, la fermentation et le séchage (Timbié *et al.*, 1978 ; Thompson *et al.*, 2001).

La fermentation est une des principales activités post récolte dans la production des fèves marchandes de cacao. Bien conduite, elle participe et imprime en général, la qualité marchande et organoleptique des fèves destinées à la fabrication du chocolat (Schwan et Wheals 2004). Au cours de la fermentation, la pulpe, substrat de la fermentation (Roelofsen, 1958) est dégradée suite à un ensemble complexe de réactions biochimiques et enzymatiques auxquelles participent essentiellement les levures, les bactéries lactiques, les bactéries acétiques et les *bacillus* (Schwan, 1996 ; Ouattara *et al.*, 2011). Les métabolites résultant de ces réactions modifient les paramètres tels que le pH et la température du milieu fermentaire. Cela conduit au fil du temps, à la mise en place d'un environnement propice au développement ou à l'inhibition de microorganismes impliqués dans le processus fermentaires du cacao. Il s'en suit alors un ordre d'émergence et de succession microbienne qui conduit au développement des précurseurs spécifiques de l'arôme chocolat (Schwan *et al.*, 1995 ; Schwan et Wheals, 2004). Cette succession microbienne, en rapport avec la

séquence des réactions enzymatiques et de métabolites produits, impacte fortement la qualité du cacao (Schwan, 1998 ; Camu *et al.*, 2007). Cependant, l'ordre d'émergence et de succession des microorganismes peut varier en fonction des changements des conditions climatiques locales (Barker *et al.*, 1994 ; Ardhana et Fleet, 2003), des paramètres physico-chimiques du milieu de fermentation et peut par conséquent influencer positivement ou négativement la qualité de la fève de cacao. En plus, les différents modes et techniques de fermentation pratiquées en Côte d'Ivoire notamment les fermentations en caisse, sur feuilles de bananiers et sur bâche plastique sont susceptibles d'influencer différemment la flore microbienne et entrainer un changement en sa composition et en sa succession tout comme les paramètres physico-chimiques du milieu fermentaire. Pourtant, aucune étude n'a encore été menée dans ce sens sur les différentes méthodes de fermentation pratiquées en Côte d'Ivoire. La fermentation demeure un processus complexe et difficile à contrôler surtout dans le cas de la fermentation des fèves de cacao de type spontané ou naturel où la contamination microbienne se fait de façon hasardeuse et aléatoire.

L'objectif de la présente étude est de déterminer d'une part, l'impact de différents modes de fermentation pratiqués par les producteurs sur la croissance, la succession et l'identité des microorganismes impliqués dans ces différents modes de fermentation et d'autre part, d'apprécier la qualité marchande des fèves issues de ces modes de fermentation.

De façon spécifique, il s'agit d'étudier l'impact des fermentations en caisse, sur feuilles de bananier et sur bâche plastique conduites selon les techniques paysannes sur la qualité marchandes des fèves issues de chacun de ces trois types de fermentations.

## MATERIEL ET METHODES

### MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal est constitué de cabosses de cacao de type Forastero. Ces cabosses proviennent des plantations de la Station de recherche et d'expérimentation du CNRA / Divo. Elles ont été récoltées mures et rassemblées avant le début du processus de manutention post-récolte.

### TRAITEMENT PRIMAIRE POST-RECOLTE

Le processus de manutention post-récolte conduisant à la production des fèves fermentées et séchées ou fèves marchandes de cacao, s'est effectué selon les étapes séquentielles écabossage-fermentation-séchage.

L'écabossage a été effectué quatre jours après la récolte, dans les conditions essentiellement paysannes sans aucune disposition particulière. L'ouverture des cabosses s'est faite à l'aide de gourdins ou de machettes. Les fèves ont été séparées du placenta à la main, avant d'être mises à fermenter.

Les trois types de fermentations de cacao les plus usuelles en Côte d'Ivoire ont été utilisées notamment la fermentation en caisse, la fermentation en feuilles de bananier et la fermentation en bâche plastique. Quelque soit le type de fermentation, le tas de fèves a été de 500 kg. Les caisses sont perforées en leur base pour le drainage du jus issu du mucilage des fèves. Les feuilles de bananier et la bâche sont disposées selon une légère pente qui favorise l'écoulement du jus. Les fermentations ont duré six jours sans aucun brassage, sauf pour la fermentation en caisse.

Le séchage des fèves fermentées a été fait en couche mince de trois (03) à cinq (05) cm d'épaisseur sur aire cimentée, sur claie et sur bâche à raison de trois répétitions par aire de

séchage. La durée journalière de séchage est de 07 h s'étendant de 9 h (matin) à 16 h (après-midi). Au cours du séchage, les fèves ont été brassées trois (03) fois par jour, respectivement à 9 h, 12 h et 16 h. En dehors de la période de séchage, les fèves sont protégées de la réhumidification à l'aide de films plastiques. A 8 % de teneur en eau, les fèves ont été considérées sèches. A la fin du séchage, un échantillon de 200 g de fèves fermentées et séchées est prélevé de chaque aire de séchage pour être mis dans un sachet plastique et stocké à température ambiante, pour en évaluer la qualité marchande.

### ECHANTILLONNAGE

Au cours de la fermentation, des prélèvements de 500 g de fèves chacun, ont été effectués à intervalles réguliers de 6 h pendant les trois premiers jours et de 12 h les trois derniers jours en différents endroits et à différentes profondeurs de la masse fermentaire de fèves, à l'aide de sachet stériles de type stomacher. Ces échantillons ont servi à la détermination des paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température et l'activité de l'eau ( $A_w$ ) et aux analyses microbiologiques.

### ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

#### Détermination du pH du milieu au cours de la fermentation

Le pH a été mesuré en mettant 50 à 60 g de fèves dans un volume d'eau distillée dans la proportion 1 :1 (p/v). Après 5 à 10 mn de contact et de mélange à l'aide d'un stomacher, le pH de la solution obtenue est mesuré à l'aide d'un pHmètre (Hanna instrument).

#### Détermination de l'activité de l'eau ( $A_w$ ) au cours du séchage

L'activité d'eau a été mesurée en plaçant 100 à 200 g de fèves dans un sachet hermétique puis laissé au repos pendant au moins 18 h. La mesure de l' $A_w$  est faite en plongeant la sonde d'un Awmètre de type Rotronic dans le sachet. L' $A_w$  a été vérifié toutes les 24 h, jusqu'à obtention d'une valeur constante.

### Détermination de la teneur en eau au cours du séchage

Dix grammes de fèves provenant de chaque échantillon sont mis dans une capsule stérile qui est pesé (poids P1). La capsule est ensuite mise à l'étuve à une température de 105 °C pendant 16 h. La capsule est sortie de l'étuve puis laissée au dessiccateur pendant au moins 15 mn pour refroidir l'ensemble fèves + capsule puis pesé à nouveau (poids P2). La teneur en eau est exprimée comme suit :

$$T (\%) = \frac{P1-P2}{P1} \times 100$$

### Analyses microbiologiques

#### *Isolement et dénombrement des microorganismes*

L'isolement et le dénombrement des microorganismes s'est effectué par la méthode de dilution décimale à partir d'une solution mère constituée de 25 g de fèves de cacao mélangés et barbotés dans 225 ml d'eau peptonnée tamponnée (Difco) pendant 15 mn. Ensuite, une gamme de dilution décimale réalisée avec une solution de tryptone (Difco) à partir de la solution mère a été utilisée pour ensemercer des milieux de culture par étalement. Les milieux de culture ont été mis à incuber à 30 °C pendant 24 à 72 h. Les genres microbiens constituant la microflore majeure de la fermentation du cacao ont été recherchés, notamment les levures, les bactéries lactiques, les bactéries acétiques, les bacillus et les moisissures.

Le dénombrement des levures s'est faite à la fois par ensemencement en surface de la gélose Malt Extract Agar (Merck), additionnée de chloramphénicol et de chlorotétracycline (Sigma, St Louis, USA) respectivement à 100 mg/l et à 50 mg/l pour inhiber la croissance des bactéries.

Les bactéries lactiques ont été dénombrées à la fois sur gélose MRS (Merck), additionnée de cycloheximide 100 mg/l pour inhiber la croissance des levures et moisissures, et sur gélose M17 également additionnée de cycloheximide 100 mg/l mais en plus de 0,1% de cystéine-hydrochloride pour créer les conditions anaérobiques durant l'incubation.

Les bactéries acétiques ont été dénombrées par ensemencement en surface des géloses GYC (Merck) et YPM (Merck) additionnées de 100 mg/l de cycloheximide pour inhiber la croissance des levures et moisissures et de 100 mg/l de

pénicilline pour inhiber spécifiquement la croissance des bactéries lactiques.

Le dénombrement des *Bacillus* spp s'est réalisé par ensemencement en surface sur gélose Nutritive (NA, Merck) additionnée de 100 mg/l de cycloheximide pour inhiber la croissance des levures et moisissures.

Les moisissures ont été isolées sur gélose DG18 additionnée de 100 mg/l de chloramphénicol pour inhiber la croissance des bactéries. Le dénombrement des microorganismes, a été exprimé en UFC (unités formant colonies).

#### *Identification de la flore microbienne isolée*

L'identification des souches s'est faite sur la base de leurs caractères morphologiques et biochimiques clés. Les levures se présentaient à l'état frais sous forme de grosses cellules arrondies ou ovales. Les moisissures ont été identifiées de façon visuelle ou au microscope par leur mycélium filamenteux qui les caractérise (Kreger-van, 1984). Les bactéries lactiques ont été identifiées selon la méthode standard (Passos *et al.*, 1984), elles ont été caractérisées comme des bacilles à Gram positif, incapables de sporuler, immobiles et donnant une réponse négative au test de la catalase. Les bactéries acétiques ont été caractérisées selon la méthode décrite par Passos et Passos, (1985), elles ont été identifiées comme des bacilles Gram négatif, de très petite taille, aérobies strictes, catalase positif. Les *Bacillus* ont été identifiés grâce à leurs caractères de bacilles Gram positif, capable de sporuler, donnant une réponse positive au test de la catalase et de l'oxydase comme décrit par Ouattara *et al.* (2008).

### Détermination de la qualité des fèves marchandes

#### *Epreuve à la coupe ou cut test*

La qualité des fèves fermentées et séchées a été évaluée par la technique du cut test qui mesure l'index de fermentation. Cette technique se basant sur la couleur comme critère d'évaluation, est couramment utilisée pour apprécier la convenance des fèves à la fabrication du chocolat (Del Boca, 1962 ; Shamsuddin et Dimick, 1986). Ainsi, 300 fèves sont prélevées au hasard dans chaque échantillon de fèves de cacao. Chaque fève est coupée longitudinalement et placée sur une planche à cut test. La couleur du cotylédon est observée à l'oeil nu

grâce à la lumière du jour et classée dans l'une des catégories : très brune (bien fermentée), partiellement brunes (moins bien fermentée), partiellement violette (insuffisamment fermentée), violette (non fermentée), noire (ardoisée), moisies, défectueuses (endommagées par les insectes) et germée. A ce test, a été associé le grainage.

#### Grainage

Le grainage constitue le nombre de fèves saines et normales de cacao contenu dans une masse donnée de fèves. Pour cette étude, 100 grammes de fèves sont pesés et comptés. Le poids moyen d'une bonne fève étant d'1 gramme, la qualité du grainage sera fonction du nombre de fèves. Ainsi, plus le nombre de fèves obtenus pour 100 g est faible, plus le grainage est bon. Le grainage a été évalué deux fois sur le même échantillon puis une moyenne a été effectuée pour déterminer le nombre de fèves dans 100 g.

## RESULTATS

### ORDRE D'EMERGENCE DE LA MICROFLORE DANS LES DIFFERENTES FERMENTATIONS

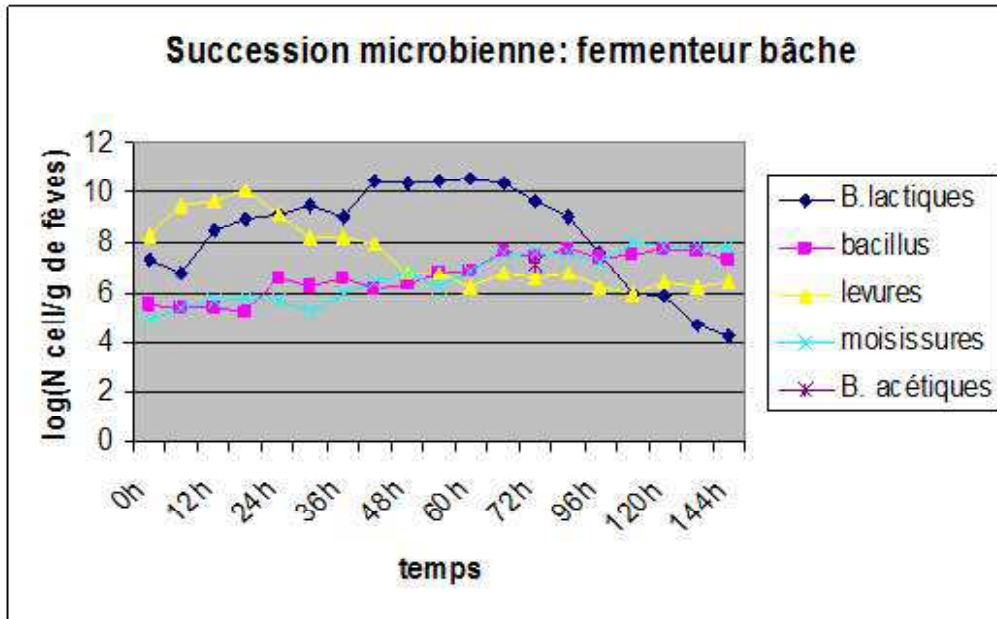
La figure 1 montre la succession et l'allure de croissances des microorganismes au cours de la fermentation des fèves de cacao en bâches plastiques. Les levures atteignent un pic de croissance au bout de 18 h de fermentation, et cette croissance devient minimale à partir de 48 heures puis se stabilise durant le reste de la fermentation. Le pic de bactéries lactiques se situe vers 42 h et la population de bactéries lactiques reste élevé jusqu'à 72 h de fermentation avant de commencer à chuter. Dans ce fermenteur, les bactéries acétiques n'ont été isolées qu'après 72 h de fermentation. Les

bacillus évoluent lentement pour atteindre un pic à 84 h (4 - 5<sup>e</sup> j) de fermentation. Les moisissures évoluent presque de la même façon que les bacillus mais leur pic est atteint à 108 h.

Dans la fermentation en caisse (Figure 2), le pic de levures est aussi atteint après 18 h de fermentation comme dans le cas de la fermentation en bâche. Les bactéries lactiques, atteignent leur croissance maximale après 48 heures de fermentation. Les bactéries acétiques sont détectées entre 54 h et 84 h. L'évolution des *Bacillus* et des moisissures est semblable à celle observée dans le fermenteur bâche, avec cependant des pics apparaissent après 96 h pour les *Bacillus* et 120 h pour les moisissures.

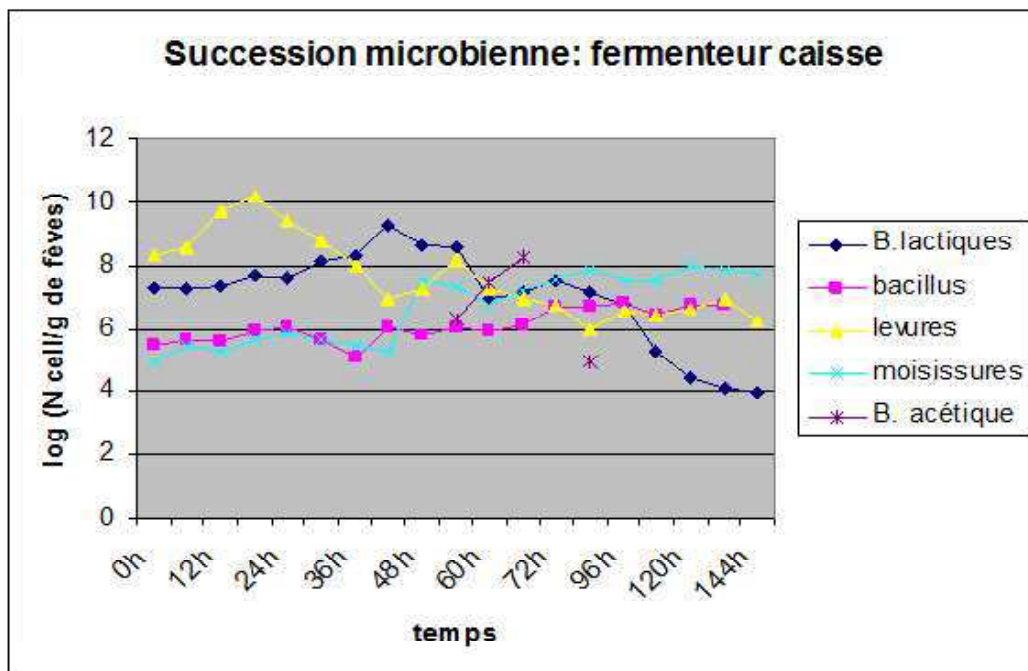
Au cours de la fermentation de cacao en feuilles de bananiers, la flore de levures est maximale après 24 h. Les bactéries lactiques atteignent leur pic de croissance dans le milieu fermentaire après 48 h alors que les bactéries acétiques n'émergent qu'après 60 h de fermentation. Elles sont présentes dans le milieu jusqu'à 66 h de fermentation avant de chuter à leur plus bas niveau. Les *Bacillus* atteignent leur pic de développement après à 84 h tandis que le développement des moisissures est à son maximum après 108 h de fermentation.

Les bactéries acétiques sont restées globalement au niveau de croissance le plus bas par rapport aux autres microorganismes pendant les fermentations du cacao. A certaines périodes des fermentations, ces souches n'ont pas pu être isolées (Figures 1, 2, 3). Toutefois, leur émergence survient entre 66 et 84 h de fermentation. En fermentation feuille de bananier, ces bactéries atteignent leur croissance maximale à la 66<sup>e</sup> h avec une population de 44 104 UFC/g de pulpe. Dans les fermentations caisse et bâche, les pics de croissance sont plus importants, respectivement de 8 106 et 5 104 UFC/g de pulpe.



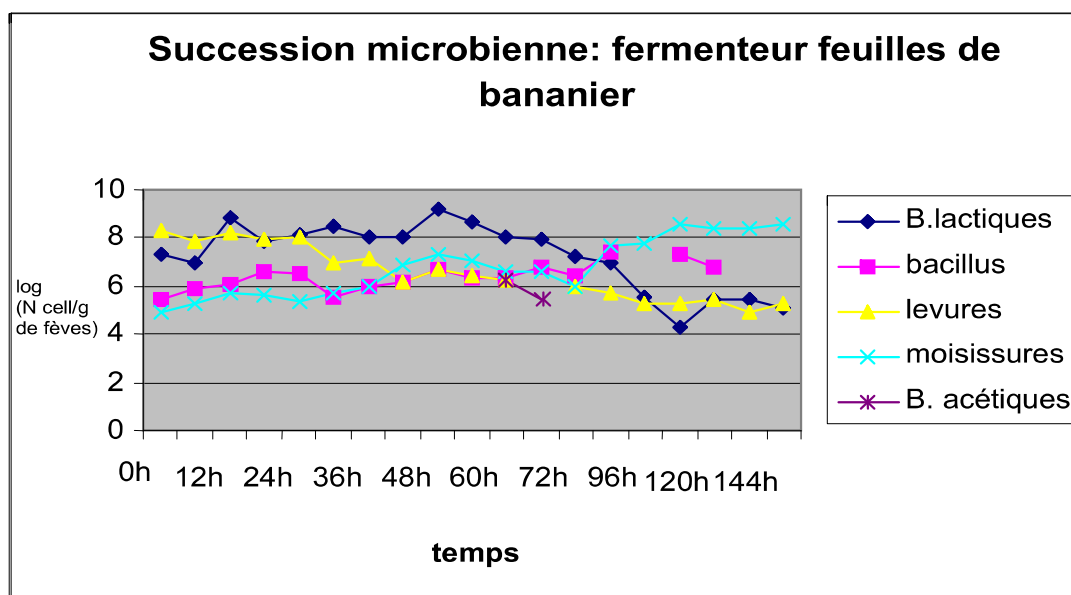
**Figure 1** : Succession microbienne au cours de la fermentation des fèves de cacao en bâche plastique.

*Microbial succession during cocoa beans fermentation on tarpaulin.*



**Figure 2** : Succession microbienne au cours de la fermentation des fèves de cacao conduite en caisse.

*Microbial succession during cocoa beans fermentation carried out in wooden box.*



**Figure 3** : Succession microbienne au cours de la fermentation des fèves de cacao conduite en feuilles de bananier.

*Microbial succession during cocoa beans fermentation carried out on banana leaves.*

#### CROISSANCE MICROBIENNE DANS LES DIFFERENTES FERMENTATIONS

La population de levures est plus importante dans les fermenteurs caisse et bêche, que dans le fermenteur feuilles de bananier (Tableau 1). En effet les pics de levures atteints dans les fermenteurs caisse et bêche correspondent respectivement à une population de 153 108 et 144 107 UFC/g contre 9 107 UFC/g dans le fermenteur feuilles de bananier. La population de levure est environ 17 fois moins importante dans le fermenteur feuille de bananier que dans les fermenteurs bêche et caisse. De même le développement des bactéries lactiques est plus accru dans le fermenteur bêche (avec un pic de 891 109 UFC/g) que dans les fermenteurs caisse (pic 18 108 UFC/g) et feuilles de bananier (pic de 153 107 UFC/g) (Tableau 1). Les pics de *bacillus* et de moisissures sont plus élevés dans les fermenteurs bêche et feuilles de bananier que dans le fermenteur caisse.

Les résultats montrent une variation dans le temps d'émergence, et la vitesse de croissance des microorganismes en fonction du type de fermentation (Tableau 1). Par contre, la succession microbienne dans les trois fermentations est restée similaire Levures-bactéries lactiques- bactéries acétique- *bacillus*-moisissure (Tableau 1).

Jusqu'à 30 h de fermentation, la température dans les différents fermenteurs n'excède pas 33 °C (Figure 4). Elle est relativement basse dans les fermenteurs bêche et feuilles de bananier et ne dépasse pas 43 °C durant la fermentation.

A 72 h de fermentation, le pic de température est atteint dans les fermenteurs caisse (46 °C), et bêche (42,2). Dans le fermenteur feuilles de bananier, ce pic survient à 84 h, il est alors de 42,29 °C.

La Figure 5 montre les variations de pH au cours de la fermentation du cacao dans les trois fermenteurs. Le pH est en dessous de 4 dans tous les fermenteurs durant les 18 premières heures de fermentation après lesquelles il y a une augmentation du pH (Figure 5). Après 36 h, une baisse de pH caractérisée par une inflexion de la courbe est observée dans le fermenteur bêche. Cette baisse de pH apparaît dans les fermenteurs feuilles de bananier et caisse après 42 h de fermentation. Cette inflexion est à nouveau observée à la 66<sup>e</sup> h de fermentation dans les fermenteurs caisse et bêches. A la fin de la fermentation le pH a augmenté et avoisine 5,5.

Les résultats consignés dans le tableau 2 montrent que toutes les fermentations ont donné un pourcentage de fèves moisies, ardoisée et défectueuse inférieur à 3 %. Ceci a donc permis

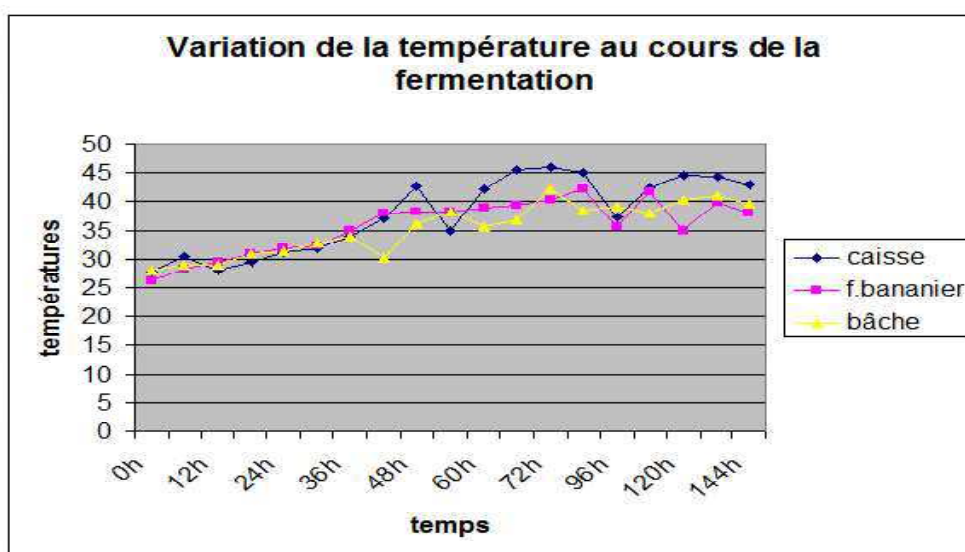
de classer les fèves marchandes de cacao issues des trois types de fermentation dans le grade I, c'est-à-dire cacao de bonne qualité selon les normes internationales (Mossu, 1990). En outre, les fèves brunes sont indicatrices d'une bonne fermentation de cacao et peuvent constituer par conséquent un critère déterminant. Bien que les trois types de fermentation aient donné la même qualité, on constate que les

fermentations en caisse et en feuille de bananier donnent un plus grand nombre de fèves brunes (environ 80 % en moyenne) que la fermentation en bâche plastique. Les fèves violettes indicatrices d'une fermentation incomplète sont par conséquent, plus présentes dans la fermentation en bâche plastique avec environ 25 % de fèves. On note toutefois l'absence de fèves germées et de fèves ardoisées dans toutes les fermentations.

**Tableau 1** : Croissance et ordre de succession microbienne au cours des fermentations.

*Growth and microbial succession during cocoa beans fermentations.*

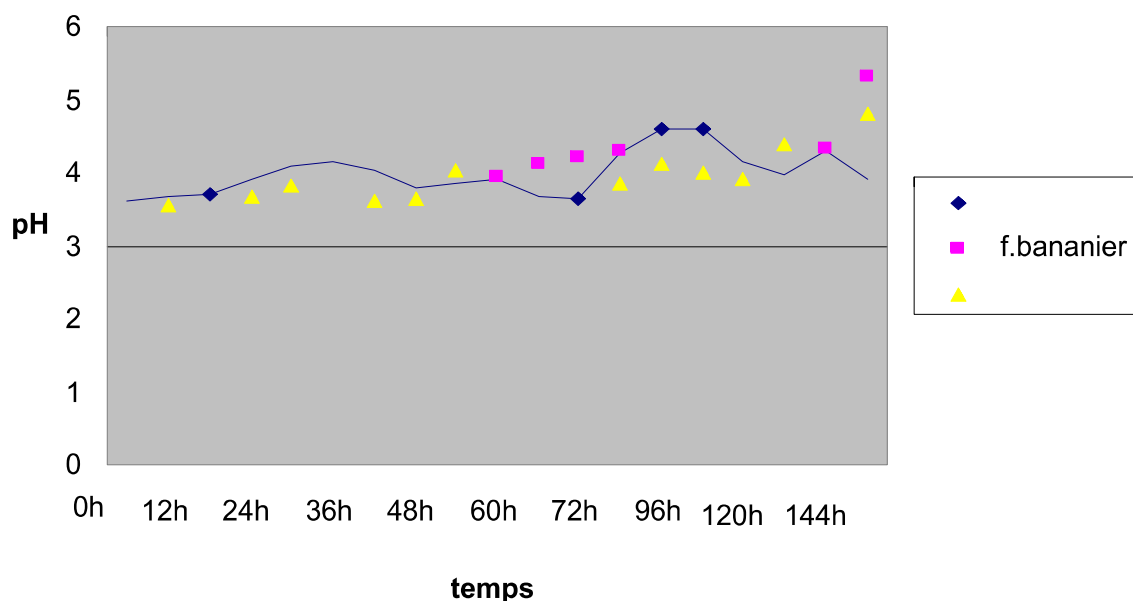
		Microflore fermentaire du cacao					Ordre de succession microbienne
		Bactéries acétiques (BA)	Bactéries lactiques (BL)	Bacillus	Levures	Moisissures	
Fermentation en caisse	Heure d'émergence (h)	72	42	96	18	120	Levures-BL-BA-Bacillus-Moisissures
	Taille de la population microbienne (UFC/g de pulpe)	$8.10^6$	$18.10^8$	$54.10^5$	$153.10^8$	$81.10^6$	
Fermentation en bâche plastique	Heure d'émergence (h)	72	42	108	18	108	Levures-BL-BA-Bacillus-Moisissures
	Taille de la population microbienne (UFC/g de pulpe)	$5.10^4$	$891.10^9$	$612.10^5$	$144.10^8$	$99.10^6$	
Fermentation en feuilles de bananiers	Heure d'émergence (h)	66	48	84	24	108	Levures-BL-BA-Bacillus-Moisissures
	Taille de la population microbienne (UFC/g de pulpe)	$44.10^4$	$153.10^7$	$270.10^5$	$9.10^7$	$36.10^7$	



**Figure 4** : Variation de la température au cours de la fermentation des fèves de cacao conduite en caisse, en feuilles de bananier et en bâche plastique.

*Kinetic of temperature during cocoa beans fermentations carried out in wooden box, on banana leaves and on tarpaulin.*





**Figure 5 :** Variation du pH au cours de la fermentation des fèves de cacao conduite en caisse, en feuilles de bananier et en bâche plastique.

*Kinetic of pH during cocoa beans fermentations carried out in wooden box, on banana leaves and on tarpaulin.*

**Tableau 2 :** Classification et grade des fèves fermentées et séchées.

*Classification and grade of fermented and dried cocoa beans.*

Type de fermentation	Aire de séchage	Brune (%)	Violette (%)	Ardoisée (%)	Moisie (%)	Défectueuse (%)	Germée (%)	Plates (%)	Grade
Caisse	Ciment	85,5	13	0	1,17	0,33	0	0	I
	Bâche	77,5	21	0	0	0,17	0	1,33	I
	Claie	76,5	23,17	0	0,17	0	0	0,17	I
Bâche plastique	Ciment	69,33	30	0	0,17	0,17	0	0,33	I
	Bâche	73,17	25,67	0	0	0	0	1,17	I
	Claie	80,83	19,17	0	0	0	0	0	I
Feuilles de bananier	Ciment	72,83	23,16	0	1,5	0,83	0	1	I
	Bâche	85,5	13,83	0	0,67	0	0	0	I
	Claie	79,17	19,17	0	0,33	0,17	0	1,17	I

## DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons investigué l'impact de trois types de fermentation du cacao sur la croissance microbienne et la qualité marchande du cacao.

A l'issu du processus de manutention post-récolte effectué (récolte, écabossage, fermentation, séchage, entreposage), l'absence de fèves germées montre que les cabosses ont

été récoltées à un stade de maturité convenable tandis que l'absence de fèves ardoisées indique un processus de fermentation conduit selon les techniques appropriées. En effet, les fèves germées et ardoisées proviennent respectivement des cabosses trop mûres et d'une mauvaise fermentation voire d'une absence de fermentation qualifiée de fermentation nulle par Irié Bi *et al.* (2002). De même la teneur en eau mesurée après le séchage et après entreposage, indiquant une valeur inférieure à 8 %, montre

que les fèves fermentées ont été convenablement séchées et entreposées.

L'analyse de la flore microbienne au cours de la fermentation du cacao, étape essentielle du processus post-récolte, a montré que l'ordre de succession et d'émergence microbienne dans les trois fermentations (caisse, bêche plastique, et feuilles de bananier) est similaire. D'abord les levures, responsables de la fermentation alcoolique émergent entre 18 et 24 h et elles sont à l'origine des conditions de vie favorables pour les bactéries grâce au métabolisme de l'acide citrique et à une élévation du pH (Ostovar et Keeney, 1973 ; Schwan et Wheals, 2004). Ensuite apparaissent les bactéries lactiques après 42 à 48 h de fermentation. L'émergence de ces bactéries lactiques coïncide avec une inflexion du pH dans les trois fermenteurs, autour de 36 - 42 h probablement due à une production d'acide lactique qui acidifie le milieu fermentaire. Ensuite, les bactéries acétiques apparaissent entre 66 et 72 h, elles utilisent l'alcool produit par les levures comme substrat pour produire de l'acide acétique (Nielsen *et al.*, 2007). L'oxydation de l'éthanol en acide acétique, est une réaction exothermique qui s'accompagne d'un dégagement considérable de chaleur, susceptible d'induire une augmentation de la température de la masse fermentaire. Cela suggère que le pic de température observé au niveau de tous les trois fermenteurs pendant cette période, soit lié à l'émergence des bactéries acétiques. Parallèlement la deuxième inflexion de pH observée dans les différentes fermentations vers 66 - 72 h correspondrait à la production d'acide acétique par ces bactéries.

Les *Bacillus* apparaissent dans le milieu fermentaire bien plus tard après 84 h de fermentation dans les conditions de pH et de température élevés. Ces bactéries en période d'émergence sont en population très importante (Schwan et Wheals, 2004). Enfin, les moisissures sont les derniers microorganismes à apparaître dans le milieu fermentaire au niveau de tous les fermenteurs.

Le même ordre de succession microbienne a été observé dans les fermentations de cacao au Ghana, Brésil et Malaisie (Schwan et Wheals, 2004). Bien que l'ordre de succession microbienne soit resté invariable dans toutes les fermentations, cette étude montre que les différents fermenteurs offrent des conditions de culture plus favorables pour certains microorganismes que d'autres. Ainsi, la

population de levure est environ 17 fois moins importante dans le fermenteur feuille de bananier que dans les fermenteurs bêche et caisse. L'étanchéité de la bêche plastique et la profondeur de la caisse sont plus susceptibles d'offrir des conditions d'anaérobiose favorables au développement des levures, qui ont un métabolisme préférentiellement anaérobie, par rapport aux feuilles de bananier. De même le développement des bactéries lactiques est extrêmement plus accru dans le fermenteur bêche et feuille de bananier que le fermenteur caisse. Les pics de bacillus et de moisissures sont plus élevés dans les fermenteurs bêche et feuilles de bananier que dans le fermenteur caisse. Ces observations montrent que les différents fermenteurs en relation avec les conditions qui leur sont propres, ont une influence plus ou moins marquée sur la multiplication microbienne et pouvant être plus ou moins spécifique à un type microbien. La fermentation étant un processus entièrement microbien, ces observations pourraient suggérer que le type de fermentation peut avoir une influence sur la qualité des fèves fermentées et séchées. Par exemple, les fermenteurs favorisant un développement accru des moisissures sont plus susceptibles de donner un cacao de moins bonne qualité que ceux favorisant le développement des bactéries acétiques ou des levures. En effet, les moisissures sont capables de produire des composés à l'origine d'une mauvaise odeur du cacao (Ribeiro *et al.*, 1986 ; Schwan et Wheals, 2004) tandis que les bactéries acétiques sont connues comme déclencheurs des réactions biochimiques conduisant à la formation des précurseurs spécifiques de l'arôme chocolat (Nielsen *et al.*, 2007 ; Camu *et al.*, 2007).

Cependant, les résultats du Cut Test indiquent que le cacao issu de tous les trois fermenteurs est de grade I, c'est-à-dire de bonne qualité et qu'il n'y a pas de différence entre les types de fermentation. Ces résultats soulèvent la question de la fiabilité et de la précision du Cut Test dans le contexte de la présente étude. En effet, le Cut Test est une méthode standard qui utilise la norme internationale FAO, pour classer les fèves en grades (Mossu, 1990). Cette méthode est seulement basée sur le nombre de fèves moisies qui doit être inférieur à 3 % dans le cas de cacao de grade I. Pourtant le nombre de fèves brunes caractéristiques d'une bonne fermentation est variable d'une fermentation à une autre. Dans les fermentations en caisse et

en feuilles de bananiers, le nombre de fèves brunes est d'environ 80 %, tandis qu'en bâche, ce nombre est à 74 %. Ainsi, bien que toutes les fermentations donnent un cacao de grade I selon le Cut Test, les fermentations en caisse et en feuilles de bananier donnent un pourcentage de fèves bien fermentées plus important que la fermentation en bâche plastique. Ceci pourrait suggérer que les fermenteurs caisse et feuilles de bananiers sont susceptibles d'offrir les conditions d'une meilleure fermentation que le fermentateur bâche plastique.

Au total, les différentes fermentations n'ont pas eu d'influence sur l'ordre de succession microbienne ni même sur la qualité marchande telle que définie par le Cut Test. Cependant, le type de fermentation impacte fortement le développement et la croissance des microorganismes. Ainsi, les conseils donnés aux paysans visant à recommander telle ou telle type de fermentation ou de fermenteur, pourraient ne pas être de grands effets. Par contre, le type de fermentation de cacao pourrait tenir un rôle prépondérant dans la mise en œuvre des voies d'amélioration de la qualité du cacao par starters microbiens, quand il s'agira de jouer sur le développement des souches fermentaires sélectionnées.

## REMERCIEMENTS

Remerciements à toute l'équipe technique du laboratoire de Microbiologie et d'Analyse Chimique de la Station de Recherche Technologique du CNRA, notamment à Monsieur Ouattara pour l'assistance technique.

## REFERENCES

- Ardhana M. and Fleet G. H. 2003. The microbial ecology of cocoa fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol* 86 : 87 - 99.
- Baker D. M., Tomlins K. I. and C. Gay. 1994. Survey of Ghanaian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour. *Food Chem* 51 : 425 - 431.
- Camu N., De Winter T., Verbrugge K., Cleenwerck I., Vandamme P., Takrama J. S., Vancanneyt M. and L. De Vuyst. 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1809 - 1824.
- Del Boca C. 1962. Cocoa beans quality requirement and methods of assessment *rev. int. chocolaterie* 17 : 218 - 221
- Guehi T. S., Y. M. Konan, R. Koffi-Nevry, D. Y. N'dri and N. P. Manizan. 2007. Enumeration and identification of main fungal isolates and evaluation of fermentation's degree of Ivorian raw cocoa beans. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 1 (4) : 479 - 486.
- Irie Bi z., Yate B. K., et L. Ban-Koffi. 2002. Programmes de conservation et de transformation des produits agricoles. Rapport d'activité annuel 2001 CNRA SRT
- Kreger-van Rij N. J. W. 1984. *The yeasts : a taxonomic study*, 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Mossu G. 1990. *Le cacaoyer*, Editions Maisonneuve et Larose 159 p
- Nielsen D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi L., Owusu, M., Anderson, T. S. and W. H. Holzapfel. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 114 : 168 - 186.
- Ostovar k. and Keeney P. G. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cocoa beans. *J. food sci.* 38 : 611 - 617
- Ouattara H. G., Ban-Koffi L., Karou G. T., Sangare A., Niamke S. L. and Diopoh J. K. 2008. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 : 1753 - 1760.
- Ouattara H. G., Reverchon S., Niamke S. L. and W. Nasser. 2011. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiol.* (DOI: 10.1016/j.fm.2010.07.020) 28 : 1 - 8.
- Passos F. M. L. and F. J. V. Passos. 1985. Descriçaoe classificacao de bacterias isoladas da fermentacao do cacau, com base em um analise numerica. *Rev. Microbiol.* 16 : 290 - 298.
- Passos F. M. L., D. O. Silva, A. Lopez, C. L. L. F. Ferreira and W. V. Guimaraes. 1984. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. *J. Food Sci.* 49 : 205 - 208.

- Ribeiro N. C., Bezerra J. L. and A. Lopez. 1986. Micobiota na fermentacao do cacau no estado da Bahia, Brazil. *Rev. theobroma* 16 : 47 - 55
- Roelofsen P. A. 1958. Fermentation, drying and storage of cocoa beans. *Adv. Food res.* 8 : 225 - 296
- Schwan R. F. 1996. Microbiology of cocoa fermentation: a study to improve quality, in proceeding of the 12<sup>th</sup> international cococa research conference, Salvador, Bahia, November 1996. cocoa producers' alliance, Lagos, Nigeria.
- Schwan R. F. 1998. Cocoa fermentation conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 1477 - 1483
- Schwan R. F., Rose A. H. and R. G. Board. 1995. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp: *J. appl. Bacteriol. Symp. Supp.* 79 : 96S - 107S
- Schwan R. F. and A. E. Wheals. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutrit* 44 : 205 - 222.
- Shamsuddin S. B. and P. S. Dimick. 1986. Qualitative and quantitative measurements of cocoa bean fermentation pp 55 - 78 in P. S. Dimick ed, *Proceedings of cocoa biotechnology*. Department of food science, Penn state university, university park, PA.
- Thompson S.S., Miller K.B. and A. S. Lopez. 2001. Cocoa and coffee. *In* : Doyle M. J., Beuchat, L.R., Montville T.J. (Eds.). *Food Microbiology-Fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 721 -733.
- Timbie D. J., Sechrist L. and P. G. Keeney. 1978. Application of high pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *J Food Sci* 43 : 560 - 565