

## Influence de souches sélectionnées de *Saccharomyces cerevisiae* inoculées et des conditions de fermentation sur la qualité aromatique du cacao marchand

Brice. J. Assi-Clair<sup>1\*</sup>, Mathurin .K. Yao<sup>2</sup>, Kra Brou. D. Kédjébo<sup>1</sup>, Tagro S. Guéhi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologies des Aliments, Université Nangui ABROGUA, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup>Département de Biochimie-Génétique, Université Peleforo Gon Coulibaly, B.P. 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire

\*Correspondance to Brice J. Assi-Clair, E-mail : [clairassi@gmail.com](mailto:clairassi@gmail.com) , Phone : +2250708353244

Submission 18th July 2024. Published online at <https://www.m.elewa.org/Journals/> on 30<sup>th</sup> September 2024. <https://doi.org/10.35759/JABs.200.7>

### RESUME

**Objectif :** Le cacao produit en Côte d'Ivoire est sujet à une absence de qualité aromatique fine et des saveurs désirables depuis plusieurs années. L'objectif de la présente étude est de contribuer à l'amélioration de la qualité aromatique du cacao ivoirien.

**Méthodologie et Résultats :** Pour cela, deux souches sélectionnées A et B de la levure *Saccharomyces cerevisiae* isolées lors de la fermentation du raisin en vin et réputées aromatiques ont été utilisées comme cultures *starter* à la concentration 0,5 g.kg<sup>-1</sup> de fèves en vue de la fermentation du cacao dans divers milieux (enceinte close et milieu ambiant). L'évaluation de la qualité aromatique des cacaos inoculés a été réalisée. Les analyses aromatiques des différents cacaos marchands ont mis en évidence 36 composés d'arômes repartis en 6 familles chimiques dont les principales sont les alcools, les aldéhydes, les cétones et les esters à des teneurs comprises entre 1,48 et 315,75 µg.g<sup>-1</sup>. La souche A de *S. cerevisiae* impacte favorablement la formation des composés esters, aldéhydes et cétones, tandis que les cacaos inoculés avec la souche B ont été caractérisés par teneurs élevées en alcools par rapport aux cacaos non inoculés quelle que soit la condition de fermentation.

**Conclusions et application des résultats :** Ainsi, l'utilisation de ces souches sélectionnées de *S. cerevisiae* présente de réels potentiels pour l'amélioration de la qualité aromatique du cacao et par conséquent les produits dérivés du cacao. Elles peuvent donc être utilisées comme culture *starter* pour réaliser la fermentation du cacao.

**Mots clés.** Cacao, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, composés d'arômes

## Effect of selected inoculated *Saccharomyces cerevisiae* strains and fermentation conditions on the aromatic quality of raw cocoa beans.

### ABSTRACT

**Objective :** Raw cocoa beans produced in Côte d'Ivoire has been subject to a lack of fine aromatic quality and desirable flavors for several years. The aim of the present study is to contribute to the improvement of the aromatic quality of this cocoa.

**Methodology and results:** two selected strains of high aroma-producing *Saccharomyces cerevisiae* A and B isolated from wine fermentation were used as starter culture at 0.5 g kg<sup>-1</sup> for cocoa beans fermentation in various environment (closed room and ambient environment). Aromatic analyses of the various raw cocoa beans revealed 36 aroma compounds divided into 6 chemical families, the main ones being alcohols, aldehydes, ketones and esters at levels ranging from 1.48 to 315.75 µg.g<sup>-1</sup>. *S. cerevisiae* strain A has a favorable impact on the formation of ester, aldehyde and ketone compounds, while cocoa beans inoculated with strain B was characterized by high alcohol content compared with non-inoculated cocoa beans, regardless of fermentation conditions.

**Conclusions and application of results:** use of these *Saccharomyces cerevisiae* strains offers real potential for improving the aromatic quality of cocoa beans and, consequently, cocoa-derived products. They can therefore be used as a starter culture for cocoa beans fermentation.

**Keywords :** Cocoa beans, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, aroma compounds.

### INTRODUCTION

Le cacao (*Theobroma cacao* L.) est une plante de la famille *Malvaceae* et constitue une ressource agricole d'une importance économique vitale mondiale (Moreira *et al.*, 2013) et plus particulièrement dans plusieurs pays en développement (Beg *et al.*, 2017). En effet, il constitue la principale matière première du chocolat (Hot *et al.*, 2014). Selon l'Organisation internationale du cacao (ICCO), la production mondiale de fèves de cacao est de 4 799 000 tonnes en 2018/2019 (ICCO, 2019). Depuis plusieurs années la Côte d'Ivoire est le leader dans la production de fèves de cacao avec plus de 40 % de l'offre internationale. Malgré ce leadership, le cacao ivoirien est sujet à une absence de qualité aromatique fine et des saveurs désirables (Koné *et al.*, 2016) qui se répercute négativement sur les qualités organoleptiques du chocolat (Hayley *et al.*, 2018). Cette déféctuosité pourrait être liée au génotype/varété du cacao cultivé en Côte d'Ivoire, aux mauvaises pratiques des techniques post-récolte notamment la fermentation ou les faibles performances de

production des métabolites aromatiques des souches de levures associées à la fermentation des fèves de cacao (Assi-Clair *et al.*, 2019). Avant fermentation, la fève de cacao est astringente, amère et contient généralement une faible concentration en composés d'arômes (De Vuyst *et al.*, 2010). Ces composés d'arômes sont exhaussés en quantité et en qualité lors la torrification des fèves en vue de la fabrication du chocolat (Hayley *et al.*, 2018). La fermentation du cacao est caractérisée par trois types de fermentation. D'abord la fermentation alcoolique se déroule en premier sous la prolifération des levures qui transforment les sucres réducteurs en éthanol et dioxyde de carbone. Ensuite, les réactions et modifications biochimiques qui ont lieu entraînent la croissance des bactéries lactiques (LAB) et celle des bactéries acétiques (AAB) (Schwann & Fleet, 2014). Les bactéries lactiques transforment principalement les sucres et les acides organiques en acide lactique et d'autres composés organiques. A leur tour, les

bactéries acétiques dans des conditions aérobies convertissent l'éthanol en acide acétique (Hamdouche *et al.* 2019). Malgré cette intense activité microbienne, le rôle important joué par les levures dans la formation des composés précurseurs d'arômes lors de la fermentation du cacao est indéniable (Lima *et al.*, 2011 ; Koffi *et al.* 2017). Voilà pourquoi, depuis quelques années, la tendance de la recherche s'est focalisée sur les voies et moyens d'utilisation des levures dans la modulation de la qualité aromatique des fèves de cacao et des qualités organoleptiques des produits dérivés (Ramos *et al.*, 2014, Batista *et al.*, 2015). En effet, la dynamique, l'identification et la compréhension des mécanismes d'action des levures fermentaires du cacao ont été l'objet de plusieurs recherches ces dernières années (Batista *et al.*, 2015 ; Visintin *et al.*, 2017). Ainsi, diverses espèces de levures sont spécifiquement associées à la fermentation du cacao selon les pays de production (Romero-Cortes *et al.*, 2012). Diverses méthodes de

fermentation du cacao existent. Quelle que soit la méthode adoptée ; la fermentation du cacao qui se déroule au champ est spontanée donc incontrôlée (Kouassi *et al.*, 2022). Cette situation est à l'origine de la fluctuation de la qualité aromatique. Afin de pallier cette variation, la tendance est de plus en plus à l'utilisation des cultures *starter* à base d'un ou de plusieurs microorganismes dont des levures et des bactéries. Toutes les études portant sur l'utilisation des starters ont permis de maîtriser la technologie de fermentation et d'améliorer de façon mitigée la qualité aromatique du produit fini (Crafack *et al.*, 2014 ; Assi-Clair *et al.*, 2019). L'originalité de la présente étude est que c'est la première fois que des souches de levures réputées aromatiques isolées à partir de la fermentation du vin sont utilisées lors de la fermentation du cacao. L'objectif de la présente étude est donc de contribuer à l'amélioration de la qualité aromatique du cacao produit en Côte d'Ivoire.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel biologique

**Matériel végétal :** Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude a été constitué de fèves fraîches de cacao issues de cabosses de cacaoyers Forastero. Ces cabosses ont été récoltées pendant la grande campagne de récolte du cacao dans des plantations villageoises de N'douci. Située à 113 km d'Abidjan à 5,51 latitude Nord, à la longitude 4,45 ° Ouest et à 63 m d'altitude dans le Sud de la Côte d'Ivoire.

**Souches de levures inoculées comme cultures *starter*:** Deux souches commerciales de *Saccharomyces cerevisiae* A et B réputées aromatiques et isolées à partir de la fermentation du vin ont été utilisées lors de cette étude pour la fermentation du cacao. Ces souches de levures ont été fournies par la société Lallemand (Blagnac, France).

**Matériel agricole :** Les cabosses de cacao accessibles à la main ont été cueillies à l'aide de machette et celles qui sont inaccessibles ont été récoltées à l'aide d'une lame en forme de faucille appelée "sécateur" attachée à une perche. L'écabossage du cacao a été réalisé à l'aide de gourdins en bois. La fermentation des fèves de cacao a été conduite dans des bacs en polyester de dimensions 50 x 30 x 30 cm<sup>3</sup> (L x l x h). À la fin de la fermentation, les fèves de cacao ont été séchées sur des bâches plastiques noires.

### Méthodes

**Récolte :** La récolte a été effectuée pendant les grandes campagnes de cacao c'est-à-dire d'octobre à janvier 2017 et 2018. Les cabosses de cacao ont été récoltées dans des plantations villageoises de Bodo, dans le département de N'Douci. La récolte, dans ces plantations, s'est faite sur deux jours à l'aide

de machette et de sécateur. Deux mille (2000) cabosses de cacao ont été ainsi récoltées chaque année pour les manipulations. 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.

**Écabossage :** L'écabossage du cacao a été réalisé avec un délai de deux jours post-récolte. Pour ce faire, les cabosses récoltées ont été réparties en six (06) lots de 250 cabosses chacun puis écabossées soit à l'air ambiant soit dans une enceinte close préalablement désinfectée par lavage des murs et des surfaces avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,4 % préparée pour la circonstance. Un lot a été écabossé à l'air libre puis les fèves de cacao fraîches ont été conditionnées dans un sachet en polyéthylène. Les cabosses des neuf autres lots ont été préalablement désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium puis rincées à l'eau de robinet avant d'être admises dans l'enceinte close pour l'écabossage. L'ouverture des cabosses a été faite à l'aide de gourdins en bois. Les fèves de cacao ont ensuite été séparées du placenta (rachis) à la main avec des gants et mises dans des sachets en polyéthylène distincts selon les lots. Au total, six (06) tas de fèves fraîches ont été obtenus après écabossage du cacao.

**Inoculation et mise en fermentation des fèves de cacao :** L'inoculation de quatre (04) lots de fèves de cacao avec les souches sélectionnées de *S. cerevisiae* s'est faite dans l'enceinte close. Quatre (04) inocula (à la concentration 0,5 g de poudre de levures par kg (0,5 g.kg<sup>-1</sup>) de fèves fraîches) des souches A et B de *S. cerevisiae* ont été préparés dans des conditions stériles. Ainsi, 12,5 g de chaque souche de levure déshydratée ont été réhydratés avec 75 mL d'eau distillée stérile. L'ensemencement des fèves de cacao par chaque souche de levure sélectionnée a été

réalisé par ajout de la préparation et une homogénéisation manuelle après port de gants stériles de façon aseptique. Les fèves de cacao ainsi inoculées ont été placées dans des caisses en plastique (polyester) en vue de la fermentation. Au total, quatre (04) lots de fèves de cacao ont été inoculés avec les souches sélectionnées de *S. cerevisiae*, dont deux (02) avec la souche A et deux (02) autres avec la souche B. En outre, deux lots (le premier lot écabossé à l'air libre et le cinquième lot désinfecté et écabossé dans l'enceinte close) constitués de fèves de cacao non inoculées par les souches de *S. cerevisiae* ont servi de témoins. La fermentation a été conduite dans des caisses en plastique. Pour cela, des caisses de dimensions 50 x 30 x 30 cm<sup>3</sup> ont été utilisées (Guéhi *et al.*, 2010a; 2010b). Ces caisses ont été perforées sur chaque face afin de faciliter l'écoulement du jus mucilagineux issu de la dégradation de la pulpe et d'aérer la masse de fèves en fermentation. Sur les quatre lots de fèves inoculées, deux (02) ont été fermentés à l'air libre et (02) autres lots de fèves ont été fermentés dans l'enceinte close. Dans les deux cas, un lot témoin de fèves non inoculées par les levures sélectionnées a été associé aux autres lots. Des brassages manuels (après ports de gants à usage unique) des fèves de cacao en fermentation ont été effectués à 48 h et 96 h pour chaque lot (Guéhi *et al.*, 2010a).

**Séchage des fèves de cacao :** Le séchage a été réalisé sur des bâches en plastique pendant 6 jours. La durée journalière de séchage était de 09 h et s'étendait de 8 h à 17 h. Au cours du séchage, les fèves ont été brassées trois (03) fois par jour, respectivement à 8 h, 12 h et 16 h à la main après port de gants. En dehors de la période de séchage. A la fin du séchage, 500 g de fèves fermentées et séchées ont été prélevés de chaque tas. Au total, 06 échantillons de fèves séchées ont été obtenus, puis mis dans des sachets d'emballage en polyéthylène et

stockés à température ambiante en vue des analyses aromatiques.

### Identification et quantification des composés d'arômes

**Extraction et identification des composés volatils :** Les composés volatils présents dans les différentes poudres de cacao préalablement préparées ont été extraits selon la technique de micro-extraction en phase solide en espace de tête (SPME-HS) décrite par Rodriguez-Campos *et al.* (2012). Le type de fibre utilisé a été le DVB/Car/PDMS (DiVinylBenzène / carboxen / PolyDiMéthylSiloxane), de marque Supelco Garniture. Les fibres ont été conditionnées comme le préconise le fournisseur (270 °C pendant 1h). La séparation des composés d'arômes contenus dans tous les échantillons a été réalisée dans le chromatographe en phase gazeuse en mode injection automatique (splitless) sur une colonne polaire capillaire DBWAX J&W 122-7032 de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne et de 0,25 µm d'épaisseur de film (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La température de l'injecteur en mode splitless était de 250°C et l'injection d'échantillon a été faite avec la programmation suivante : une augmentation de la température de 3°C min<sup>-1</sup> de 40 à 170 °C suivi d'une autre de 10°C min<sup>-1</sup> de 170 à 250°C. Le spectromètre de masse (MS) a fonctionné en mode impact électronique (IE) avec source d'ionisation interne de 70 eV. L'analyseur était de type quadripôle (T = 150°C) et la température de la source était de 230 °C. L'analyse des fragments a été réalisée en mode scan de 40 à 400 daltons uma à raison de 4,58 daltons umas<sup>-1</sup>. Les composés d'arômes ont été identifiés par comparaison avec les bases de données des spectres de composés connus Wiley 275 ou NIST (version 2002). L'identification des pics correspondants à chaque composé volatil a été faite à l'aide du

logiciel Agilent Masshunter Workstation Software (AMWS, version B.06.00).

**Quantification des composés d'arômes :** La quantification des composés volatils a été réalisée en tenant compte de la teneur en eau de l'échantillon de cacao, de la masse de l'échantillon introduite dans le vial, de l'aire du composé identifié et de l'aire de l'étalon interne utilisé (butan-1-ol). Pour chaque échantillon de cacao analysé en GC-MS, trois répétitions avaient été réalisées en considérant que d'un échantillon à l'autre, un même composé se comporte de façon similaire (en raison de la granulométrie des poudres identiques et des conditions d'extraction SPME similaires). Les coefficients de dispersion dans l'espace de tête et d'absorption sur la fibre ont été négligés. Du fait de ces approximations, il s'agit d'une semi quantification permettant de comparer d'un échantillon à l'autre, la quantité de composés volatils passant dans l'espace de tête. Ainsi, la quantité de composés volatils du composé *i* passant dans l'espace de tête est obtenue selon l'équation suivante :

$$qi(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{25 \times A_i}{A_{but} \times m_e \times W}$$

Avec :

**qi :** quantité de composé *i* en µg.g<sup>-1</sup>MS passant dans l'espace de tête

**A<sub>i</sub> :** Aire du composé *i*

**A<sub>but</sub> :** Aire du Butanol (étalon interne)

**m<sub>e</sub> :** masse d'échantillon introduite dans le vial en g

**W :** Teneur en Eau de l'échantillon

**25 :** Constante, concentration de l'étalon interne en g. L<sup>-1</sup>

**Analyses statistiques :** Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées avec les logiciels XLSTAT version 19.02. 2017. Pour l'analyse comparative des teneurs en composés d'arômes produits, le test de Krakal wallis au seuil de α = 0,05 a été utilisé afin de mettre en évidence les différences significatives entre les cacaos inoculés et les cacaos non inoculés.

## RESULTATS

### Composés d'arôme des cacaos analysés :

Au total, 36 composés repartis en six familles dont 06 alcools, 05 aldéhydes, 05 cétones, 07 esters, 04 acides, 02 pyrazines et 07 autres composés d'arômes ont été identifiés dans

l'ensemble des échantillons de cacao analysés. Certains de ces composés sont responsables de divers arômes spécifiques désirables et d'autres confèrent des attributs sensoriels indésirables (**Tableau 1**).

**Tableau 1.** Composés d'arômes des cacaos inoculés et non inoculés avec les souches A ou B de *S. cerevisiae*

Familles chimiques	Composés d'arômes	Indice de Kovats théorique	Indice de Kovats calculé	Perception d'odeur
Alcools	Ethanol	929	925	Vin <sup>(1)</sup>
	2-Méthyl-1-propanol	1101	1118	
	2-Pentanol	1122	1139	Vert, vert doux <sup>(2)</sup>
	3-Méthyl-1-butanol	1214	1203	Malté, chocolat <sup>(3)</sup>
	2-Heptanol	1326	1315	Doux, agrumes <sup>(1)</sup>
	2-Phénylethanol	1891	1865	Miel, fleur, épice, rosé <sup>(4)</sup>
Aldéhydes	2-Méthylpropanal	817	804	Malté, chocolat <sup>(2)</sup>
	2-Méthylbutanal	910	906	Malté, chocolat, cacao <sup>(3)(5)</sup>
	3-Méthylbutanal	912	912	Malté, chocolat, cacao <sup>(5)(6)</sup>
	Benzaldehyde	1516	1508	Amande, herbe <sup>(7)</sup>
	Phénylethanal	1634	1604	Miel, florale, doux <sup>(8)</sup>
Cétones	2-Pentanone	983	964	Fruité <sup>(1)(9)</sup>
	2-Heptanone	1181	1172	Fruité, vert <sup>(9)</sup>
	Acétoïne	1250	1255	Beurre, crème <sup>(8)</sup>
	2-Nonanone	1389	1369	Florale, gras <sup>(10)</sup>
	Acétophenone	1642	1612	Florale, sucre <sup>(11)</sup>
Acides	Acide acétique	1452	1430	Aigre, vinaigre <sup>(3)(5)</sup>
	Acide Propanoïque	1523	1514	Piquant, rance <sup>(5)</sup>
	Acide 2-Méthyl propanoïque	1568	1544	Rance <sup>(3)(5)</sup>
	Acide 3-Méthylbutanoïque	1676	1643	Rance <sup>(3)</sup>
Esters	Acétate de Méthyle	813	822	Fruité <sup>(3)(5)(6)</sup>
	Acétate d'éthyle	872	875	Fruité <sup>(6)</sup>
	Acétate d'isobutyle	1008	1008	Fruité, banane <sup>(6)</sup>
	Acétate de 2-Pentyle	1080	1073	Fruité <sup>(6)</sup>
	Acétate d'isoamyle	1118	1137	Banane <sup>(6)</sup>
	Amylacetate	ND		Banane <sup>(3)(5)(6)</sup>
	Acétate de 2-phenylethyle	1810	1793	Meil, fleur <sup>(6)</sup>
Pyrazines	2,3,5-TriméthylePyrazine	1408	1383	Cacao, caramel <sup>(1)</sup>
	2,3, 5,6-Tétramethylpyrazine	1489	1452	Caramel, chocolat <sup>(1)</sup>
		<b>Autres composés</b>		

		volatiles		
<b>Lactones</b>	Butyrolactone	1618	1583	ND
<b>Composés soufrés</b>	Diméthylsulfure	716	726	ND
<b>Hydrocarbures</b>	Toluène	1042	1028	ND
	Ethylbenzene	1125	1125	ND
	Styrène	1250	1227	ND
<b>Alcools terpéniques</b>	Linalool oxide	1423	1451	Doux, florale <sup>(5)</sup>
	Linalool	1537	1540	Rose, florale <sup>(5)</sup>

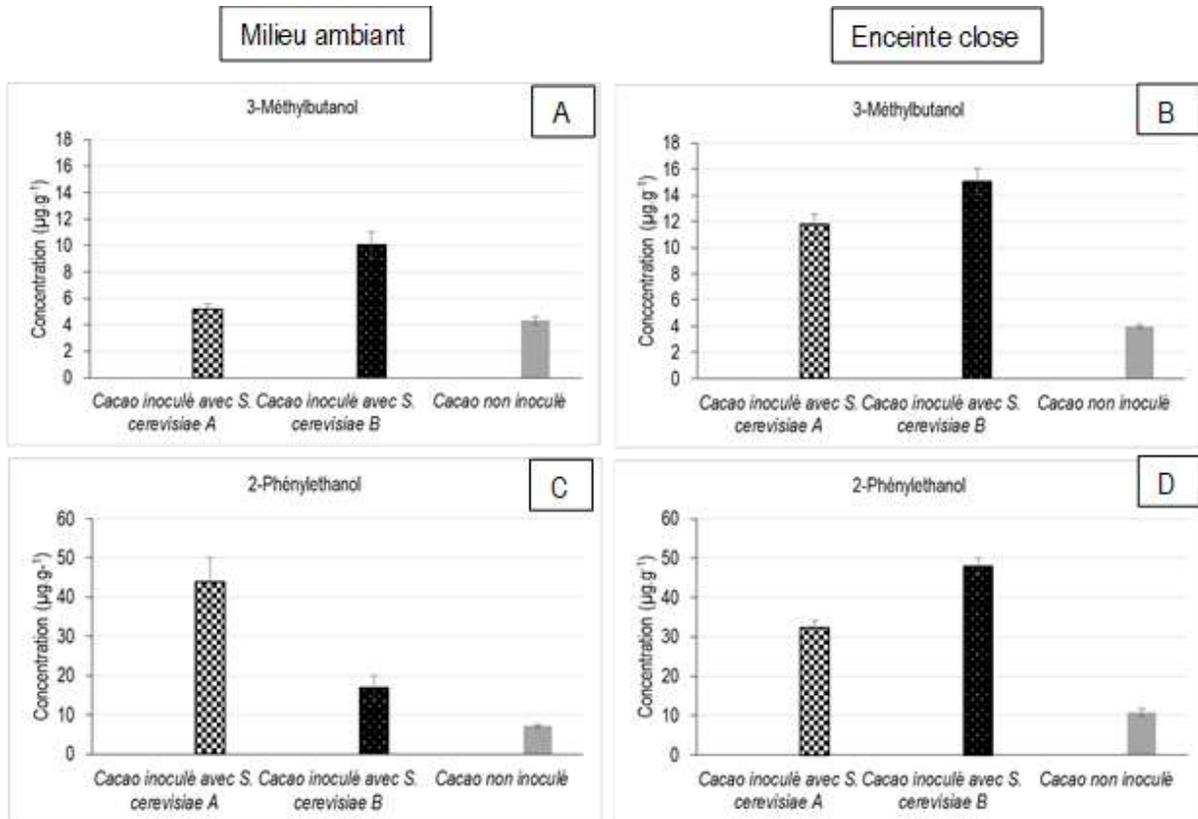
**ND : Non Déterminé**

<sup>(1)</sup>Rodriguez- Campos *et al.* (2012), <sup>(2)</sup> Rottiers *et al.*, (2020), <sup>(3)</sup>Kone *et al.* (2020), <sup>(4)</sup> Ducki *et al.*(2008), <sup>(5)</sup>Assi-Clair *et al.* (2019), <sup>(6)</sup>Batista *et al.* (2016), <sup>(7)</sup>Owusu *et al.*(2011), <sup>(8)</sup>Afoawkwa *et al.*(2009), <sup>(9)</sup>Rodriguez- Campos *et al.*(2011), <sup>(10)</sup> Ho *et al.*(2014), <sup>(11)</sup>Serra-Bonvehi. (2005).

### Concentrations en principaux composés d'arômes d'intérêts dans les cacaos analysés

**Alcools :** La **Figure 1** présente les teneurs en 3-méthylbutanol et en 2-phényléthanol des cacaos inoculés et non inoculés. Les teneurs en 3-méthylbutanol mesurées dans les cacaos inoculés avec la souche B de *S. cerevisiae*, fermentés en milieu ambiant ou en enceinte close ont été très significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevées par rapport aux autres cacaos analysés (**Figures 1A et 1B**). Ces teneurs ont été respectivement de 10,05 et 15,05  $\mu\text{g.g}^{-1}$  contre des teneurs allant de 5 à 12  $\mu\text{g.g}^{-1}$  et 3 à 5  $\mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement dans les cacaos inoculés avec la souche A et les cacaos non inoculés. Concernant le 2-phényléthanol, au

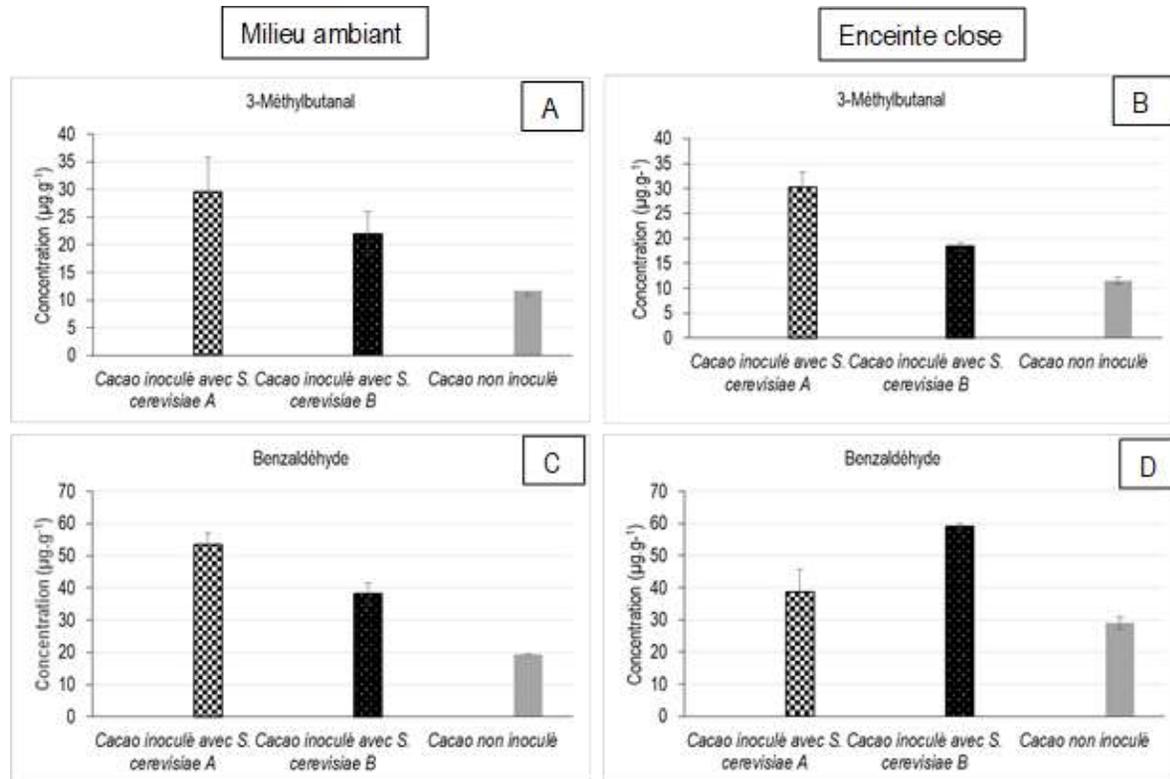
cours de la fermentation réalisée en milieu ambiant, la teneur dans le cacao inoculé avec la souche A a été significativement plus élevée avec une valeur de 43,8  $\mu\text{g.g}^{-1}$  contre des teneurs de 16,9 et 7,23  $\mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement dans le cacao inoculé avec souche B et le cacao non inoculé (**Figure 1C**). Lorsque la fermentation a été réalisée en enceinte close, le cacao inoculé avec la souche B de *S. cerevisiae* a présenté la concentration en 2-phényléthanol la plus élevée (47,8  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), suivi du cacao inoculé avec la souche A (32,31  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). La teneur en 2-phényléthanol a été plus faible dans le cacao non inoculé avec une valeur de 10,8  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (**Figure 1D**).



**Figure 1.** Teneurs en principaux alcools dans les cacaos analysés

**Aldéhydes :** Les concentrations en principaux aldéhydes détectés dans les fèves de cacao analysés sont illustrées par la **figure 2**. Les concentrations en 3-méthylbutanal et en benzaldéhyde ont été très significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevées dans les fèves de cacaos inoculés avec la souche A quel que soit le lieu de fermentation. Pour les cacaos fermentés en milieu ambiant, les teneurs en 3-méthylbutanal ont été de  $29,53 \mu\text{g.g}^{-1}$  pour les fèves inoculées avec *S. cerevisiae* A,  $22,01 \mu\text{g.g}^{-1}$  pour celles inoculées avec *S. cerevisiae* B et  $11,69 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans les fèves non inoculées (**Figure 2A**). Concernant les fèves fermentées en enceinte close les teneurs ont été

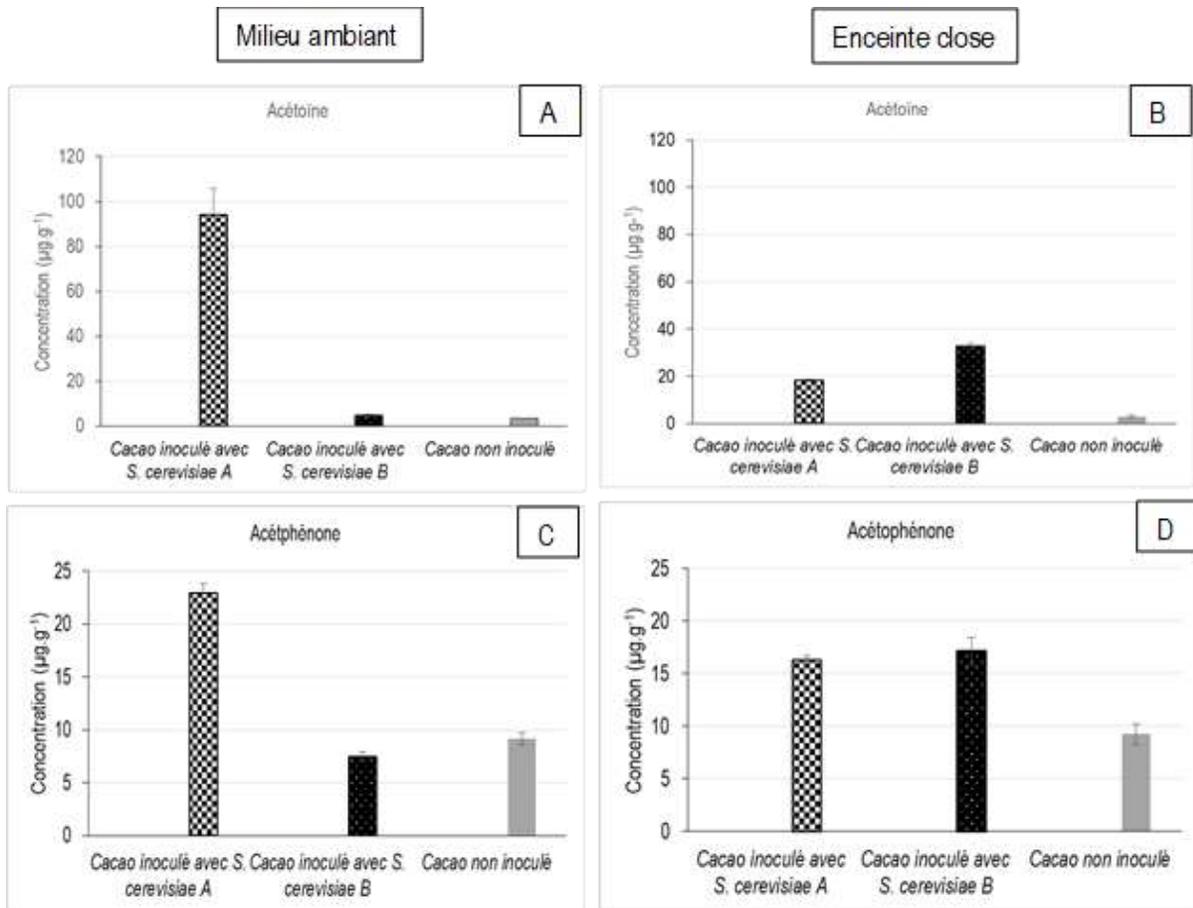
de  $30,34$  ;  $18,38$  et  $11,52 \mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement dans les cacaos inoculés avec les souches A et B et le cacao non inoculé (**Figure 2B**). Les concentrations en benzaldéhyde du cacao inoculé avec *S. cerevisiae* A et fermenté en milieu ambiant a été de  $53,51 \mu\text{g.g}^{-1}$  contre  $38,15$  et  $19,42 \mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement pour le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* B et le cacao non inoculé (**Figure 2C**). En enceinte close, la concentration en benzaldéhyde a été de  $59,03 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* B et  $38,72 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans celui inoculé avec la souche A, tandis que dans le cacao non inoculé a enregistré la plus faible teneur qui est  $29,11 \mu\text{g.g}^{-1}$  (**Figure 2D**).



**Figure 2.** Teneurs en principaux aldéhydes dans les cacaos analysés.

**Cétones :** Les concentrations en Acétoïne et en acétophénone sont présentées à la **Figure 3**. En milieu ambiant, la concentration en acétoïne du cacao inoculé avec la souche A a été très significativement élevée ( $p < 0,05$ ) par rapport aux autres cacaos analysés. Cette concentration a été de  $93,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Alors que pour le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* B et le cacao non inoculé, les concentrations ont été respectivement de  $4,38$  et  $3,31 \mu\text{g.g}^{-1}$  (**Figure 3A**). En enceinte close, le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* B a présenté la concentration la plus élevée avec une valeur de  $38,84 \mu\text{g.g}^{-1}$  contre  $18,29$  et  $2,91 \mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement pour le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* A et

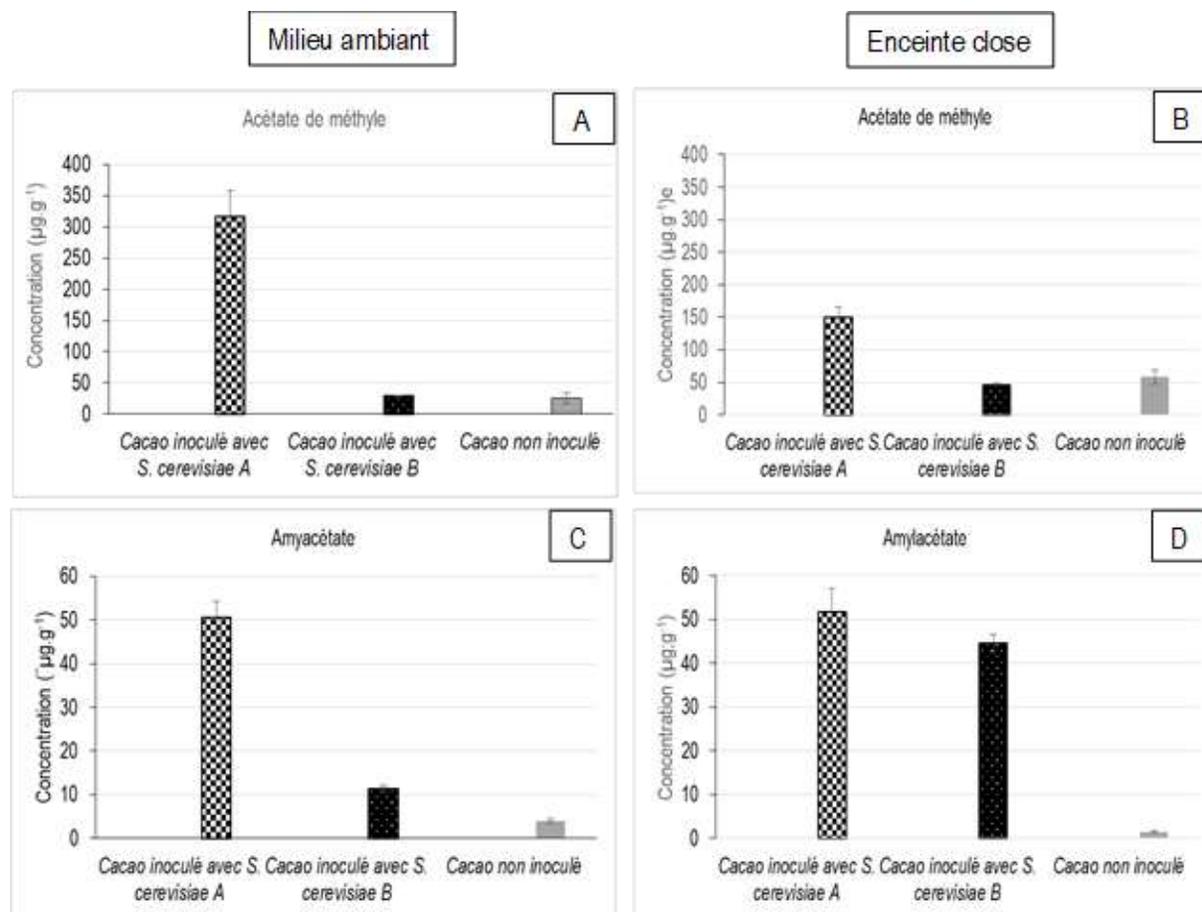
le cacao non inoculé (**Figure 3B**). Concernant l'acétophénone, les concentrations ont été quasiment plus élevées ( $p < 0,05$ ) dans les cacaos inoculés avec la souche A de *S. cerevisiae*. En enceinte close, la concentration a été de  $16,26 \mu\text{g.g}^{-1}$  contre  $17,14$  et  $9,26 \mu\text{g.g}^{-1}$  respectivement dans le cacao inoculé avec la souche B et le cacao non inoculé (**Figure 3D**). Alors que pour la fermentation conduite en milieu ambiant la teneur en acétophénone dans le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* A a été de  $22,9 \mu\text{g.g}^{-1}$  contre  $7,14 \mu\text{g.g}^{-1}$  pour le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* B et  $9,41 \mu\text{g.g}^{-1}$  dans le cacao non inoculé (**Figure 3C**).



**Figure 3.** Concentrations en principaux cétones dans les cacaos analysés

**Esters :** Les teneurs en principaux esters des cacaos inoculés et non inoculés sont illustrées par la Figure 4. Les résultats obtenus montrent que les teneurs acétate de méthyle et en amylocétate des cacaos inoculés avec *S.cerevisiae* A ont été très significativement plus élevées ( $p < 0,05$ ) que celles des cacaos inoculés avec *S. cerevisiae* B et les cacaos non inoculés quel que soit le milieu de fermentation. En milieu ambiant, la teneur en acétate de méthyle a été de 315,75 µg.g-1 dans le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* A, 29 µg.g-1 dans celui inoculé avec *S. cerevisiae* B et 25,5 µg.g-1 pour le cacao non inoculé (Figure 4A), tandis qu'en enceinte close, les

teneurs en acétate de méthyle ont été respectivement de 149,96 ; 46,25 et 58,45 µg.g-1 dans le cacao inoculé avec *S. cerevisiae* A, le cacao inoculé avec la souche B et le cacao non inoculé (Figure 4B). La teneur en amylocétate en milieu ambiant a été de 50,59 µg.g-1 dans le cacao inoculé avec la souche A, 11,38 µg.g-1 dans le cacao inoculé avec la souche B et 4.05 µg.g-1 dans le cacao non inoculé (Figure 4C). En enceinte close les teneurs ont été de 51,73 ; 44,64 et 1,48 µg.g-1 respectivement dans les cacaos inoculés avec les souches A et B de *S. cerevisiae* et le cacao non inoculé (Figure 4D).



**Figure 4.** Concentrations en principaux esters dans les cacaos analysés

## DISCUSSION

L'utilisation des données de spectrométrie de masse et la comparaison des indices de Kovats ont permis d'identifier dans les cacaos analysés 39 composés volatils répartis dans plusieurs familles chimiques dont majoritairement les alcools, les aldéhydes, les cétones et les esters, (Saltini *et al.*, 2013, Koné *et al.*, 2016). Cependant, des études en lien avec l'utilisation d'autres souches de *S. cerevisiae* comme starter ont identifié plus de composés d'arômes dans les cacaos analysés que la présente étude (Batista *et al.*, 2016). Ces composés dérivent de diverses réactions biochimiques complexes impliquant des acides aminés, des sucres et des acides gras (Kadow *et al.*, 2013). Certains composés ont été décrits dans la littérature comme étant responsables de la production de diverses notes d'arômes recherchés dans le chocolat

(Rodriguez-Campos *et al.*, 2011 ; Saltini *et al.*, 2013). En effet, ils sont classés en divers groupes de saveurs dont des arômes fruités (14), notes florales (2), notes chocolat/caramel (8), arômes gras (2), arômes indésirables (7) et d'autres arômes non caractérisables (6) (De Vuyst et Weckx, 2016 ; Ferreira et Guido, 2018). L'analyse des données de GC-MS a permis d'identifier deux alcools majeurs que sont, le 3-méthylbutanol et le 2-phényléthanol dans la famille. Les concentrations en 2-phényléthanol et 3-méthylbutanol du cacao inoculé avec *S. cerevisiae* B ont été quasiment plus élevées que celles de tous les autres cacaos quel que soit le milieu de fermentation. Ce qui suggère que l'inoculation du cacao avec la souche B induit plus la formation des composés d'arômes

alcools majeurs que celle de la souche A. Ho *et al.* (2014) ont conclu que l'activité métabolique des levures joue un rôle central dans la production du phényléthanol. Ferreira & Guido, (2018) confirment cela en expliquant que c'est à partir du 2-phénylacétaldéhyde lui-même issu de la transformation de la phénylalanine que se forme le 2-phényléthanol. En effet, la plupart des alcools proviennent de la transformation des sucres fermentescibles lors de la fermentation du cacao (Schwann & Wheals, 2004), des acides aminés et de la réduction des cétones endogènes de la fève (Aculey *et al.*, 2014) ainsi que des aldéhydes. Pour ce qui concerne le 3-méthylbutanol, très peu d'études l'ont trouvé dans le cacao fermenté (Rodriguez *et al.* (2011 ; 2012). Ducki *et al.* (2008) ont rapporté que le 3-Méthylbutanol et le 2-Phényléthanol sont à l'origine des saveurs désirées dans le cacao. Le 3-Méthylbutanol apporterait des arômes de chocolat et de malte, tandis que le 2-Phényléthanol, serait associé aux arômes floraux, de miel et d'épice dans les produits dérivés du cacao (Ducki *et al.*, 2008). Ainsi, de fortes teneurs en ces deux alcools sont généralement désirés dans le cacao à l'issue de la fermentation (Aculey *et al.*, 2010). Les teneurs en 3-méthylbutanal ont été quasiment plus élevées dans le cacao inoculé avec la souche A de *S. cerevisiae* que dans les deux autres cacaos quelle que soit la condition de fermentation. Nos résultats sont analogues à ceux des études de Aculey *et al.* (2010) et Koné *et al.* (2016). Cette observation suggère que la présence de la souche A influencerait positivement la formation du 3-méthylbutanal. En effet, le rôle des levures a été évoqué dans la formation de cet aldéhyde à partir de la leucine qui est transformée en alpha ketoisocaproate lui-même décarboxylé (Dzialo *et al.*, 2017). La souche A présenterait donc un haut potentiel de sécréter les enzymes catalysant ces réactions

biochimiques. Des concentrations élevées de ce composé sont favorables à la qualité du cacao (Serra-Bonvehí, 2005). En effet, le 3-méthylbutanal est responsable des arômes chocolat et malte dans les cacaos avant et après torréfaction (Owusu, 2010). Quant au benzaldéhyde, les teneurs ont été plus élevées dans les cacaos inoculés que dans le cacao non inoculé. L'inoculation de ces deux souches sélectionnées aux fèves de cacao serait un facteur déterminant dans la forte production de ce composé. Les résultats de l'influence des conditions de fermentation sur la formation des principaux cétones ont révélés que l'acétoïne et l'acétophénone ont été fortement détectés dans les différents cacaos analysés comme cela a été le cas dans les études menées par plusieurs auteurs (Rodriguez-Campos *et al.*, 2012 ; Koné *et al.*, 2016). Les teneurs en ces deux cétones ont été plus élevées dans les cacaos inoculés quel que soit le milieu de fermentation. Ces deux souches de *S. cerevisiae* influenceraient de façon directe ou indirecte l'évolution des teneurs en ces deux cétones ; bien que des études antérieures aient révélé que ces composés endogènes au cacao ne seraient pas affectés par une action microbienne au cours du processus de fermentation (Ho *et al.*, 2014 ; Koné *et al.*, 2016). Des concentrations élevées en acétophénone et en acétoïne produiraient respectivement des notes d'amande et de crème dans les produits dérivés du cacao (Assi-Clair *et al.*, 2019 ; Koné *et al.*, 2020). L'utilisation des données de GC-MS a permis de quantifier l'acétate de méthyle et l'acétate d'amyle comme étant les esters majeurs. Ces esters sont en nombre inférieur par rapport à ceux trouvés par Koné *et al.* (2016) dans le cacao fermenté spontanément en Côte d'Ivoire. Cependant, ils ont aussi été couramment détectés dans le cacao fermenté au Mexique (Rodriguez-Ocampo *et al.*, 2012). Les teneurs en acétate de méthyle et en acétate d'amyle ont été significativement plus

élevées dans le cacao inoculé avec la souche A de *S. cerevisiae*. La souche A est donc plus productrice des esters lors de la fermentation du cacao par rapport à la souche B. Ce résultat révèle le potentiel de production des esters de la souche A et confirme le rôle des levures dans la formation des esters au cours du

processus de fermentation (Crafack *et al.*, 2014 ; Kouassi *et al.*, 2022). Plusieurs études ont identifié les esters comme étant les responsables des arômes fruités dans les produits dérivés du cacao (Ho *et al.* 2014 ; Batista *et al.*, 2016).

## CONCLUSION ET APPLICATION DES RÉSULTATS

L'objectif de cette étude a été de déterminer l'effet du milieu de fermentation et de souches sélectionnées de *S. cerevisiae* sur la qualité aromatique des différents cacaos fermentés. Les résultats ont révélé que les cacaos inoculés avec la souche A ont enregistré de fortes teneurs en esters, aldéhydes et cétones, tandis que les cacaos inoculés avec la souche B ont été caractérisés par des teneurs élevées en alcools par rapport

aux cacaos non inoculés quelle que soit la condition de fermentation. L'inoculation des deux souches A et B de *S. cerevisiae* semble booster la formation de divers composés d'arômes désirés dans le cacao par rapport aux levures sauvages. Au regard de ces aptitudes, leur utilisation comme culture starter en vue de l'amélioration de la fermentation du cacao, montre de réelles potentialités à exploiter.

## REMERCIEMENTS

Nous adressons nos sincères remerciements à l'équipe 1 «Qualité sensorielle des produits frais et transformés» de l'UMR Qualisud du Cirad de Montpellier et le laboratoire de

Microbiologie et Biotechnologie des aliments de l'Université Nangui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire) qui ont facilité la réalisation de ce travail de recherche.

## REFERENCES

- Aculey PC, Snitkjaer P, Owusu M, Bassompierre M, Takrama J, Nørgaard L, Petersen MA, Nielsen DS, 2010. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of food science*, 75(6): 300-307. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01710.x>
- Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A, 2009. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry*, 113(1): 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.088>
- Assi-Clair BJ, Koné MK, Kouamé K, Lahon MC, Berthiot L, Durand N, Lebrun M, Julien-Ortiz A, Maraval I, Boulanger R, Guéhi TS, 2019. Effect of aroma potential of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the volatile profile of raw cocoa and sensory attributes of chocolate produced thereof. *European Food Research and Technology* 245:1459-1471. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3181-6>
- Barel, M, 2013. Qualité du cacao. L'impact du traitement post-récolte. Edition Bialec Quae, Nancy, France, pp. 1-77.
- Batista NN, Ramos CL, Ribeiro DD, Pinheiro ACM, Schwan RF, 2015. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of

- chocolate. LWT - Food Sciences and Technology, 63: 221-227.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- Batista NN, Ramos CL, Dias DR, Pinheiro ACM, Schwan R, 2016. The impact of yeast star-ter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. Journal of Food Science and Technology, 53(2): 1101-1110.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-2132-5>
- Beg MS, Ahmad S, Jan K, Bashir K, 2017. Status, supply chain and processing of cocoa. Trends Food Sciences and Technology, 66:108-116.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>
- Cleenwerck I, Camu N, Engelbeen K, De Winter T, Vandemeulebroecke K, De Vos P, De Vuyst L, 2007. *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. International Journal System Evolution of Microbiology, 57: 1647-1652.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64840-0>
- Crafack M, Keul H, Eskildsen CE, Petersen MA, Saerens S, Blennow A, Skovmand-Larsen M, Swiergers JH, Petersen GB, Nielsen DS, 2014. Impact of starter cultures and fermentation technique on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. Food Research International, 63: 306-316.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- De Vuyst L et Weckx S, 2016. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. Journal of applied microbiology, 121, 5-17.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- De Vuyst L, Lefeber T, Papalexandratou Z, Camu N, 2010. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications, 301-325.  
<https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch17>
- Ducki S, Miralles-Garcia J, Zumbé A, Tornero A, Storey DM, 2008. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. Talanta, 74(5): 1166-1174.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.034>
- Dzialo MC, Park R, Steensels J, Lievens B, Verstrepen KJ, 2017. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. FEMS Microbiology Reviews, 41: 95-128.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>
- Ferreira IM et Guido LF, 2018. Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review Fermentation, doi:10.3390/fermentation4020023.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>
- Guehi ST, Dabonne S, Ban-Koffi L, Kedjebo DK, Zahouli GIB, 2010a. Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. Advance Journal of Food Science and Technology, 2(3): 163-171
- Guehi TS, Zahouli IB, Ban-Koffi L, Fae MA, Nemlin JG, 2010b. Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. International journal of food science & technology, 45(8):1564-1571.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02302.x>
- Hamdouche Y, Meile JC, Lebrun M, Guehi T, Boulanger R, Teysier C, Montet D,

2019. Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. *Food Res Int* 119:477-491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.00>
- Hayley B, Amelias TSD, Ann DW, Jenny R., Jessika DC, Jessika DL Ilse, Jocelyn DW, Cannoni M, Cocolin L, 2018. Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. *Applied and environmental microbiology*, 84, 19, 1-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- Koffi O, Samagaci L, Goualie B, Niamke S, 2017. Diversity of yeasts involved in cocoa fermentation of six major cocoa-producing regions in Ivory Coast. *European Scientific Journal* 13:496-516. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n30p496>
- Hii CL, Law CL, Cloke M, 2009. Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa. *Journal of Food Engineering*, 90(2): 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.022>
- Ho VTT, Zhao J, Fleet G, 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- International Cocoa Organization (ICCO), 2019. Quaterly Bulletin of Cocoa statistics, Vol. XLV, N°1, Cocoa Year 2018/2019.
- Irie Bi Z, Yate BK, Ban-Koffi L, 2002. Programmes de conservation et de transformation des produits agricoles. Rapport d'activité annuel 2001 CNRA SRT.
- Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R, 2013. Identification of main fine flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1): 90-98.
- Koffi BL, Ouattara GH, Karou TG, Guehi ST, Nemlin JN, Diopoh JK, 2014. Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *Agronomie Africaine*, 25(2), 159-170.
- Koné KM, Assi-Clair BJ, Kouassi ADD, Yao KA, Ban-Kof L, Durand N, Lebrun M, Maraval I, Boulanger R, Guehi TS, 2020. Pod storage time and spontaneous fermentation treatments and their impact on the generation of the cocoa favor precursor compounds. *International Journal of Food Sciences and Technology* 56:2516-2529. <https://doi.org/10.1111/ijfs.1489>. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14890>
- Koné KM, Guéhi TS, Durand N, Ban-Koffi L, Berthiot L, Fontana TA, Brou K, Boulanger R, Montet, D, 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89: 910-917. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>
- Kongor JE, Hinneh M, Van de Walle D, Afoakwa EO, Boeckx P, Dewettinck K, 2016. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile-A review. *Food Research International*, 82, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kouassi ADD, Koné KM, Assi Clair BJ, Lebrun M, Maraval I, Boulange R, Fontana A, Guehi TS, 2022. Effect of spontaneous fermentation location on the fingerprint of volatile compound precursors of cocoa and the sensory perceptions of the end chocolate. *J Food Sci Technol* <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05526-w>

- <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05526-w>  
Lima LJR, Almeida MH, Nout MJ, Zwietering MH, 2011. Theobroma cacao L., "The Food of the Gods": Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans, with Particular Reference to the Impact of Fermentation, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51(8): 731-761. <https://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- Moreira IMV, Miguel MGCP, Duarte WF, Dias DR, Schwan RF, 2013. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. Food Research International, 54: 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
- Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS, Holzapfel WH, 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture independent methods. International Journal of Food Microbiology, 114: 168-186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>
- Owusu M, 2010. Influence of raw material and processing on aroma in chocolate. PhD Thesis presented to Faculty of Life Science University of Copenhagen, Denmark, 109p.
- Owusu M, Petersen MA, Heimdal H, 2011. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. Journal of Food Processing and Preservation, 36: 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00602.x>
- Quarshie NF et Maalekuu BK, 2014. The level of occurrence of purple beans in cocoa in three districts in the western region of Ghana and its impact on the cocoa bean quality. agriculture and biology journal of north america, ISSN Print: 2151-7517, ISSN Online: 2151-7525, doi:10.5251/abjna.2014.5.2.51.57.
- Ramos CL, Dias DR, Miguel MGDCP, Schwan RF, 2014. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. Food research international, 64: 908-918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
- Romero-Cortes T, Robles-Olvera V, Rodriguez-Jimenes G, Ramirez-Lepe M, 2012. Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. African Journal of Microbiology Research, 6(2), 339-347. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.986>
- Saltini R, Akkerman R, Frosch S, 2013. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. Food Control, 29(1), 167-187. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.054>
- Schwan RF et Fleet GH, 2014. Cocoa and Coffee Fermentations. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 633 p. <https://doi.org/10.1201/b17536>
- Schwan RF et Wheals AE, 2004. The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44 (4): 205-221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Serra-Bonvehí, J, 2005. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. Euro-pean. Food Researches and Technology, 221: 19-29. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1147-y>