

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix - Travail - Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET

PHYSIOLOGIE VEGETALES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE

FORMATION DOCTORALE EN

SCIENCE DE

LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace - Work - Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF PLANT

BIOLOGY

CENTER FOR RESEARCH AND

DOCTORAL TRAINING IN

GRADUATE STUDIES IN

LIFE, HEALTH AND

ENVIRONMENT

**QUALITÉ DU CACAO EN RELATION AVEC
QUELQUES GÉNOTYPES ET LES STADES DE
FERMENTATION**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat / Ph.D Biologie
des Organismes Végétaux

Par : TCHOUATCHEU NGOUAMBE Germaine Audrey

Master ès Sciences (M.Sc.)

Sous la direction de

NIEMENAK Nicolas

Maître de Conférences

Année Académique : 2019





DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES
DEPARTMENT OF PLANT BIOLOGY

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, membres du Jury de soutenance de la thèse de Doctorat/Ph.D en Biologie des Organismes Végétaux option Biotechnologies Végétales de l'étudiante **TCHOUATCHEU NGOUAMBE Germaine Audrey**, Matricule **07S234**, soutenue publiquement le 29 Novembre 2019 sur le sujet «**Qualité du cacao en relation avec quelques génotypes et les stades de fermentation**» attestons que les corrections conformément aux remarques et recommandations du jury lors de la soutenance de la dite thèse de Doctorat/Ph.D ont été effectuées par la candidate.

En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit./-

Rapporteur

NIEMENAK Nicolas
Maître de Conférences

Membres

SONKE Bonaventure NGUEFACK J.
Professeur

NGUEFACK J.
Maître de Conférences

MEGUENI C.
Maître de Conférences

DJOCGOUE Pierre F.
Maître de Conférences

Président

YOUMBI Emmanuel
Professeur

LISTE PROTOCOLAIRE

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2018/2019

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 19 Février 2019

ADMINISTRATION

DOYEN: TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA: DONGO Etienne, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE: AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DRC: ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef de Division Administrative et Financière: NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef de Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :
MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
2	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
3	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
4	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
6	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
7	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
8	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
9	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
10	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
11	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
12	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
13	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
14	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
15	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
17	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
18	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
19	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
20	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
21	DJOKAM TAMO Rosine	Chargée de Cours	En poste
22	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargée de Cours	En poste
24	DJUWKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
25	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
26	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
27	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
28	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINESUP
34	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargée de Cours	En poste
37	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (44)			
1	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/UIYI</i>
5	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
6	KAMGANG René	Professeur	<i>C.S. MINRESI</i>
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Maître de Conférences	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
14	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
20	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
16	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
17	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
18	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
19	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
21	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
22	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
24	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
25	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
26	BILANDA Danielle Claude	Chargée de Cours	En poste
27	DJIOGUE Séfirin	Chargée de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
32	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
34	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
35	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
36	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
37	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
38	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
39	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
40	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste
43	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (27)			
1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
5	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
6	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
7	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
8	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/UDs
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
17	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
18	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
19	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
20	NGOUCO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
22	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
24	NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL	Chargée de Cours	<i>Expert national/UNESCO</i>
25	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
26	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
27	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)			
1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice-Recteur Univ. Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ. Ngaoundere</i>
4	GHOOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.P.R</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UD</i> s
10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste

13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Vice Chancellor/UB</i>
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NDI NSAMI Julius	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA née NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (32)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDS
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGFAK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur/UN</i>
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYY</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
11	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
17	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
18	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYY</i>
20	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
21	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
22	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
23	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste

24	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
25	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
26	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
27	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
28	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Chargé de Cours	Chef Service/MINESUP
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
32	NGNINTEDO Dominique	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
3	NDOUNAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUHEP KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
10	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
11	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EBELE Serge	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
23	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (28)

1	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>En poste</i>
2	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
3	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
4	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>CD Info/ Chef division MINESUP</i>
5	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
6	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
7	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
9	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
26	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
27	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (12)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	ETOA François Xavier	Professeur	Chef de Département/FS/UYI Recteur Université de Douala
3	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
5	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous-Directeur/ MINRESI</i>
6	NJOMO Donatien	Professeur	En poste

7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
9	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
10	WOAFO Paul	Professeur	En poste
	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
12	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA ENGO Serge Guy	Maître de Conférences	Director/Students/Affairs. UB
21	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
22	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
23	SAIDOU	Maître de Conférences	Sous-Directeur/Minresi
24	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
25	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
26	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
27	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	Sous-Directeur/ MINESUP
28	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
29	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
30	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
31	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
32	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
33	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	<i>En poste</i>
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
37	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
40	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	MEDJO EKO Robert	Professeur	<i>Conseiller Technique/UYII</i>
5	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département

6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/UMa
10	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
11	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
12	NGOS III Simon	Maître de Conférences	DAAC/Uma
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEM DJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	MOUAFUO Lucas	Chargé de Cours	En poste
35	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
37	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
38	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA/MINRESI
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
40	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
41	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
43	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	5 (1)	12 (6)	19 (11)	1 (1)	37 (19)
BPA	12 (1)	10 (5)	20 (07)	2 (0)	44 (13)
BPV	5 (0)	10(2)	9 (04)	2(02)	26 (9)
CI	9(1)	9(2)	14 (3)	0 (0)	32 (6)
CO	7 (0)	14 (4)	10 (4)	1 (0)	32(8)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (0)	10 (3)	26 (3)
MAT	2 (0)	4 (1)	19 (1)	2 (0)	27 (2)
MIB	2 (0)	5 (2)	5 (1)	0 (0)	12 (3)
PHY	10 (0)	17(2)	11 (3)	1 (0)	39 (5)
ST	7 (1)	15 (1)	21 (5)	1 (0)	43(7)
Total	61 (4)	97 (25)	141 (39))	19 (6)	318 (75)

Soit un total de **318 (75)** dont :

Professeurs **61 (4)**

Maîtres de Conférences **97 (25)**

Chargés de Cours **141 (39)**

Assistants **18 (5)**

() = Nombre de Femmes

DEDICACE

A nos filles Emaze Minoue Anne Maïté Joy et Ndjee Minoue Ange Yohanne Théodrine;

A mon tendre époux Minoue Gastien angel St-clair.

REMERCIEMENTS

Je glorifie le Tout Puissant, mon DIEU, pour m'avoir donné la grâce de réaliser ce travail.

Voici la fin d'une expérience magnifique, scientifique et humaine très riche, pour laquelle j'aimerais remercier toute personne ayant contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Professeur NIEMENAK Nicolas, pour son encadrement et ses qualités scientifiques, pédagogiques et sociales qui m'ont permis de mieux structurer et bien construire mes idées. Merci d'avoir assuré jusqu'au bout d'excellentes conditions matérielles qui m'ont permis de travailler dans un environnement favorable. En me proposant ce thème, vous m'avez fait une marque de confiance. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie :

Les différents membres de jury qui ont accepté de donner de leur temps pour l'appréciation de ce travail.

Dr. EYAMO Jos qui m'a transmis son savoir-faire avec une grande générosité et qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions.

Monsieur BALEBA Laurent, Chef station du champ cacaoyer de l'IRAD de Nkoemvone, Monsieur EYENE Damien de Nkoemvone et Monsieur OWONO Arsène de la SODECAO pour m'avoir fourni le matériel végétal.

Dr. LIBALAH Moses et Dr. MOMO TAKOUDJOU Stéphane pour m'avoir enseigné les notions essentielles des analyses statistiques avec le logiciel R.

Dr. DJUMYOM Valerie, Dr. TEMEGNE NONO Carine, Dr. FOTSO Beaulys, et Dr. DJABOU Astride, pour leur soutien, leur temps et leur énergie durant la période de correction de ce document.

Dr. MEGUEKAM, Dr. NOAH et Dr. NZWEUNDJI pour leur conseil et leur encouragement dans la réalisation de ce travail.

A tous les membres du laboratoire de physiologie et de biochimie végétale, je pense aux:

- Professeurs FOTSO, MBOUOPDA, EFFA et ONDOBO pour leurs encouragements et conseils;
- Dr. SOUPI, Dr. MAHO, Dr. MANGA et Dr. DJEUANI, qui n'ont cessé de m'encourager, de me soutenir dans la réalisation de ce travail;
- A mes aînés: M. GWAN Alvis, M. BOUTCHOUANG Rodrigue et Mlle AKITIO Olive pour leurs conseils et encouragements;
- Aux membres du Laboratoire: Mlle KACKO, M. DJIOKO, Mme MAKONDY, M. AKOA, M. ABEGA, M. AMADOU, Mme NGODOM, M. NGAMBI, pour leurs soutiens;
- Mlle TCHOUGA Alvine et M. KETCHIEMO Franklin pour le soutien et le partage de connaissances sur les logiciels de référence.

A mes amis qui m'ont apporté leur soutien sans faille et encouragement : Mlle NOUMI Christelle, Mme DJIOMO Paméla, Mlle MANET Linda, Mme TIAGUEU Michèle, Mme JOU Christelle, Mme JAMO Kathleen, Mme MAKOU Laure, M. NACK Elie et Mme MATSODUM Pulcherie.

Un grand merci à ma belle-famille et plus particulièrement à Mme NDJEE Crescence pour m'avoir fourni le thermomètre à sonde et M. NDJEE NDEBI Fils Serge pour l'acheminement de tout le matériel de laboratoire.

Ma reconnaissance à Mefeu PATIPE Marie Louise et ma mère SAMENI Marie Joseph, sans vous femmes fortes et incroyables je n'en serai pas là.

A la famille NGOUAMBE et plus particulièrement à EMAZE Christian, merci pour m'avoir fourni le matériel de laboratoire (la balance et le pied à coulisse); mes remerciements à ma grande mère DIEUPE Joséphine, belle-tante TCHEUMADJUI Béatrice, ma cousine NWEKAM Line, papy NGOUABEU Raphael pour le soutien matériel, financier, l'encouragement et l'amour sans condition.

A ma tendre cousine TCHOUGA Hornel Stela Noël qui a su me supporter et veiller sur mes enfants pendant mes absences, merci et également mon fils adoptif NZAMBA Alfred qui a su veiller sur ses cadets.

Enfin, à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne figurent pas ici.

SOMMAIRE

LISTE PROTOCOLAIRE	i
DEDICACE	xi
REMERCIEMENTS	xii
SOMMAIRE	xiv
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES ANNEXES	xx
LISTE DES ABBREVIATIONS	xxi
RESUME	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
Chapitre I. Généralités	5
I.1. Introduction générale	1
I.2. Revue de la littérature.....	5
I.2.1. Historique et répartition mondiale du cacao.....	5
I.2.2. Diversité biologique du cacaoyer	6
I.2.3. Systématique et taxonomie du cacao.....	9
I.2.4. Culture du cacao	10
I. 2.4.1. Ecologie et agronomie du cacao	10
I. 2.4.2. Biologie et physiologie du cacao.....	11
I.2.5. Contraintes de la cacaoculture	14
I.2.5.1. Maladies du cacao en champ	14
I.2.5.2. Insectes et ravageurs du cacao en champ	15
I.2.6. Economique de la cacaoculture Camerounaise	16
I.2.7. Traitements post-récolte du cacao	18
I.2.7.1. Ecabossage des cabosses de cacao	19
I.2.7.2. Fermentation des fèves de cacao	20
I.2.7.3. Séchage des fèves de cacao issues de la fermentation.....	23
I.2.7.4. Stockage après séchage et transport	24
I.2.8. Composition des marqueurs biochimiques de cacao	25
I.2.8.1. Polyphénols de cacao.....	26
I.2.8.2. Acides aminés.....	30

I.2.8.3. Sucres.....	35
Chapitre II. Matériel et méthodes	39
II.1. Matériel végétal.....	39
III.1.1. Description des cabosses de cacao.....	40
II.2. Méthodes	42
II.2.1. Préparation des solutions d'incubation	42
II.2.2. Milieu et conditions d'incubation	42
II.2.2.1. Milieu d'incubation	42
II.2.2.2. Aseptisation et conditions d'incubation	43
II.2.3. Coloration des fèves	44
II.2.4. Indice de fermentation.....	44
II.2.5. pH des fèves	45
II.2.6. Détermination des polyphénols par RP-HPLC	45
II.2.6.1. Extraction des polyphénols	45
II.2.6.2. Quantification et identification des polyphénols.....	46
II.2.7. Détermination des acides aminés libres par HPLC¶.....	46
II.2.7.1. Extraction des acides aminés.....	47
II.2.7.2. Séparation des acides aminés par RP-HPLC.....	47
II.2.7.3. Quantification et identification des acides aminés par HPLC.....	47
II.2.8. Détermination des sucres par RI-HPLC.....	48
II.2.9. Analyses statistiques	49
Chapitre III. Résultats et discussion.....	55
III.1. Résultats	55
III.1.1. Variation de la coloration interne des cotylédons issus du cacao marchand	55
III.1.2. Teneur des acides aminés libres dans le cacao marchand.....	55
III.1.3. Polyphénols dans les fèves du cacao marchand.....	59
III.1.3.1. Teneur en flavonoïdes.....	59
III.1.3.2. Teneur en anthocyanines.....	60
III.1.3.3. Corrélation entre les couleurs et les marqueurs biochimiques des fèves.....	62
III.1.4. Teneur des acides aminés libres dans les fèves au cours de l'incubation chez 3 génotypes	63
III.1.4.1. Acides aminés hydrophobes	63
III.1.4.2. Acides aminés acides	67
III.1.4.3. Autres acides aminés libres.....	72

III.1.4.4. Teneur en acide γ -Aminobutyrique (GABA) dans les 3 génotypes	76
III.1.5. Paramètre physique d'évaluation de qualité du cacao	77
III.1.6. Impact de l'incubation sur les fèves de cacao.....	79
III.1.6.1 Coloration interne des cotylédons.....	79
III.1.6.2. PH des fèves.....	80
III.1.6.3. Evolution de l'indice de fermentation (FI)	81
III.1.7. Teneur en acides aminés dans 13 génotypes.....	83
III.1.7.1. Teneur totale des acides aminés libres	83
III.1.7.2. Contenu du ratio des hydrophobes/acides des acides aminés libres	86
III.1.7.3. Ratio hydrophobes/acides en fonction de la teneur totale en acides aminés libres.....	87
III.1.8. Teneur en polyphénols dans les fèves.....	89
III.1.8.1 Teneur en épicatechine	89
III.1.8.2 Teneur en catéchine	90
III.1.8.3. Teneur en anthocyanines.....	91
III.1.9. Teneurs en sucres dans les fèves de cacao.....	94
III.1.9.1. Teneur en saccharose	94
III.1.9.2. Teneur en glucose	95
III.1.9.3. Teneur en galactose.....	95
III.1.9.4. Teneur en fructose.....	96
III.1.9.5. Teneur en raffinose	97
III.1.9.6. Ratio des sucres métaboliques et de transport	98
III.2. Discussion	102
III.2.1. Qualité du cacao marchand.....	102
III.2.2. Influence des acides sur les acides aminés après incubation	106
III.2.3. Qualité du cacao en fonction du génotype.....	109
Conclusion et Perspectives	118
IV.1. Conclusion	118
IV.2. Perspectives	120
REFERENCES	121
ANNEXES	136
LISTE DE PUBLICATION ISSUE DE LA THESE	140

LISTE DES FIGURES

Fig. 1. Aspects géographiques de la production de cacao sur le globe terrestre	6
Fig. 2. Les variétés du cacao	8
Fig. 3. Plants de cacaoyers et ses composants	13
Fig. 4. Quelques affections du cacao	16
Fig. 5. Fermentation des fèves de cacao.	22
Fig. 6. Défauts de fermentation sur les fèves de cacao	23
Fig. 7. Défauts de cacao dus à un stockage inadéquat	25
Fig. 8. Classification des familles de polyphénols.....	28
Fig. 9. Principales voies de biosynthèse des acides aminés	32
Fig. 10. Différents rôles et fonctions des acides aminés).	35
Fig. 11. Biosynthèse des glucides	37
Fig. 12. Classification des glucides.....	38
Fig. 13. Cabosses mures de cacao.....	40
Fig. 14. Principaux couleurs des fèves de cacao représentant différents stades de fermentation.	55
Fig. 15. Variation du contenu de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) à différents stades	59
Fig. 16. Variation du contenu des flavonoïdes des fèves de cacao à différents stades.....	60
Fig. 17. Variation du contenu des anthocyanines dans les fèves à différents stades	61
Fig. 18. Analyses en composantes principales de la composition biochimique des fèves..	62
Fig. 19. Variation en teneur des acides aminés hydrophobes libres des fèves de T79/501.....	64
Fig. 20. Variation en teneur des acides aminés hydrophobes libres des fèves de ICS40..	65
Fig. 21. Variation en teneur des acides aminés libres hydrophobes des fèves de Gc.).....	67
Fig. 22. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves de T79/501.....	69
Fig. 23. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves de ICS40.....	70
Fig. 24. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves de German cocoa.....	71
Fig. 25. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves de T79/501.....	73
Fig. 26. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves de ICS40.....	74
Fig. 27. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves de German cocoa.....	75
Fig. 28. Teneur en acide γ -Aminobutyrique dans les fèves de cacao.	77
Fig. 29. Variation des colorations des fèves issues dans différents traitements	79
Fig. 30. Variation du pH des poudres de fèves incubées et non incubées séchées.....	80
Fig. 31. Variation des valeurs d'indice de fermentation pour les fèves incubées et séchées.....	82
Fig. 32. Contenu total des acides aminés libres présents dans tous les 13 clones.	85

Fig. 33. Ratio des acides aminés libres des hydrophobes/acides dans tous les 13 clones.	87
Fig. 34. Ratio des hydrophobes/acides des acides aminés libres dans tous les 13 clones..	88
Fig. 35. Variation des teneurs en flavonoïde. (A) épicatechine dans les 13 géotypes.....	90
Fig. 36. Variation des teneurs en flavonoïde. (B) catéchine dans les 13 géotypes.....	91
Fig. 37. Variation de la teneur en anthocyanine. (A) cyanidine-3-galactoside des 13 clones..	92
Fig. 38. Variation en teneur d'anthocyanine. (B) cyanidine-3-arabinoside des 13 clones	93
Fig. 39. Teneur en saccharose des fèves issues des traitements chez 13 géotypes de cacao	94
Fig. 40. Teneur en glucose des fèves issues des traitements chez 13 géotypes de cacao	95
Fig. 41. Teneur en galactose des fèves issues des traitements chez 13 géotypes de cacao.	96
Fig. 42. Teneur en fructose des fèves issues des traitements chez 13 géotypes de cacao.	97
Fig. 43. Teneur en raffinose des fèves issues des traitements chez 13 géotypes de cacao.....	98
Fig. 44. Ratio des sucres glucose/saccharose dans tous les 13 géotypes de cacao.....	99
Fig. 45. Ratio des sucres fructose/saccharose dans tous les 13 géotypes de cacao.	100
Fig. 46. Ratio des sucres glucose/ fructose dans tous les 13 géotypes de cacao	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Position systématique de <i>Theobroma cacao</i> L.	9
Tableau II. Taxonomie du genre <i>Theobroma</i>	10
Tableau III. Différents génotypes de cacaoyer utilisés au cours de ce travail.....	39
Tableau IV. Caractéristiques morphologiques des différents génotypes utilisés.	41
Tableau V. Dispositif expérimental des incubations pour 13 génotypes.....	43
Tableau VI. Dispositif expérimental des incubations pour 3 génotypes (T79/501, German cocoa, ISC40).....	44
Tableau VII RP-HPLC gradients utilisés pour la séparation des polyphénols.	46
Tableau VIII: Techniques des différentes analyses	50
Tableau IX. Profil des individus des acides aminés libres totaux hydrophobes, acides et autres à différents stades de fermentation	58
Tableau X. Evaluation des paramètres physiques des fèves de cacao.	78

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Volume des acides aminés libres en mg/g ffdm et valeurs moyennes des acides aminés des fèves non incubées sechées des différents géotypes	136
Annexe 2. Volume des acides aminés libres en mg/g ffdm et valeurs moyennes des acides aminés des fèves incubées dans le traitement « acide acétique » des différents géotypes	137
Annexe 3. Volume des acides aminés libres en mg/g ffdm et valeurs moyennes des acides aminés des fèves incubées dans le traitement « acide lactique + acide acétique » des différents géotypes	138
Annexe 4. Protocole de delipidation	139

LISTE DES ABBREVIATIONS

ANOVA:	Analyse de Variance
ffdm:	Fat free dry matter
GC:	German Cocoa
ICCO:	International Cocoa Organization
ICS:	Imperial College Selection
IMC:	Iquitos Mixed Collection
IRAD:	Institut de Recherche Agronomique et de Développement
MS:	Spectrométrie de Masse
RI-HPLC:	Reverse-Inverse High Performance Liquid Chromatography
RP-HPLC:	Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography
SNK:	Sélection de Nkoemvone
SODECAO:	Société de Développement du Cacao
T:	Tafo

RESUME

La fermentation est un processus essentiel dans le développement des précurseurs d'arômes et du goût du chocolat que sont d'une part, les acides aminés qui proviennent de l'hydrolyse des protéines, et d'autre part, les sucres réducteurs qui proviennent de l'hydrolyse du saccharose. L'effectivité des milieux d'incubation et la fermentation de cacao se présentent comme des moyens efficaces d'induire les changements biochimiques des fèves qui conduisent à différents stades de fèves de cacao telles que les fèves ardoisées (non fermentées), violettes (sous fermentées) et brunes (entièrement fermentées). Cette hétérogénéité de stade dans un ensemble d'échantillon peut influencer la qualité des produits finaux. Le présent travail a pour objectif de caractériser les marqueurs physico – chimiques des fèves de cacao. Pour cela, la quantification et l'identification des teneurs en acides aminés libres ont été réalisées par marquage *de o* - phthalaldehyde et détectés avec un spectrophotomètre de fluorescence couplé à un système de RP-HPLC. Des polyphénols ont été analysés à 280 nm par HPLC en utilisant un détecteur de rangée photodiode. Les paramètres physico - chimiques des fèves incubées et non incubées séchées sont évalués et l'impact de la variabilité génétique sur la teneur des acides aminés, des polyphénols et des sucres réducteurs des fèves incubées et séchées est étudiée. La teneur en acides aminés dans les fèves violettes a été sensiblement plus élevée ($11,165 \pm 4281 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ffdm}$) que celle des fèves ardoisées ($4304,5 \pm 1927,6 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ffdm}$). Cependant, aucune différence significative entre les fèves violettes et brunes n'a été notée. Le contenu en épicatechine, en catéchine, en cyanidine-3-araboside et en cyanidine-3-galactoside a été significativement faible dans les fèves violettes et brunes une fois comparé aux fèves ardoisées. Les teneurs en sucres réducteurs varient suivant le génotype et le pH du traitement. Le saccharose et le raffinose sont présents dans tous les génotypes non incubés et aux concentrations élevées. Cependant, le galactose et le fructose sont présents dans tous les génotypes incubés et non incubés, à des concentrations élevées dans les traitements 1 (acide acétique) et 2 (acide lactique puis acide acétique) mais faibles chez les fèves non incubées. Par contre, le glucose est présent uniquement dans les traitements 1 (acide acétique) et 2 (acide lactique puis acide acétique) à des concentrations élevées et variables exception faite chez trois génotypes. La comparaison entre les traitements appliqués lors des incubations a révélé que la nature de l'acide influence les marqueurs biochimiques.

Mots-clés: Cacao, génotypes, fermentation, acides aminés, polyphénols, sucres.

ABSTRACT

Fermentation is an essential process in flavors precursors development and taste of chocolate which are, on the one hand, amino acids which come from proteins hydrolysis, and on the other hand, reducing sugars which come from sucrose hydrolysis. The effectivity of incubations media and cocoa fermentation and cocoa fermentation arise as effective means to induce biochemical changes of cocoa beans which lead to various stages of cocoa beans such as slaty (not fermented), violets (under fermented) and brown (fully fermented). This heterogeneity of stage in a sample set can influence quality of end products. The present work aims to characterize physico-chemical markers of cocoa beans. To achieve this, quantification and identification of free amino acids were performed by labeling o - phthalaldehyde and detected with a fluorescence spectrophotometer coupled to an RP - HPLC system. Polyphenols were analyzed at 280 nm by HPLC using a photodiode array detector. Physico-chemical parameters of incubated and non-incubated dried beans are evaluated and impact of genetic variability on content of amino acids, polyphenols and reducing sugars of incubated and dried cocoa beans is studied. Amino acid content in violet beans was significantly higher higher ($11.165 \pm 4281 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ffdm}$) that of slaty cocoa beans ($4304.5 \pm 1927.6 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ffdm}$). However, no significant difference between violet and brown cocoa beans was noted. Contents of epicatechin, catechin, cyanidin-3-arabinoside and cyanidin-3-galactoside were significantly low in violet and brown cocoa beans once compared to slaty cocoa beans. Contents of reducing sugars vary according to genotype and pH of treatment. Sucrose and raffinose are present in all non-incubated genotypes at high concentrations. However, galactose and fructose are present in all incubated and non-incubated genotypes, at high concentrations in treatments 1 (acetic acid) and 2 (lactic acid and then acetic acid) but low in non-incubated beans. In addition, glucose is present only in treatments 1 (acetic acid) and 2 (lactic acid and then acetic acid) at high and variable concentrations except in three genotypes. Comparison between treatments applied during incubations revealed that nature of acid influences biochemical markers.

Keywords: cocoa, genotype, fermentation-like incubation, amino acids, polyphenols, sugars.

Introduction générale

I.1. Introduction générale

Le cacao (*Theobroma cacao* L.) est une plante pérenne appartenant à la famille des Malvaceae (Alverson *et al.*, 1999 ; Motamayor *et al.*, 2002), avec trois principales variétés : Criollo, Forastero et Trinitario dominant le commerce mondial (Motamayor *et al.*, 2003, 2008). Ces variétés sont distinctes en raison des différences dans la morphologie, les caractéristiques génétiques et leurs origines géographiques. Le cacao est principalement cultivé en Afrique centrale et occidentale, en Amérique du sud et en Asie du sud-est. Les huit plus grands pays producteurs regroupent la Côte d'Ivoire, le Ghana, l'Indonésie, le Nigéria, le Cameroun, le Brésil, l'Equateur et la Malaisie (ICCO, 2019). Le cacao est consommé largement sous forme de chocolats et le taux de consommation a augmenté vu la demande croissante des confiseries de chocolat dans le monde entier. Le cacao est également utilisé dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Kongor *et al.*, 2016).

Le cacao est une culture de rente et fait partie intégrante de l'économie du Cameroun. Il est le deuxième produit d'exportation du pays dans le domaine agricole (après le bois, le coton les bananes et le café) avec un taux de 12,4 % et contribue ainsi, efficacement à son développement socioéconomique (Anonyme 1, 2018). Selon l'Organisation Internationale de Cacao, le Cameroun occupe le 5^{ème} rang mondial avec une contribution estimée à 240 000 tonnes sur une production mondiale de 4 645 000 tonnes pour la saison 2017/2018 (ICCO, 2019). Bien que l'or brun camerounais mobilise plus de 600 000 emplois directs et indirects, sa production demeure l'œuvre des petits producteurs. Ces cacaoculteurs pratiquent une culture généralement sous ombrage (en association avec d'autres arbres) ou encore dans des régions d'agroforesterie semi-naturelle qui constituent par conséquent un habitat particulièrement stable pour de nombreuses espèces notamment *Theobroma cacao* (Anonyme 1, 2018). Les fèves de cacao présentent un potentiel intrinsèque de qualité qui dépend fortement du génotype, de la saison de récolte, de l'origine, du terroir et du savoir-faire agronomique du planteur (Barel, 2013). Mais, ce potentiel peut être valorisé ou dégradé au cours des opérations post-récolte (Barel, 2013 ; Saltini *et al.*, 2013).

Le Cameroun est confronté au problème de la qualité du cacao avec 45 % de ses produits classés courant et seulement 13 % considérés comme de qualité supérieure (Anonyme 1, 2018). La qualité des fèves de cacao dépend essentiellement de la conduite de la fermentation, étape au cours de laquelle s'effectue la synthèse des précurseurs d'arôme. L'évaluation de la qualité des fèves séchées est étroitement liée à l'aspect morphologique de

leur cotylédon. La couleur des cotylédons est modifiée au cours de la fermentation par l'acidification des fèves qui déclenche les changements biochimiques, induisant l'activation d'un ensemble d'enzymes spécifiques. Au stade préliminaire de la fermentation (stade anaérobie) : les levures pectinolytiques génèrent de l'éthanol et du lactique qui sont responsables de la liquéfaction de la pulpe. Elles génèrent des sueurs qui sortent du système et permettent l'entrée d'air dans la masse de fermentation (Moreira *et al.*, 2013). Au cours de cette phase, la valeur du pH dans la masse est initialement inférieure à 4 en raison de la teneur en acide citrique. Lorsque l'activité des micro-organismes commence, la température du milieu augmente, créant ainsi les conditions optimales pour la croissance et le développement de nouvelles espèces. Les bactéries acides lactiques convertissent l'acide citrique et les glucides résiduels de la pulpe, principalement en acide lactique, acide acétique et / ou mannitol (Moreira *et al.*, 2013). Au stade aérobie, la croissance des bactéries acides acétiques est facilitée par le processus de liquéfaction de la pulpe, qui permet le transfert d'oxygène dans les graines de cacao. Au cours de cette phase, la teneur en acide acétique augmente, entraînant la diffusion subséquente d'éthanol et d'acide acétique dans les graines de cacao, ce qui provoque la baisse du pH de 7 à 4–4,5 à l'intérieur des graines. De façon générale, l'activité de levures sur la pulpe de cacao produit l'éthanol qui est oxydé par les bactéries en acide lactique et acide acétique (stade aérobie) (De Roos & De Vuyst, 2018 ; Romanens *et al.*, 2018), indispensables pour l'obtention d'un cacao marchand de bonne qualité. Le processus d'oxydation produit de la chaleur qui entraîne la mort de l'embryon empêchant la germination et simultanément, l'acide acétique s'infiltré lentement dans les cotylédons (Biehl *et al.*, 1985). La diminution du pH (< 5) compromet l'intégrité de cellules et permet à plusieurs enzymes d'interagir avec leurs substrats (Moreira *et al.*, 2013). Ainsi, les protéines de réserve sont hydrolysées par la protéinase aspartique et la carboxypeptidase (Biehl *et al.*, 1993 ; Voigt *et al.*, 1994) et produisent des acides aminés libres et des peptides tandis que l'invertase coupe le saccharose en fructose et glucose (Lopez *et al.*, 1978). Sous les conditions aérobies et de pH élevés, la polyphénoloxydase catalyse l'oxydation de divers métabolites phénoliques aux quinones. Les quinones réagissent avec chacun d'eux aussi bien qu'avec d'autres donneurs d'électrons dans le tissu altéré, pour former des polymères insolubles bruns appelés polyphénols. Au même moment, les anthocyanines sont hydrolysées par les β - glycosidases pour produire les anthocyanidines, le galactose et l'arabinose. En outre, la dimérisation des leucocyanidins et l'exsudation des flavonoïdes dans les fèves se produisent. Par la suite, durant le séchage, la quantité de polyphénols est substantiellement réduite par le brunissement enzymatique (Wollgast & Anklam, 2000).

Selon la durée de la fermentation, l'homogénéité de la taille des fèves dans le panier / caisse, la fréquence du mélange et la température, l'état biochimique des fèves de cacao changent. Cette variabilité peut être caractérisée visuellement en utilisant l'épreuve à la coupe ou « cut test » qui permet de distinguer les fèves bien fermentées montrant la couleur brune. Les fèves sous-fermentées apparaissent violettes à violettes-brunes et les fèves non-fermentées sont ardoisées. Ces trois groupes sont souvent trouvés dans le cacao marchand (Lieberei & Rohsius, 2003).

Les industries de cacao mélangent des fèves de diverses origines qui ont été traitées différemment dans le but d'uniformiser l'ensemble des matières premières pour produire le chocolat. Les paramètres de traitement pour produire le chocolat sont alors ajustés sur la caractéristique prévue du mélange des fèves, régulièrement sur la base des indicateurs simples tels que l'origine du cacao (Saltini *et al.*, 2013). Dans l'optique de comprendre la fermentation et de l'améliorer, plusieurs études ont été menées sur des changements biochimiques se produisant pendant la fermentation, le séchage et la torréfaction du cacao de différentes origines et génotypes. Mais, ces études sont effectuées sur le cacao marchand dans sa globalité, ne prenant pas en compte la composition des lots (Kirchhoff *et al.*, 1989 ; Niemenak *et al.*, 2006 ; Rohsius *et al.*, 2006 ; Lieberei *et al.*, 2013), elles se concentrent sur les pratiques agricoles où différentes conditions influencent les paramètres spécifiques des fèves de cacao. De telles informations atteignent rarement les fabricants de chocolat. Un des défis résultant de l'existence des fèves ardoisées, violettes, brunes et les différents stades de transition de ces étapes majeures est de savoir l'impact de ces violettes sur la qualité d'un lot de fèves et le chocolat qui peut en être issu. Par ailleurs, des études sur le dynamisme du milieu de fermentation révèlent une production simultanée des acides lactiques et acétiques en début de fermentation (Biehl *et al.*, 1982 ; Eyamo *et al.*, 2016). Sachant que les acides lactique et acétique sont importants pour l'obtention du cacao marchand de qualité, il est nécessaire de vérifier si contrairement à l'ordre d'apparition admise (acide lactique les 2 premiers jours, puis acide acétique à partir du 3^{ème} jour de fermentation), d'autres ordres d'apparition d'acides influenceraient les marqueurs physico – chimiques de la qualité des fèves.

Le présent travail a été conduit selon les hypothèses de recherche suivantes :

Les fèves violettes (l'un des stades de transition entre les fèves ardoisées et brunes) contenues dans le cacao marchand influenceraient la qualité finale du chocolat.

Le processus d'incubation des fèves fraîches dans les milieux modélisés de fermentation se présenterait comme une opportunité pour la bonne compréhension des transformations physico - chimiques qui influencent la qualité du cacao.

Pour vérifier ces hypothèses, les fèves de quelques génotypes fermentées par les producteurs ainsi que celles issues de la fermentation en condition de laboratoire ont été utilisées. L'objectif général de ce travail est de caractériser les marqueurs physio - chimiques de ces fèves dans le but d'améliorer la qualité des fèves en général et de valoriser celles de couleur violette observées dans le cacao marchand camerounais.

Plus spécifiquement, il s'agit de :

- déterminer les teneurs en acides aminés et en polyphénols dans le cacao marchand;
- évaluer la dynamique des acides aminés au cours de l'incubation des fèves dans différents milieux;
- évaluer les paramètres physico – chimiques des fèves incubées et séchées et élaborer l'impact de la variabilité génétique sur la teneur des acides aminés, des polyphénols et des sucres réducteurs dans les fèves séchées après incubation.

Chapitre I. Généralités

I.2. Revue de la littérature

I.2.1. Historique et répartition mondiale du cacao

Theobroma cacao L. est un arbre originaire du continent américain. D'après Cheesman (1944), il proviendrait de la Haute Amazonie dans une zone comprise entre les rivières Napo, Putumayo et Caqueta, qui prennent naissance dans les Andes équatoriennes et affluent vers le fleuve Amazone. Toutefois, même si sa dispersion a pu se faire naturellement dans toute la région de la Haute Amazonie, les données récentes indiquent que l'introduction du cacaoyer en Amérique centrale (Mexique) est probablement l'œuvre de l'homme (Motamayor *et al.*, 2002). La découverte plus tôt du fruit de cacao est créditée à l'Olmèque (1500-400 ans avant Jésus Christ). Le cacao a donc hérité son nom scientifique et générique d'une part, de son origine Maya : *Theobroma* du latin « Theo » qui signifie Dieu et « bromo », nourriture soit Théobroma: nourriture des Dieux (Whitlock *et al.*, 2001). Pendant cette période, les fèves de cacao ont été écrasées, mélangées à l'eau et à diverses épices ayant pour résultat une boisson écumeuse appelée le "tchcolatl" (ou xocolalt) à l'origine du chocolat actuel (Knight, 1999). L'histoire du cacaoyer remonte à celle des Indiens d'Amérique centrale, qui considéraient le cacao comme un élixir divin.

Sa culture s'est répandue successivement grâce aux civilisations Olmèques, Mayas et Aztèques (Motamayor *et al.*, 2002). Avec les Aztèques (13^{ème} – 16^{ème} siècle), les plantations s'étendirent dans les Îles Caraïbes, au Venezuela, en Equateur et en Colombie. C'est au 17^{ème} siècle qu'une expansion rapide du marché du cacao au niveau du continent européen se produisit. Au cours de ce siècle, les espagnols avaient réussi le transfert de quelques plants à Manille aux Philippines. La culture s'est progressivement répandue vers le sud à travers l'Inde orientale puis au Sri Lanka au cours du 19^{ème} siècle. Au début du 20^{ème} siècle commence une série d'introduction de la culture par les Hollandais à Java et par les allemands en Papouasie-Nouvelle-Guinée à partir de plusieurs régions d'Amérique Latine. De manière autonome, la province de Bahia au Brésil a créé de grandes plantations cacaoyères au 19^{ème} siècle (Loor, 2007).

C'est à partir de la région de Bahia que le cacao a pris la direction de l'Afrique de l'Ouest où d'importantes plantations ont été créées au 19^{ème} et au 20^{ème} siècle notamment au Cameroun (à la veille de la première guerre mondiale, plus de 11 000 hectares étaient déjà plantés en cacaoyers sur les pentes du Mont Cameroun), au Nigeria, au Togo, au Ghana et en Côte d'Ivoire (Oro, 2011 ; Torres & Momsen, 2011) puis en Asie (en Malaisie et en

Indonésie). Aujourd'hui, on retrouve le cacaoyer sur les cinq continents avec une part importante de la production en Afrique (Alet, 2013).

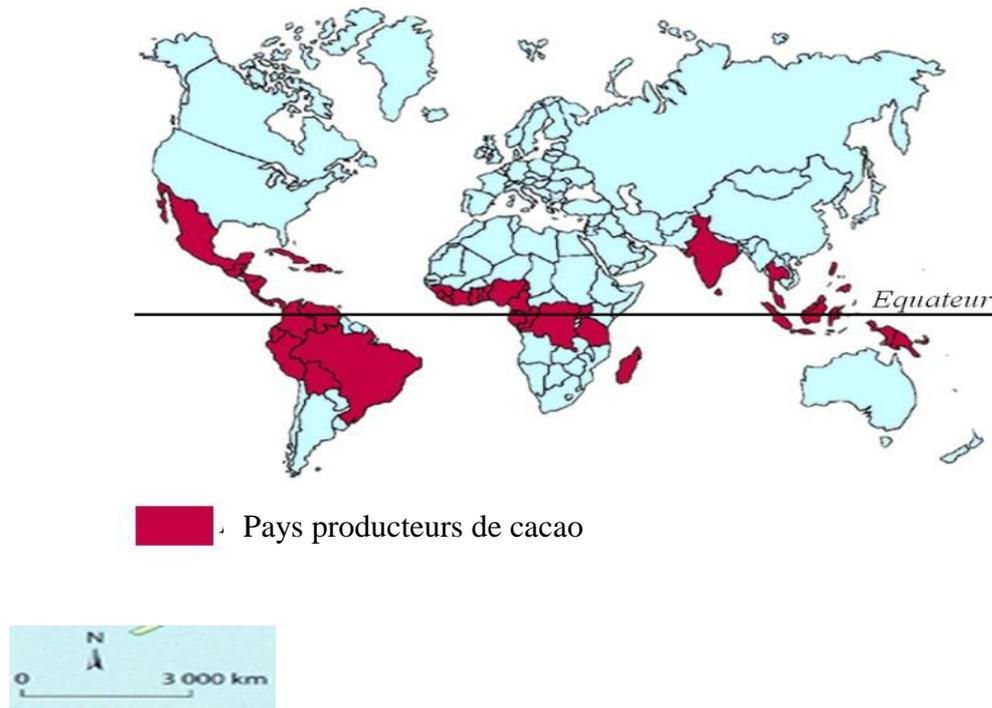


Fig. 1. Aspects géographiques de la production de cacao sur le globe terrestre (Alet, 2013)

I.2.2. Diversité biologique du cacaoyer

La classification de la diversité génétique de l'espèce *T. cacao* a été proposée par Morris (1882) en référence à trois groupes morpho-géographiques de cacaoyers traditionnellement cultivés dans le monde : Criollo, Forastero et Trinitario. Les groupes Criollo, Forastero et Trinitario ont servi de base à la première classification du cacaoyer ; ces groupes ne reflètent plus actuellement la vraie dimension, structuration et diversité génétique de cette espèce (Bartley, 2005). Dans le genre *Theobroma cacao* L., les différentes sous-espèces peuvent être identifiées. Selon la littérature, ces sous-espèces sont classifiées en quatre variétés : Criollo, Forastero, Trinitario et Nacional (Saltini *et al.*, 2013 ; Kongor *et al.*, 2016). Il est bien connu que les fèves de cacao venant de différentes origines géographiques avec différents génotypes ont des profils caractéristiques de saveur (Kongor *et al.*, 2016). Les quatre principales variétés distinctes présentent des différences dans les formes de cabosses, des profils de saveur et la résistance aux pestes/maladies (Afoakwa *et al.*, 2008, 2010 ; Kongor *et al.*, 2016).

I.2.2.1. Criollo

Les Criollo signifiant «créole» en espagnol, cultivés à l'origine en Amérique centrale, au Mexique et au Venezuela, représentent la variété la plus anciennement exploitée. C'est le groupe majoritairement cultivé (Saltini *et al.*, 2013). Aujourd'hui, on les retrouve également aux Antilles, en Colombie et à Madagascar (Motamayor *et al.*, 2002). Criollo est le cacao le plus recherché et plus cher mais ne représente que 1 à 1,5 % de la production mondiale (Loor, 2007 ; Oro 2011). Ce groupe comprend des variétés produisant des staminodes de couleur rose pâle, des cabosses de couleur verte ou violette et de forme variable s'approchant le plus souvent du Cundeamor (allongée, pointues à l'extrémité inférieure et leur surface est rugueuse) qui à maturité deviennent rouges ou rouge-oranges (Fig. 2 A) ; et renferment des fèves dodues de section presque ronde blanches ou rosâtres du fait de l'absence ou la faible concentration en anthocyanes (Kongor *et al.*, 2016). Un sous-groupe de cette variété est appelé Sanchez et est cultivé particulièrement en République Dominicaine (Saltini *et al.*, 2013). La plante de Criollo est très sensible aux parasites et champignons (Schwan & Wheals, 2004). Parmi les principaux types de Criollo, on peut citer le cacao Pentagona ou Lagarto, le cacao Real et le cacao Porcelana (Mossu, 1990).

I.2.2.2. Forastero

Les Forastero signifiant « étranger » en espagnol, regroupent en fait tous les autres types de cacaoyers « non Criollo ». La plupart sont originaires de la Haute Amazonie et sont naturellement dispersés dans tout le bassin de l'Amazone (Dias *et al.*, 2003). Ce groupe est particulièrement diversifié et renferme des génotypes très résistants aux maladies (Pound, 1945) et beaucoup plus productifs que les Criollo. Il existe de très nombreux cultivars Forastero. Ils constituent le support de la production principale de l'Afrique de l'Ouest et sont aussi cultivés dans le nord de l'Amérique du sud, au Brésil, en Equateur. In extenso, ce groupe représente 75 à 80 % de la production mondiale (Loor, 2007 ; Oro, 2011). Le Forastero est caractérisé par sa résistance aux maladies. Il produit des cabosses arrondies et lisses de couleur verte qui à maturité deviennent jaune et parfois rouge (Fig. 2 B). Ces fèves sont habituellement plates, astringentes et pourpre en couleur due à la présence des anthocyanines (Kongor *et al.*, 2016 ; Saltini *et al.*, 2013). Ils ont également un pH plus élevé après la fermentation et le séchage comparé aux fèves de Criollo. Le chocolat produit avec des fèves de Forastero contient moins d'amertume, moins d'acidité et moins d'astringence

comparées au chocolat produit avec les fèves de Criollo ou de Trinitario (Kongor *et al.*, 2016).

I.2.2.3. Trinitario

Les Trinitario (provenant de l'île de Trinidad) sont des populations hybrides de cacaoyers. Ils sont issus d'un croisement naturel entre les Criollo plantés au 17^{ème} siècle par les colons espagnols à Trinidad et les cacaoyers importés de la Basse Amazonie d'origine Forastero (Pound, 1938, 1945). Ils sont cultivés sur les mêmes terres que le Criollo, et furent rapidement implantés dans les pays d'Amérique Centrale, dans certains pays du nord de l'Amérique du sud (Colombie, Venezuela, Equateur, etc.), ainsi que dans quelques pays d'Afrique et d'Asie du sud-est. Les fèves sont de couleurs variables et cette variété est connue pour avoir un arôme vinicole particulier non trouvé dans les autres variétés (Afoakwa *et al.*, 2008 ; Saltini *et al.*, 2013 ; Kongor *et al.*, 2016). Hybrides naturels très hétérogènes, ils offrent une bonne résistance aux maladies et représentent actuellement environ 20 à 25% de la production mondiale (Loor, 2007 ; Oro, 2011). Les cultivars de Trinitario portent en général le nom des organismes ou centres de recherche où ils ont été sélectionnés : ICS (sélection d'imperial college, Trinidad), UF (sélection de United Fruit, Costa Rica), SNK (sélection de la station Nkoemvone, Cameroun), etc.... (Mossu, 1990) (Fig. 2 C).

I.2.2.4. Nacional

Nacional est un petit cultivar développé en Equateur, avec peu de différences génétiques de Criollo.



Fig. 2. Les variétés du cacao : (A) Criollo, (B) Forastero, (C) Trinitario, (D) Nacional. Source: journal.org/PLOS ONE. (E : 2 cm)

Le nacional a des cabosses de grande taille, vertes, très rugueuses, avec des graines violettes assez grosses (Tixier, 2013) (Fig. 2 D). Le cacao Nacional est considéré comme variété la plus fine produisant de célèbres fèves d'Arriba avec des florales typiques et de saveur épicées (Counet *et al.*, 2004 ; Kongor *et al.*, 2016).

I.2.3. Systématique et taxonomie du cacao

Le cacaoyer est une plante spermatophyte de la division des magnoliophyta qui appartient à la classe des Magnoliopsidae; les résultats de la systématique moléculaire le classe dans l'ordre des Malvales (Whitlock, 2001 ; Silva & Figueira, 2005) (Tableau I).

Tableau I. Position systématique de *Theobroma cacao* L.

Domaine	Biota
Règne	Plantae (plantes)
Sous règne	Viridiaeplantae
Infra règne	Streptophyta (plantes terrestres)
Superdivision	Embryophyta
Superdivision	Spermatophyta (plantes à graines, phanérogames)
Division	Tracheophyta (plantes vasculaires)
Division	Magnoliophyta (plantes à fleurs)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous classe	Magnoliidae
Super -Ordre	Rosanae
Ordre	Malvales
Famille	<i>Malvaceae</i>
Sous -Famille	<i>Byttnerioideae</i>
Tribu	Theobromeae
Genre	Theobroma
Espèce	<i>Theobroma cacao</i> L., 1753

Source : (Silva & Figueira, 2005).

Le genre *Theobroma* comporte 22 espèces (Bartley, 2005) et *Theobroma cacao* (L.) est l'espèce la plus intensivement cultivée (Santos *et al.*, 2012 ; Tixier, 2013). Ces sections appartiennent à trois autres espèces : *Theobroma grandiflorum* (Willd. Spreng) K. Schum;

Theobroma bicolor Humb. et Bonpl. et *Theobroma angustifolium* Mocino et Sessé (Tableau II).

Tableau II. Taxonomie du genre *Theobroma*.

Genre	Espèces
<i>Rhytidocarpus</i>	<i>T. bicolor</i>
<i>Oreanthes</i>	<i>T. sylvestre, T. speciosum, T. velutinum, T. glaucum, T. bernouilli</i>
<i>Theobroma</i>	<i>T. cacao</i>
<i>Telmatocarpus</i>	<i>T. gileri, T. microcarpum</i>
<i>Glossopetalum</i>	<i>T. cirmolinae, T. stipulatum, T. simiarum, T. chocoense, T. angustifolium, T. grandiflorum, T. obovatum, T. sinuosum T. canumanense, T. subincanum, T. hylacum, T. nemorale</i>
<i>Andropetalum</i>	<i>T. mammosum</i>

Source : (Cuatrecasas, 1964).

Cuatrecasas (1964) dans une étude plus exhaustive et utilisant la même méthode que Bernoulli (1869), mais plus détaillée car en plus des caractères de base tels que: la forme du pétale, la position et la forme des staminodes, le nombre d'anthères. Elle prend en compte le type de germination (Hypogea et epigea), la forme et la pubescence des feuilles, le type de pollen et de fruit, conduisant à nommer 22 espèces qui ont été validées et publiées dans le United States National Herbarium vol. 35, en les plaçant en 6 sections: *Andropetalum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Telmatocarpus*, *Theobroma* et *Rythidocarpus* (Tableau II).

I.2.4. Culture du cacao

I. 2.4.1. Ecologie et agronomie du cacao

Les sols sous cacaoyers ont des exigences très prononcées. Le sol doit être profond d'au moins 1,5 m, bien drainé et de préférence argilo-sableux (Koko, 2014). Dans la forêt tropicale, où s'épanouit naturellement le cacaoyer, l'ombrage modéré nécessaire à son développement est procuré par les grands arbres (Crane *et al.*, 2013). Cette condition est assurée en plantant les cacaoyers à l'ombre d'arbres qui les protégeront aussi du vent, de la

pluie et d'une trop grande évaporation. Les conditions de sol des plantations de cacao exigent également qu'il soit poreux, drainé et primordialement très riches en humus, en potassium, en azote, en oligoéléments et d'autres minerais essentiels nécessaires pour leur croissance (Koko *et al.*, 2009 ; Koko, 2014). En effet, le sol devrait être fertile. Le sol doit avoir préférentiellement un pH entre le neutre et légèrement acide, ce qui contrôle soigneusement la prédominance des parasites et des maladies (Fowler, 1999).

Il existe plusieurs méthodes de propagation du cacaoyer : la plantation de fèves, le bouturage, ou le greffage. La fève est prête à germer avant même la maturité du fruit, mais comme elle perd vite son pouvoir germinatif, il faut la semer rapidement après l'avoir extraite de la cabosse. La germination de la graine de *T. cacao* est épigée et a lieu au bout de 4 à 6 jours après le semis dans de bonnes conditions. Dans les 10-15 jours qui suivent la germination, le rachis s'allonge tandis que les cotylédons sortent de la terre (Oro, 2011). Les jeunes plantules sont d'abord cultivées pendant 6 mois en pépinière avant d'être replantées en pleine terre (jusqu'à l'âge de deux ans maximum), au début de la saison des pluies, soit sous couvert forestier aménagé, soit sous des ombrages artificiels, ou encore à l'abri de végétaux plus grands tels que les bananiers ou les cocotiers. La culture, généralement extensive, est intégrée dans des systèmes de productions complexes (Oro, 2011).

Le régime pluviométrique pour la réussite des cacaoyers est estimé entre 1000 et 2000 mm par an avec moins de trois mois de pluies de hauteur inférieure à 100 mm et une température de 18 – 32 °C (Mossu, 1990 ; Koko, 2014). Kebe *et al.* (2009), préviennent que la culture du cacaoyer exige une pluviosité annuelle supérieure à 1200 mm, régulièrement répartie. Leur culture exige les climats qui se trouvent entre les tropiques du Cancer et le Capricorne respectivement. Les plantations de cacao sont appropriées à moins de 20° nord et sud de l'équateur. Mais la ceinture principale est à moins de 10° nord et sud de l'équateur, et au mieux pour le niveau de la mer jusqu'à un maximum d'altitude d'environ 500 m, mais également entre 200 m et 300 m est approprié à la culture de cacao (Crane *et al.*, 2013).

I. 2.4.2. Biologie et physiologie du cacao

T. cacao est une espèce diploïde ($2n = 2x = 20$) qui a un petit génome (0,4 pg/1C) (Lanaud *et al.*, 1992). D'après Demol (2002), les grains de pollen, sphéroïdes, sont de petites dimensions (16 à 23 microns). Leur viabilité est de courte durée et ne dépasse pas 48 heures dans les conditions naturelles (Loor, 2007). L'ovaire renferme une quarantaine d'ovules.

Cependant, toutes les fleurs ne donnent pas de cabosses, la plupart sèchent et meurent. Un cacaoyer produit annuellement plusieurs milliers de fleurs et régule naturellement sa production. En effet, moins de 1 % des fleurs produites arrivent à maturité et deviendront des cabosses. La pollinisation est entomophile (Paulin & Eskes, 1995). Elle est assurée par de petits moucheron parmi lesquels plusieurs espèces du genre *Forcipomya* ont été identifiées (Posnette, 1950 ; Young, 1985). La structure de la fleur rend difficile la mise en contact du pollen avec le style ou les stigmates, à cause de la position des anthères et la présence de la barrière que constitue la couronne de staminodes stériles (Loor, 2007). Les grains de pollen, par suite de leur viscosité élevée, restent groupés en masses plus ou moins importantes, difficilement transportables par le vent. Le cacaoyer commence à fleurir entre deux et cinq ans ; l'intensité de la floraison est influencée par l'origine génétique de l'arbre (Mossu *et al.*, 1981 ; Paulin *et al.*, 1983). Dans les conditions favorables, les fèves germent au bout de 15 jours. La croissance verticale cesse généralement dès l'apparition des premières ramifications (Wood & Lass, 2001). Le cacaoyer atteint 25 m de hauteur à l'état sauvage (Lachenaud *et al.*, 2007).

Les cacaoyers sont des arbres à feuilles persistantes caractérisées par une grande taille et une forme simple, lancéolée ou oblongue selon le génotype, pointue et penninerve. L'implantation des feuilles se fait selon une phyllotaxie distique sur les axes plagiotropes et rayonnante sur l'axe orthotrope (Charrier, 1969). Les feuilles juvéniles du cacaoyer sont molles et tendres avec une coloration variant du vert très clair à diverses tonalités de rouge selon le génotype et la quantité d'anthocyanes qu'elles contiennent, cependant elles deviennent vertes à l'état adulte (Vera, 1987). Le cacaoyer est cauliflore, les inflorescences apparaissent sur des coussinets floraux, qui sont des renflements du tronc ou des branches (Swanson *et al.*, 2008).

Les premières fleurs se développent et apparaissent tout au long de l'année, par périodes successives et pendant toute la vie de la plante (Aneja *et al.*, 1999). Les fleurs de petite taille sont hermaphrodites, régulières, pentamères formées de cinq sépales, cinq pétales et cinq étamines alternant avec cinq staminodes (Fig. 3 A). Les pétales sont composés de deux parties distinctes, la cuculle attachée au réceptacle floral et la ligule. Les anthères sont recouvertes par les cuculles et produisent des pollens dont la durée de vie n'excède pas 48 heures (Paulin, 1994). Ces fleurs sont à ovaire supère comptant 30 à 60 ovules. L'arbre peut produire annuellement jusqu'à 100 000 fleurs et seulement environ 1/500 donnera des fruits. Les fleurs ne produisant pas de nectar ni d'arôme pour attirer d'autres insectes, la

transmission de ce pollen épais ne peut se faire que par l'intermédiaire de moucheron. Ce pollen est incompatible pour le pistil de la même fleur, des fleurs du même arbre ou des autres arbres de la plantation. Ce phénomène est qualifié d'auto-incompatibilité (Royaert *et al.*, 2011).

Le fruit de cacaoyer est une baie indéhiscente de forme fusiforme appelée chérelle (Fig. 3 B) au jeune âge et cabosse à l'âge adulte (Fig. 3 C). Ce fruit reste attaché à l'arbre par son pédoncule fortement lignifié. Une cabosse ouverte présente une placentation axillaire avec des graines disposées en cinq rangées, entourées d'une pulpe mucilagineuse. Le péricarpe est constitué de l'extérieur vers l'intérieur de l'épicarpe, du mésocarpe et de l'endocarpe. On dénombre 30 à 60 graines par cabosse (Santos *et al.*, 2012). Les graines entourées d'une pulpe mucilagineuse sont reliées au placenta par des funicules (Fig. 3 E).



Fig. 3. Plants de cacaoyers et ses composants. (A) fleur et boutons floraux, (B) feuilles et chérelle, (C) cabosses de cacao immatures (vertes) et matures (jaunes), (D) coupe horizontale de cacao, (E) graines de cacao avec pulpe, (F) graines de cacao sans pulpe. (E : 0.5 cm) (Photo crédit, Tchouatcheu, 2016)

Les fèves sont des galles exalbuminées constituées de deux éléments :

- l'enveloppe, que l'on appelle coque ou tégument, est mince mais résistante, coriace, rosée, très nervurée ; elle contient l'amande. Le tégument est riche en tanins ;
- l'amande est elle-même formée de deux parties : l'albumen et deux cotylédons. La fine couche d'albumen, muqueux, recouvre et pénètre dans les replis des deux cotylédons. Les

deux gros cotylédons plan-convexes, inégalement plissés, charnus et riches en corps gras, entourent le petit embryon violet. Ceux-ci sont formés de trois couches cellulaires : une couche de cellules épidermiques, une couche de cellules parenchymateuses de réserve particulièrement riches en triglycérides, glycérides, acides aminés, enzymes et amidon, et une couche de cellules pigmentées responsables de la coloration des cotylédons ; du blanc des Criollo au violet foncé des Forastero, on passe par des teintes intermédiaires pour les Trinitario. Elles reçoivent les assimilats grâce aux faisceaux vasculaires du funicule et des tissus du hile (Vinogradova & Falaleev, 2012) (Fig. 3).

I.2.5. Contraintes de la cacaoculture

I.2.5.1. Maladies du cacao en champ

Tous les organes du cacaoyer, les tiges, les feuilles, les coussinets floraux, les fruits et les racines, peuvent être affectés par des champignons pathogènes. Plusieurs affections virales ont aussi été répertoriées. Les cinq maladies qui provoquent les dégâts les plus importants sont : la pourriture brune des cabosses et les chancres de l'écorce dus aux *Phytophthora*, le balai de sorcière, la moniliose, le gonflement des tiges (CSSV), et le *Vascular Streak Dieback* (VSD) (Pontillon, 1998).

Les maladies les plus fréquentes sont provoquées par des Oomycètes du genre *Phytophthora* (*P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici* et *P. citrophthora*), répandus dans le monde entier et provoquant d'importantes pertes, essentiellement en Afrique. Cependant, l'espèce la plus répandue est *Phytophthora palmivora*. Elle cause des dégâts directs dans le mésocarpe, mais aussi indirecte au niveau des jeunes feuilles, des fleurs, des racines et du tronc sur lequel il provoque des chancres (Thevenin *et al.*, 2012). PPR (*Phytophthora Pod Rot*) est provoqué par *Phytophthora* de deux espèces *P. palmivora* et *P. megakaria*. Au Ghana, en Côte d'Ivoire et surtout au Cameroun, ces agents pathogènes causent des pertes de cabosse en moyenne de 40 % (Opoku *et al.*, 2000 ; Wessel & Quist-Wessel, 2015). Cependant, en raison des coûts élevés des fongicides, beaucoup de fermiers ne peuvent pas adopter cette solution (Mpika *et al.*, 2011 ; Wessel & Quist-Wessel, 2015) (Fig. 4 A).

D'autres fléaux sévissent comme le «Vascular Streak Dieback» (VSD), maladie provoquée par le champignon *Oncobasidium theobromae* dans l'Asie du sud et sud-est et une partie de l'Extrême-Orient, il est marqué par le dépérissement avec nécrose vasculaire (Samuels *et al.*, 2012).

Le virus du gonflement des tiges du cacaoyer (cacao swollen shoot virus ou CSSV), transmis par des cochenilles, touche essentiellement l'Afrique, En Amérique du Sud, le Panama et les Caraïbes, et notamment en Équateur (Fig. 4 B). Ce sont la moniliose et la maladie du «balai de sorcière» qui constituent les atteintes les plus dévastatrices. Les champignons responsables de ces maladies sont, *Moniliophthora roreri* (moniliose) qui atteint les fruits et *Moniliophthora perniciosa* (maladie du «balai de sorcière») qui entraîne la mort de jeunes plants, des déformations graves des rameaux et de fortes pertes de production (Evans *et al.*, 2013 ; Anonyme 2, 2015) (Fig. 3 D). L'effet le plus évident a été vu au Brésil, l'introduction de la maladie dans la région du Bahia a causé une diminution de la production de presque 70 % pendant une période de 10 ans (Anonyme 2, 2015). Un des facteurs cruciaux pour la reproduction de *M. perniciosa* est l'eau. Les basidiospores sont libérées pendant la nuit avec un niveau d'humidité de 80 % et la température ambiante entre 20 ° et 30 °C (Evans, 2016 ; Anonyme 3, 2015).

I.2.5.2. Insectes et ravageurs du cacao en champ

A chaque fois que *T. cacao* a été introduit dans une région nouvelle, il a rencontré des insectes capables de l'attaquer. Ils peuvent être défoliateurs, foreurs des rameaux et des tiges, piqueurs ou suceurs des branchettes ou des cabosses, ou encore rongeurs des racines (Wielgoss *et al.*, 2012). Les deux ravageurs du cacaoyer les plus importants à l'échelle mondiale sont les mirides et le foreur des cabosses (Fig. 4 C). Les criquets, les cochenilles et surtout les punaises s'attaquent aux feuilles. Par ailleurs, le cacaoyer est la cible de plusieurs insectes nuisibles parmi lesquels se trouvent : les perforateurs du tronc (*Xyleborus ferrugineus*), les acares (*Floracarus theobromae* Keiffer), les thrips (*Selanothrips rubrocintus*), et les perforateurs de fruits (*Carmenta theobromae*, *Anadasmus porinodes*, *Gymnandrosoma aurantium* et *Synanthedon* sp.). Les principaux insectes ravageurs du cacaoyer en Afrique sont des punaises des genres *Sahlbergella*, *Distantiella*, *Helopeltis* et *Menalonion* (*Heteroptera: Miridae*), dont les larves piquent les branches, pouvant entraîner la mort de l'arbre (Wessel & Quist-Wessel, 2015). A l'état adulte, ces insectes provoquent même de fortes pertes en s'attaquant directement aux fruits. Dans le sud-est de l'Asie, les pertes de récolte dues au «cacao pod borer», dont l'agent responsable est *Conopomorpha cramerella* (*Lepidoptera: Lithocolletidae*), peuvent atteindre 80 % de la production. *Conopomorpha cramerella* est un insecte foreur des cabosses (Wielgoss *et al.*, 2012). Les

pentatomes, les cicadelles et les thrips sont également des insectes nuisibles du cacaoyer. Les cochenilles sont des vecteurs de virus de l'œdème de pousse (Muller *et al.*, 2001)..

Les larves des pyralidés s'attaquent aux cabosses. Les plantes parasites, tel que le gui (Eskes & Lanaud, 1997), sont responsables de la baisse de la production des cacaoyers.



Fig. 4. Quelques affections du cacao; (A) cabosse infestée par: *Phytophthora megakarya*, (B) swollen shoot, (C) attaque des mirides sur une cabosse, (D) balai de sorcière. (E :0.5 cm) (Loor, 2007; Oro, 2011).

I.2.6. Economie de la cacaoculture Camerounaise

I.2.6.1. Macro-économie

Sous les tropiques, les cultures pérennes comme le cacao sont régulièrement pratiquées en plantation paysannes (Ruf, 1995 ; Endamana *et al.*, 2001). Elles jouent un rôle important dans l'économie des pays du bassin du Congo et, sont l'une des principales sources de revenus monétaires pour les paysans de la zone forestière du Sud Cameroun et occupe au moins 60% des superficies cultivées (Sonwa *et al.*, 2000). Le cacao, l'une des principales denrées tropicales n'a pas échappé à cette crise des cours mondiaux. Le marché étant stratégique pour la plupart des pays producteurs car, à la différence de nombreuses autres denrées tropicales, ce produit est essentiellement exporté, et par là une source de devises et taxes importantes. La crise des coûts du cacao a ainsi entraîné une baisse considérable des exportations, affectant directement des plans entiers du monde rural, et a compromis l'équilibre du budget de l'Etat (Gockowski & Dury, 1999). En plus, l'on continue de noter aussi des faiblesses dans le circuit de commercialisation des produits. Pareil au niveau de la proportion de cacao transformé au Cameroun qui stagne à 15 % tandis qu'elle est de 25 % au Ghana, 43 % en Côte d'Ivoire et de 100 % en Indonésie (Anonyme 1, 2018).

Le ministère en charge de l'Agriculture (Minader) se félicite des performances de son secteur en 2017. Selon cette administration, la contribution de l'agriculture à la croissance économique du Cameroun a été de 76,38% en 2017 (Anonyme 1, 2018). Le produit intérieur brut (PIB) est l'indicateur le plus retenu pour évaluer l'ensemble de la production des biens et des services d'un pays pendant une année. Il indique l'ampleur de l'activité économique. A cet effet, l'analyse des résultats du quatrième trimestre de 2018 montre une amélioration de l'activité économique, traduite par une croissance du PIB de 4,5 % par rapport au trimestre correspondant en 2017. Dans ce sens, un accent a été mis sur l'appui à la promotion de la mécanisation agricole et des équipements dans les filières stratégiques : cacao, café, coton, caoutchouc, riz, banane, manioc, etc. Tout cela a permis d'accroître la production, par exemple la production du cacao qui a connu un taux d'accroissement de 9% en 2016 (Anonyme 1, 2018). Les complexes agroindustriels représentent 10 % de la production agricole nationale (Folefack, 2003). Cette agriculture nourrit largement la population du Cameroun. En valeur, les exportations des agrumes et bois viennent en tête, suivies du cacao, du café, du coton et de la banane. Et selon le bilan fait par le Ministère du Commerce (Mincommerce), on a enregistré un accroissement de la production nationale (Anonyme 5, 2018). La production commercialisée est en effet passée de 231 642 tonnes lors la saison 2016-2017 à 253 510 tonnes lors de la campagne qui s'achève, soit une augmentation de 21 868 tonnes. La relance de la filière se voit aussi sur la qualité des produits (fèves). Les quantités de fèves exportées en Grade I ont progressé. Elles sont passées entre les campagnes 2016-2017 et 2017-2018 de 1 099 à 8 933 tonnes (Anonyme 3, 2018). On observe par ailleurs une meilleure valorisation locale de la fève camerounaise. Les volumes transformés par l'industrie locale sont passés de 33 023 à 53 403 tonnes entre les deux dernières campagnes.

I.2.6.2. Micro-économie

L'observation de la structure du marché, montre au niveau de la filière cacao, l'existence d'une multitude d'acheteurs. Parmi ces acheteurs, ceux du secteur privé dominent le marché. L'état du Cameroun a renforcé des initiatives et le dynamisme des producteurs par l'appui aux organisations de producteurs leur permettant, d'une part, d'exercer un véritable pouvoir de négociation, et d'autre part, de participer à l'élaboration des politiques agricoles, par la formation et l'information.

Cependant, la cacaoculture se heurte à plusieurs difficultés qui participent à faire mauvaise presse à ce secteur d'activité. En effet, la baisse du prix du kilogramme qui

concourt à démotiver des potentiels nouveaux producteurs et la migration vers d'autres cultures. La production de cacao avait chuté de près de 38 000 tonnes entre la saison 2015-2016 et celle de 2016-2017, ceci à cause de la contrebande qui a favorisé la chute des cours de près de 40 % (Anonyme 1, 2018). Les inadéquations entre les standards de prix fixés par les acquéreurs qui définissent les normes de la qualité de plus en plus strictes et rigoureuses aux détriments des producteurs, principaux acteurs dans les processus de production et de traitement post-récolte du cacao. La faiblesse de la productivité et de la compétitivité (qualité) des produits est souvent due aux difficultés techniques d'accès aux intrants et aux services agricoles depuis la dévaluation du FCFA (franc des colonies françaises d'Afrique) comparativement au revenu des planteurs. De même, qu'au vieillissement des planteurs et des plantations (Anonyme 1, 2018).

En plus, l'insuffisance des traitements phytosanitaires et les mauvaises conditions de stockage relevées chez certains planteurs sont de nature à favoriser l'altération de la qualité du produit

La qualité du cacao dépend de plusieurs facteurs et les pouvoirs publics s'attèlent déjà à améliorer par toute une série d'interventions. Cela, par un service minimum de vulgarisation (encadrement) auprès des agriculteurs, des acheteurs et des négociants des techniques de manipulation post récolte. Par ailleurs, ils ont amélioré l'approvisionnement en intrants tant pour accroître les quantités que pour améliorer la qualité. Cependant, des mesures doivent être prises en compte pour assurer le pré contrôle de qualité avant l'achat du produit par les acheteurs.

I.2.7. Traitements post-récolte du cacao

Le traitement post-récolte permet l'expression du potentiel aromatique du cacao, lequel est déterminé par le génotype (Cros, 1995). La conduite des différentes étapes du traitement post-récolte doit être bien menée en vue de l'obtention d'un produit marchand qui obéit aux normes de qualité. Les étapes du traitement post-récolte sont : l'écabossage, la fermentation, le séchage, le conditionnement et le stockage. La qualité commerciale du cacao dépend surtout de la maîtrise de deux opérations cruciales que sont la fermentation et le séchage.

I.2.7.1. Ecabossage des cabosses de cacao

L'écabossage des cabosses commence après la récolte. La récolte est une opération délicate toujours effectuée manuellement. On prélève les cabosses en coupant le pédoncule à l'aide de machettes pour les cabosses les plus basses ou à l'aide d'élagueurs aux bords très tranchants, montés sur une longue perche de bambou, pour les fruits en hauteur des arbres. La cueillette a lieu exactement à maturité (Arvy & Gallouin, 2003). En effet, une récolte tardive entraîne des risques de pourriture et de germination des graines et une récolte précoce diminue le rendement ; les graines immatures, mélangées aux graines mûres, donnent à la récolte une saveur désagréable diminuant sa valeur marchande (Perrier, 2002). La maturité s'apprécie à la couleur des cabosses. Selon le climat du pays producteur, la récolte se fait deux fois par an ou toute l'année. Elle se fait toute l'année dans les régions très humides, avec une récolte abondante de mai à décembre (Paris & Moyse, 1981). Les cabosses sont alors cueillies à intervalles réguliers de 10 à 15 jours, 3 semaines au maximum. En revanche, dans d'autres régions du monde, elle a lieu deux fois par an. La récolte principale s'étale d'août à décembre en Afrique de l'Ouest et centrale (Pontillon, 1998).

Les études ont montré comment le stockage de cabosse diminue les acides non-volatiles et les polyphénols des composés, particulièrement -(-)epicatechin et (+)-catechin, avec une réduction générale d'amertume et d'astringence dans le cacao (Kongor *et al.*, 2016 ; Shwan & Wheals, 2004). Toutefois, le stockage de cabosses ne donne pas seulement un effet bénéfique ; en fait, un stockage prolongé augmente la moule de contamination de manière significative. Ainsi, le stockage de cabosse est utile seulement dans certaines conditions et seulement s'il est bien contrôlé. La période de récolte, le temps de stockage, le degré de maturation et la séparation entre les cabosses saines et infectées affectent les résultats finaux (De Vuyst & Weckx, 2016 ; Saltini *et al.*, 2013). Le stockage de cabosse réduit la teneur en sucre et par conséquent la quantité d'éthanol et d'acide acétique formés pendant la fermentation, en outre il augmente le pH dans les fèves fermentées de cacao (Saltini *et al.*, 2013). Il permet en particulier une diminution de l'acidité des fèves et une montée plus rapide de la température au cours de la fermentation.

Le traitement après la récolte des fèves de cacao commence par l'ouverture des fruits, habituellement avec un outil de coupe, tel qu'une machette (Lima *et al.*, 2011). Les cabosses sont ouvertes afin d'en extraire les fèves de cacao : c'est l'écabossage. L'utilisation d'un gourdin pour éclater le cortex est bien préférable. Les fèves, entourées de leur pulpe blanche

mucilagineuse, sont extraites avec les doigts (Hulin, 2001). Par la suite, le rachis, les fèves noires et les débris de cabosse doivent être éliminés (Hulin, 2001). La pulpe et les fèves dans les cabosses saines mûres sont censées être microbiologiquement stériles (De Vuyst & Weckx, 2016). Quand la masse de pulpe des fèves de cacao est enlevée de l'intérieur des cabosses par la main, elles deviennent immédiatement inoculées avec différents types de micro-organismes venant de l'environnement. Beaucoup constituent l'inoculum sauvage initial de démarreur, qui contribuent à la fermentation spontanée suivante de la masse de fèves (De Vuyst & Weckx, 2016 ; Schwan & Wheals, 2004).

I.2.7.2. Fermentation des fèves de cacao

La fermentation est l'étape primordiale du traitement post-récolte du cacao. Encore empirique, elle a une grande importance pour le développement ultérieur de l'arôme et pour la qualité du cacao (McFadden & France, 1999). Pour cette raison la masse de pulpe des fèves fraîches de cacao subit une fermentation normale pour obtenir un cacao et un chocolat savoureux (McFadden & France, 1999). Pour comprendre l'origine des marqueurs biochimiques obtenus après fermentation, il est nécessaire de parler de la composition de la pulpe du cacao, des techniques de fermentation des fèves, du déroulement proprement dit de la fermentation, du séchage des fèves et du stockage avant le transport pour les industries.

I.2.7.2.1. Composition de la pulpe de cacao

La pulpe de cacao contient entre 82 et 87 % d'eau, 10 à 15 % de sucres (60 % de saccharose et 39 % du mélange de glucose et fructose), 1 à 1,5 % de pectine et 1 à 3 % d'acide citrique. Les protéines, les acides aminés, les vitamines (principalement la vitamine C), et les sels minéraux constituent également la pulpe issue de la cabosse mûre (Schwan & Wheals, 2004). La composition chimique de la pulpe et de la fève évolue drastiquement au cours de la transformation du cacao et notamment lors de la fermentation (Jannel-Oudot & Misler, 1997). Au cours de la fermentation, la pulpe visqueuse disparaît autour des fèves, d'ailleurs la fermentation contribue au changement de couleur et de saveur des fèves tout en réduisant l'amertume et l'astringence (Jannel-Oudot & Misler, 1997).

I.2.7.2.2. Techniques de fermentation des fèves de cacao

Suivant les régions et l'importance des plantations, plusieurs techniques sont utilisées (Perrier, 2002). Le plus souvent, les fèves fraîches et les pulpes sont mises à fermenter en tas coniques à même le sol ou sur des feuilles de bananier disposées à cet effet (De Vuyst &

Weckx, 2016). Quand la fermentation est effectuée en utilisant la méthode en tas, au début du processus la température augmente plus rapidement que celle réalisée dans les caisses en bois, c'est probablement la raison pour laquelle moins de fèves pourpres sont trouvées à la fin de cette fermentation, précisant une meilleure homogénéité du processus (Saltini *et al.*, 2013). On peut aussi effectuer la fermentation dans des caisses de bois ou de ciment à fond perforé (fermentoirs), voire dans des paniers (Fig. 5 B). L'ensemble est recouvert de feuilles de bananiers ou de sacs. Les fèves ne doivent pas être enfermées dans des récipients étanches : les jus doivent pouvoir s'écouler librement (Perrier, 2002). Les fèves doivent être aérées de temps à autre par brassage ce qui permet d'obtenir une fermentation homogène et d'apporter l'oxygène nécessaire à la fermentation acétique (Delattre, 1995 ; Saltini *et al.*, 2013). L'oxygène apporté en remuant la masse en fermentation permet le développement de nouvelles bactéries suivit de la fermentation acétique (Delattre, 1995 ; Saltini *et al.*, 2013).

1.2.7.2.3. Déroulement de la fermentation des fèves de cacao

Lors de la fermentation en condition idoine, l'acétobacter oxyde l'éthanol (produit par des levures dans la toute première partie du procédé de fermentation) en acide lactique (produits par bactéries acides lactiques) et en acide acétique, ou en acide acétique et en acétoïne (produit intermédiaire de la fermentation butanediolique synthétisé par décarboxylation de l'acétoacétate puis réduit en 2,3-butanediol) quand la fermentation est prolongée. La suite de ce processus transforme l'acide acétique en dioxyde de carbone et en eau (Moens *et al.*, 2014 ; De Roos & De Vuyst, 2018). La quantité d'acide acétique diminue vers la fin de la fermentation, suite à son évaporation due à l'élévation de température du milieu. Ces acides détruisent la paroi de pectine qui recouvre les fèves, celles-ci deviennent perméables, et permettent aux métabolites produits par les micro-organismes de s'infiltrer dans les cotylédons (Moreira *et al.*, 2013). Ces derniers amorcent la dégradation des protéines contenues dans ces fèves en acides aminés et en peptides, précurseurs des arômes du cacao (Lopez *et al.*, 1978). Plusieurs molécules sont produites pendant la fermentation en raison de la dégradation biochimique des sucres présents dans la pulpe de cacao. Parmi ces composés, l'acide propanoïque, l'acide 2-méthylpropanoïque, l'acide 3-méthylbutanoïque et l'acide acétique améliorent les composés odeur-actifs (Kongor *et al.*, 2016). Ces réactions biochimiques détruisent environ deux tiers des polyphénols des fèves, molécules responsables de leur astringence et, entraîne la condensation des tanins responsable de la couleur brune, caractéristique des fèves de cacao bien fermentées (Afoakwa, 2010 ; Kongor *et al.*, 2016 ; Saltini *et al.*, 2013).

L'ensemble du procédé de fermentation montre un intervalle d'augmentation de température de 25 - 30 °C à 45 - 50 °C en raison des réactions exothermiques se produisant en présence des levures, pendant la phase LAB (bactéries acides lactiques) et la phase AAB (bactéries acides acétiques), ayant pour but la dégradation des populations de microorganismes à la fin de la fermentation (Schwan & Wheals, 2004). La température du milieu conduit au cours du temps, à la mise en place d'un environnement propice au développement ou à l'inhibition de microorganismes impliqués dans le processus fermentaire du cacao (Schwan *et al.*, 1995 ; Schwan & Wheals, 2004) ; Il s'en suit une succession microbienne qui conduit au développement des précurseurs spécifiques de l'arôme chocolat (Schwan *et al.*, 1995 ; Schwan & Wheals, 2004).

La durée de la fermentation (3 à 4 jours) et les pratiques appliquées par le planteur varient suivant les pays, les variétés de cacao utilisées (Pontillon, 1998). Ainsi, les cacaos de type fins (Criollo, Nacional) ont une durée de fermentation de l'ordre de 3 jours tandis que, celle des cacaos de type courant est de 5 jours et plus (Pontillon, 1998 ; Atlas, 2001). Le moment opportun pour arrêter la fermentation dépend de critères subjectifs : gonflement des fèves, odeur de la masse, couleur des cotylédons, chute de la température, ce qui demande de l'expérience et de la routine (Pontillon, 1998). Au-delà d'une semaine, la fermentation doit être interrompue par séchage afin d'éviter le développement de bactéries nuisibles comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas* ou *Enterobacter* et la formation d'amines dont l'odeur putride imprégnerait définitivement les fèves. Après la fermentation, les fèves contiennent encore 55 à 60 % d'eau, teneur qui doit être inférieure à 6 – 8 % pour la conservation (Kongor *et al.*, 2016 ; Saltini *et al.*, 2013).



Fig. 5. Fermentation : (A) stockage des cabosses, (B) fèves introduit dans le panier, (C) fermentation des fèves. (E : 0.5 cm) (Abega, 2017).

La fermentation a pour but de dévitaliser l'embryon (pour empêcher la fève de germer), de la débarrasser de la pulpe mucilagineuse, et de provoquer des modifications biochimiques au sein des cotylédons (gonflement, disparition de la couleur initiale remplacée par la couleur brune, développement des précurseurs d'arôme, diminution de l'astringence et de l'amertume pour les amener à un niveau agréable).

Selon (Barel, 1995), la durée de la fermentation détermine la couleur et la qualité finale des fèves. De façon générale, en absence de fermentation, on obtient les fèves ardoisées. Cependant, une fermentation trop courte donne les fèves violettes et une trop longue fermentation donne des fèves pourries (Fig.6).

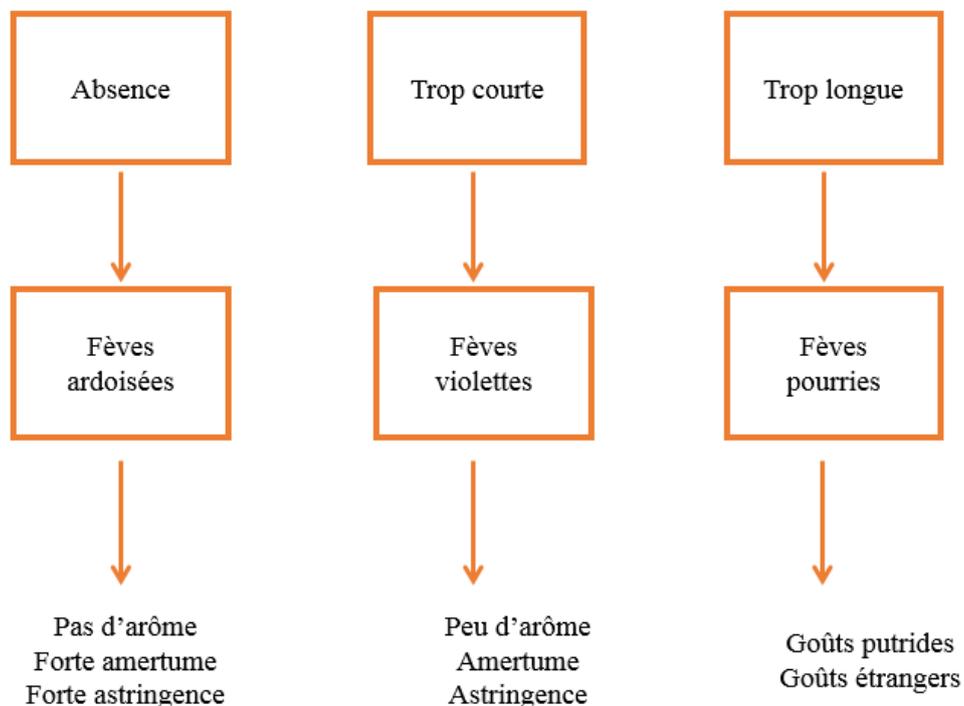


Fig. 6. Défauts de fermentation sur les fèves de cacao (Barel, 1995).

I.2.7.3. Séchage des fèves de cacao issues de la fermentation

Après la fermentation vient le séchage. Le taux d'humidité pendant ce processus est crucial pour la qualité finale des fèves de cacao. D'une part, si le processus de séchage est trop rapide, les fèves de cacao tendent à maintenir une quantité excessive d'acide, y compris l'acide acétique, avec effets délétères en termes de saveur (Saltini *et al.*, 2013). D'autre part, si le processus de séchage est trop lent elle aura comme conséquence un faible taux d'acidité, la couleur pâle et la présence élevée des moules (Kongor *et al.*, 2016 ; Saltini *et al.*, 2013). Le

séchage des fèves permet l'arrêt de la fermentation, la diminution de leur humidité et l'élimination de l'acide acétique (Kongor *et al.*, 2016).

On observe de nombreuses techniques de séchage solaire : le séchage sur natte, le séchoir à toit mobile, le séchoir basculant. Une grande partie des fèves de cacao produites dans le monde est séchée au soleil, en couche mince (3 à 4 centimètres) sur des aires cimentées ou des claies de séchage (Perrier, 2002). L'utilisation de bâches en plastique posées sur le sol peut être une bonne solution quand les installations n'existent pas ou sont insuffisantes (Perrier, 2002). Quel que soit la technique utilisée, un remuage périodique permet d'homogénéiser la couche et de donner à toutes les fèves le même gradient de séchage (Perrier, 2002). On apprécie la siccité du produit fini par le toucher et, surtout, par le son des fèves agitées dans la main (Perrier, 2002). Le séchage solaire, progressif, sans dépense énergétique, permet la poursuite des réactions biochimiques pendant les premiers jours et conduit à des cacaos de bonne qualité et de faible acidité volatile (Perrier, 2002). De plus, les UV du rayonnement solaire provoquent une certaine stérilisation de la coque des fèves, assurant une protection contre les moisissures. Cette méthode présente cependant des inconvénients : elle est lente (7 à 15 jours), elle nécessite des surfaces importantes (1 m² pour 20 kg de fèves fermentées) et de la main d'œuvre pour brasser les fèves plusieurs fois par jour, pour les couvrir la nuit et en cas de pluies.

Le séchage artificiel, est beaucoup plus rapide que le séchage solaire et dure en général un à deux jours suivant le taux initial d'humidité. Il utilise des tables de séchage en tôle perforée, rectangulaires ou circulaires, sur lesquelles les fèves sont disposées en couche épaisse (30 à 50 centimètres) (Arvy & Gallouin, 2003). Un ventilateur souffle de l'air chauffé par des feux de bois à travers le lit de graines et généralement des systèmes mécaniques assurent le brassage régulier des fèves (Arvy & Gallouin, 2003). Dans le cas d'un séchage rapide, de type artificiel à air chaud, des problèmes apparaissent pour extraire l'acide acétique de la graine ce qui peut conduire à un cacao à goût acide. Un autre défaut vient de l'utilisation de feux de bois dont la fumée est en contact avec les fèves (Fowler, 1995). Ceci entraîne l'apparition de goûts et d'odeurs de fumée très désagréables (Fowler, 1995).

I.2.7.4. Stockage après séchage et transport

Les fèves sèches sont habituellement stockées dans des sacs à la ferme avant d'être vendues sur le marché. Les spores fongiques présentes à la fin de la période de séchage

restent viables pendant de longues périodes, de sorte que les bonnes conditions de stockage soient cruciales pour maintenir la qualité des fèves et d'éviter la propagation de la contamination (Fig. 7). Si les fèves de cacao sont stockées dans un endroit impropre, le taux d'humidité élevé peut favoriser le développement des moisissures, fournissant des conditions favorables pour la germination de spores, la croissance fongique et la détérioration de la qualité des fèves (Copetti *et al.*, 2014). Des sacs à jute sont remplis de fèves sèches de cacao aux poids appropriés, placés dans des récipients et puis transportés par bateaux aux pays consommateurs.

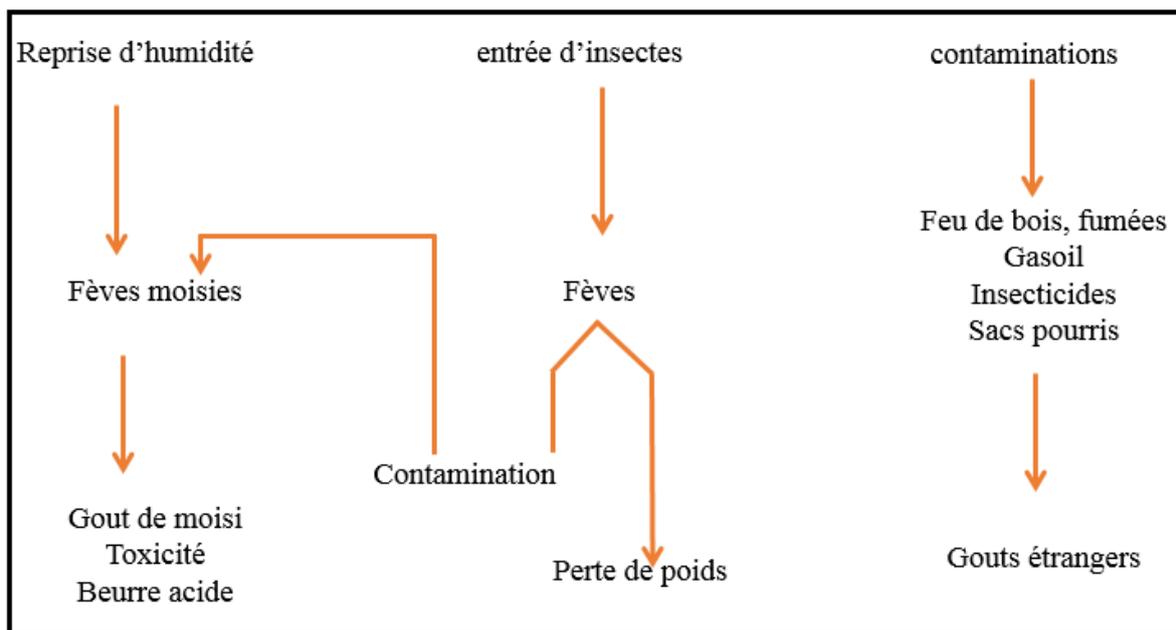


Fig. 7. Défauts de cacao dus à un stockage inadéquat (Barel, 1995).

I.2.8. Composition des marqueurs biochimiques de cacao

La graine est constituée de cotylédons. Dans les vacuoles des cellules des cotylédons, on trouve du beurre de cacao formant un film lipidique (50 %), des substances de réserves hydrosolubles (sucres complexes et protéines), des substances polyphénoliques. Au cours de la fermentation, l'acide acétique pénètre dans la graine et l'acidification des cellules entraîne la destruction du film lipidique, la formation de globules lipidiques rendant les composés hydrosolubles accessibles aux enzymes, ce qui permet l'obtention des acides aminés par les protéines ; des glucides simples par les complexes (amidon et diholosides).

I.2.8.1. Polyphénols de cacao

Les propriétés des polyphénols ont de tout temps vivement intéressé les industries du secteur alimentaire, responsables du brunissement, impliqués dans les sensations d'amertume, d'astringence, d'arômes ou de couleurs. D'où la présentation générale des composés phénoliques ou polyphénols puis les voies de synthèse et sa classification.

I.2.8.1.1. Généralités

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Boizot & Charpentier, 2006). Les polyphénols sont des familles de substances chimiques largement distribués dans les végétaux. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (Boizot & Charpentier, 2006).

La famille des polyphénols comporte près de 8 000 molécules organiques issues d'un métabolisme secondaire complexe (Stalikas, 2007 ; Bravo, 2008). Les composés phénoliques ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl. Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignines et les xanthones (Stalikas, 2007).

Forsyth (1955), a rapporté que la fève de cacao contient quatre types de catéchines, dont (-) – l'épicatéchine constitue environ 92 %. Brennetta Adam *et al.* (1928), ont indiqué que la fève de cacao non fermentée contient à la fois du tanin et de la catéchine. A côté de ces composés, on a découvert que le cacao avait des leucoanthocyanines présentes sous forme de glycosides. De même, il a été observé que les fèves de cacao contiennent deux cyanidines glycosides et au moins trois composés de leucocyanidines (procyanidine) (Forsyth, 1955). Les leucocyanidines constituent environ 60 % des polyphénols totaux dans le cotylédon de cacao frais (Forsyth & Quesnel, 1963). Quesnel (1968), a trouvé que la fève de cacao contenait de la leucocyanidine et de l'épicatéchine dimères simples. L'épicatéchine et les

leucocyanidines simples 1, 2 et 3 (L1, L2 et L3) sont présentes dans les fèves de cacao, telles qu'identifiées par chromatographie bidimensionnelle sur papier (Jalil & Ismail, 2008). De plus, la cyanidine est également présente sous forme de cyanidine-arabinoside et de cyanidine-galactoside. La fraction anthocyane se compose essentiellement de cyanidine-3-arabinoside et cyanidine-3-galactoside (Belitz *et al.*, 2009). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins. Ils ne sont pas directement impliqués dans un processus métabolique quelconque et sont de ce fait considérés comme des métabolites secondaires (Ivory, 2000 ; Niemenak *et al.*, 2006). On les classe parmi les antioxydants naturels vu qu'ils permettent de diminuer la formation des radicaux libres. Les polyphénols dans des fèves de cacao subissent la réaction d'oxydation qui est non enzymatique et enzymatique par l'action de l'oxydase de polyphénol. Hansen *et al.* (1998), ont rapporté que cette enzyme est strictement inactivée pendant le premier jour de la fermentation. Forsyth (1952), a rapporté que la perte de polyphénols est provoquée par diffusion dans les sweatings de fermentation et confirmée par les études microscopiques effectuées par De Brito *et al.* (2000).

I.2.8.1.2. Voies de synthèse et classification des polyphénols

Les polyphénols dérivent de deux voies principales de synthèse primaire : la voie de l'acétate / malonate et celle du shikimate; toutes deux provenant du métabolisme du glucose (Chaouche, 2014). La voie de l'acétate : l'acide acétique sous sa forme active, l'acétyl-CoA, est le point de départ de la synthèse des lipides dans le métabolisme primaire mais également celui de la synthèse du cycle A des flavonoïdes dans le métabolisme secondaire (Chaouche, 2014). Quant à la voie du shikimate, le métabolisme primaire permet la synthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine), cependant leur dégradation conduit à la voie secondaire qui permet la synthèse des phénylpropanoïdes qui sont à l'origine d'une série de composés phénoliques présents dans les plantes comme les flavonoïdes et les stilbènes (Wollgast & Anklam, 2000 ; Crozier *et al.*, 2006).

I.2.8.1.2.1. Origine biogénétique des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (Ghedira, 2005). Les précurseurs de la plupart des flavonoïdes sont le malonyl-CoA et le p - coumaroyl-CoA, dérivant respectivement de la voie métabolique des carbohydrates et des phénylpropanoïdes. Les acides propanoïques (acides en

C9) sous leur forme active se condensent avec trois moles de malonate (C6) pour former un chalcone en C15. La fermeture et l'hydratation ultérieures, selon le cycle conduisent à la formation des divers flavonoïdes. Ainsi, le cycle A des flavonoïdes résulte de la condensation de trois moles de malonyl-CoA et les cycles C et B sont formés par les acides phénylpropanoïques (Wollgast & Anklam, 2000 ; Ferrer *et al.*, 2008). Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Ferrer *et al.*, 2008).

I.2.8.1.2.2. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (D'Archivio *et al.*, 2007). Les composés phénoliques simples sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1) et de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3) (Bruneton, 2008).

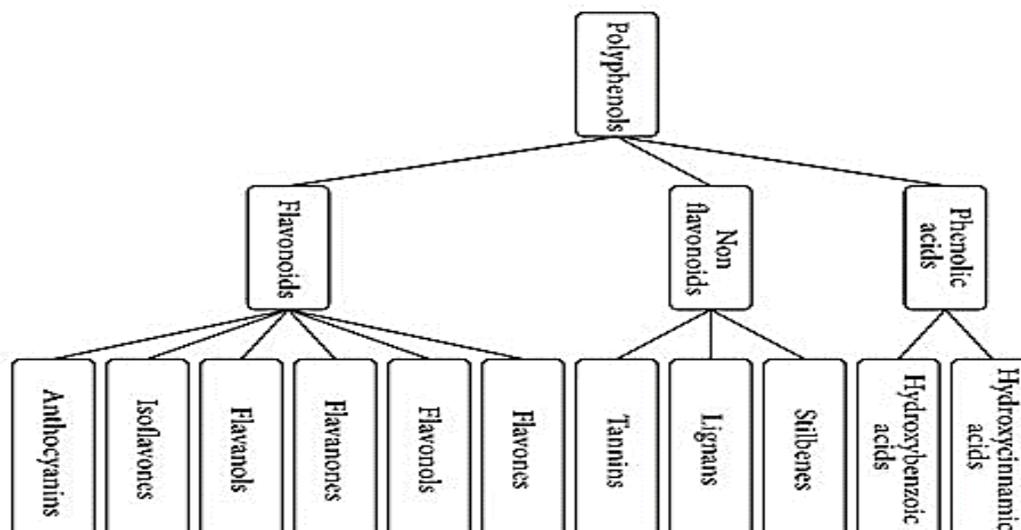


Fig. 8. Classification des familles de polyphénols (Basheer & Kerem, 2015).

En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (Havsteen, 2002). Les non flavonoïdes qui sont des polyphénols complexes à l'exemple du tanin (Fig.8). Les tanins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol

est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitannins (Bruneton, 1993).

Les tanins peuvent former des complexes avec de multiples molécules (protéines, polysaccharides, alcaloïdes, anthocyanes) et le processus peut être réversible ou irréversible (Bruneton, 1999). Les tanins condensés ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Bruneton, 1999). (Fig.8).

I.2.8.1.3. Propriétés et intérêts des polyphénols

L'effet des polyphénols sur les lignées de cellules cancéreuses humaines est fréquemment protecteur et induit une réduction du nombre de tumeurs et de leur croissance (Scalbert *et al.*, 2005). Les polyphénols agissent par différents mécanismes dont l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau intestinal (Dembinska-Kiec *et al.*, 2008). Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs (Nijveldt *et al.*, 2001). Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation (Ksouri *et al.*, 2007). Les flavonoïdes jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols) et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Yao *et al.*, 2004).

Chez les plantes, les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions. Ces composés assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graines (interviendraient dans la fertilité des plantes et la germination du pollen) (Stalikas, 2007). Ils interviennent également dans les processus de défense contre le rayonnement UV en protégeant les plantes contre les radiations UV, en absorbant à la fois ces radiations et les espèces réactives de l'oxygène formées. Ils représentent un système de défense contre les organismes micro pathogènes les (attaques microbiennes) (Crozier, 2003 ; Stalikas, 2007). Toutes les grandes familles de composés phénoliques solubles (dérivés hydroxycinnamiques, flavonols, flavanols, anthocyanines, tanins) participent aux qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits alimentaires d'origine végétale (Macheix *et al.*, 2006).

I.2.8.2. Acides aminés

En biochimie, les acides aminés jouent un rôle crucial dans la structure, le métabolisme et la physiologie des cellules et de tous les êtres vivants connus, en tant que constituants des peptides et des protéines. D'où sa présentation, sa biosynthèse et sa classification.

I.2.8.2.1. Généralités

Les acides aminés sont à la base de la constitution des protéines et autres peptides. Ce sont les produits primaires de l'assimilation de l'azote et les précurseurs des protéines et des acides nucléiques (Stewart & Lahrer, 1980). Les métabolites primaires sont des produits issus directement des photoassimilats (sucres simples, acides aminés, protéines, acides nucléiques et organiques), qui participent à la structure de la cellule végétale ainsi qu'à son fonctionnement de base (Hopkins, 2003). Ces métabolites sont aussi définis comme des molécules qui se trouvent dans toutes les cellules végétales et, nécessaires à leur croissance et à leur développement (Raven *et al.*, 2000). Par opposition, les métabolites secondaires (MII) ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont limités à certaines espèces de végétaux et sont importants pour la survie et la valeur adaptative des espèces qui les synthétisent (Croteau *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2000).

I.2.8.2.2. Biosynthèse et classification des acides aminés

I.2.8.2.2.1. Biosynthèse des acides aminés

Chez les plantes, les premiers acides aminés sont formés dans la racine. Leur distribution est assurée par la sève brute (Anonyme 4, 2017). Le métabolisme des acides aminés nécessite de l'énergie et des squelettes carbonés qui seront principalement fournis par la photosynthèse durant la journée et par la respiration durant la nuit (cycle de Calvin, glycolyse, voie des pentoses phosphate et cycle de Krebs) (Anonyme 4, 2017). La première étape de la biosynthèse des acides aminés est l'assimilation de NH_3 (Anonyme 4, 2017). L'une des principales portes d'entrée utilisée par la cellule pour introduire l'ammoniac au cœur du métabolisme des acides aminés est l'amination réductive de l' α -cétoglutarate en glutamate catalysée par le glutamate déshydrogénase. L'hydrogène est fourni par le NAD(P)H. La réaction se fait en deux étapes au niveau des mitochondries. Elle correspond à la condensation d'ammoniac avec le groupe carbonyle de l' α -cétoglutarate pour former un

intermédiaire alpha-iminium glutarate qui est fixé temporairement à l'enzyme pour être ensuite réduit en glutamate (Anonyme 4, 2017). L'alpha-cétoglutarate provient de l'isocitrate dans le cycle de Krebs (Anonyme 4, 2017). Dans la cellule, les acides cétoniques peuvent être transformés en acides aminés correspondants. Le glutamate joue un rôle prépondérant dans les réactions de transamination (Anonyme 4, 2017). En effet, le groupe aminé du glutamate peut être transféré à divers acides α -cétoniques en formant les acides aminés correspondants. Ces réactions de transamination permettent donc de fabriquer un grand nombre d'acides aminés courants (Anonyme 4, 2017).

La synthèse des autres acides aminés, notamment celle des acides aminés aromatiques, est extrêmement complexe, entre autres du fait qu'à partir d'un squelette carboné linéaire, il y a cyclisation ou bien ramification (Anonyme 4, 2017). La première étape de la biosynthèse de ces acides aminés fait intervenir : un précurseur issu de la glycolyse : le phosphoénolpyruvate ; un précurseur issu de la voie des pentoses phosphate : l'érythrose-4-phosphate. Il s'ensuit une voie commune qui aboutit à la formation du shikimate (la shikimate déshydrogénase joue un grand rôle) puis du chorismate (Anonyme 4, 2017). C'est à partir de ce dernier intermédiaire commun que les voies se séparent pour former : d'une part, la phénylalanine et la tyrosine. La deuxième étape est la transamination à partir du glutamate. A partir du glutamate comme acide aminé 1 et d'un acide α -cétonique 1 ; avec formation d'un acide aminé 2 et d'alpha-cétoglutarate comme acide α -cétonique 2. Oxaloacétate : Asp, pyruvate : Ala, α -cétob-méthyl valérate : Ile, α -cétoisovalérate: Val, phénylpyruvate: Phe, 4-hydroxyphényl pyruvate: Tyr, préphénate: arogénate (précurseur de Phe et Tyr), 3-phosphohydroxy pyruvate: 3-phosphosérine. Par la suite, la deuxième incorporation d'ammoniac entraîne la formation de la glutamine à partir du glutamate par la glutamine synthétase. Cette transformation est caractérisée par une grande affinité pour NH_4^+ . La formation du glutamate à partir de la glutamine à par le glutamate synthétase (GOGAT) correspond au transfert sur l'alpha-cétoglutarate du groupe amide de la glutamine. C'est une réduction irréversible catalysée par la glutamine 2-cétoglutarate aminotransférase NAD(P) H-oxydante (glutamate synthétase (GOGAT) (Anonyme 4, 2017). La biosynthèse du tryptophane est sans doute la plus complexe de tous les acides aminés. Elle fait intervenir une molécule impliquée dans la biosynthèse de nombreuses autres molécules dont l'histidine : le 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate (PRPP). Aussi, la glutamine et/ou le glutamate intervient dans la biosynthèse de 3 acides aminés aromatiques (Anonyme 4, 2017).

Seule, la lysine et la thréonine ne peuvent être re-synthétisées à partir du radical carboné (Anonyme 4, 2017).

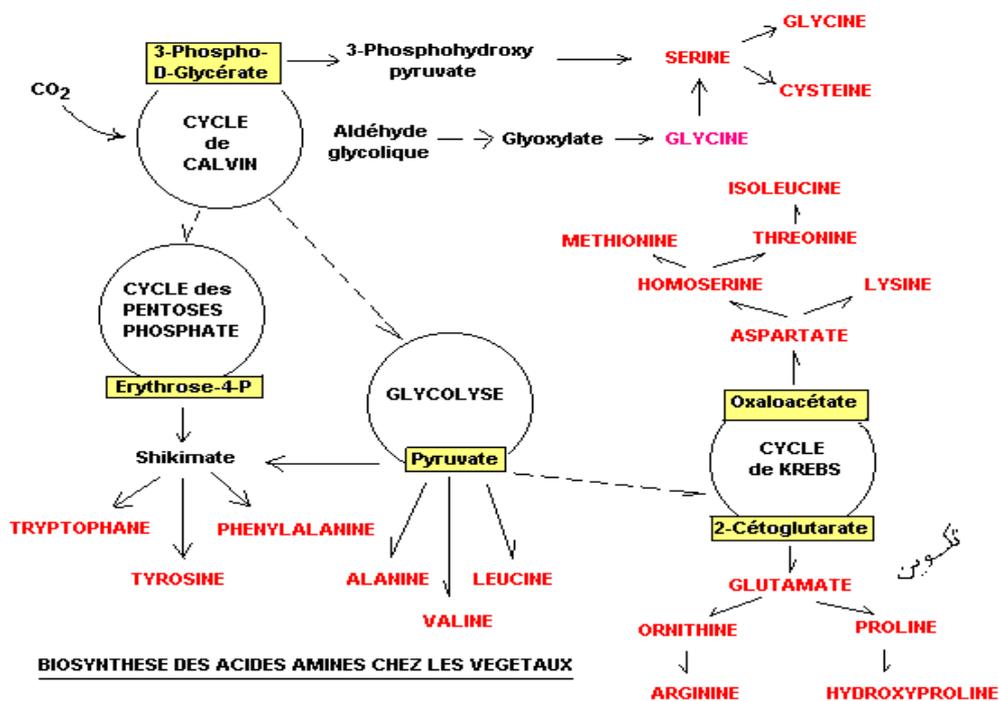


Fig. 9. Principales voies de biosynthèse des acides aminés (Anonyme 4, 2017).

Le principal lieu de biosynthèse des acides aminés reste la feuille où la photosynthèse fournit directement les métabolites nécessaires aux transaminations (Anonyme 4, 2017). Les voies de synthèse sont très souvent branchées, c'est-à-dire que plusieurs acides aminés peuvent être issus d'un précurseur unique (Mifflin & Lea, 1982 ; Lea & Forde, 1994). La synthèse des acides aminés serait régulée par la lumière, la disponibilité en sucres, en certains acides aminés comme la glutamine ou encore en nitrate (Morot-Gaudry *et al.*, 2001). Les plantes et les microorganismes sont capables de faire la biosynthèse de tous les acides aminés protéinogènes. (Fig. 9).

Les principales voies de production et d'utilisation des acides aminés et des protéines sont la synthèse protéique (Anonyme 5, 2014). La synthèse protéique se fait à partir d'un pool (compartiment) d'acides aminés libres de très petite taille, environ 70 g (soit moins de 1 % des acides aminés de l'organisme), lui-même compartimenté en deux pools, extracellulaire et intracellulaire (Anonyme 5, 2014). Ce dernier représentant environ 95 % des acides aminés libres et étant le véritable précurseur de la synthèse ; la protéolyse (ou dégradation protéique), libérant des acides aminés dans le pool. Ces deux phénomènes de synthèse protéique et de

protéolyse sont simultanés et constituent le renouvellement protéique (Anonyme 5, 2014). Des protéines sont dégradées par les enzymes respectives aux polypeptides et aux acides aminés, qui forment la base des précurseurs de saveur de chocolat (Anonyme 5, 2014).

I.2.8.2.2. Classification des acides aminés

Les acides aminés constituent les bases des protéines. Les acides aminés, appelés aussi molécules quaternaires, sont composés de quatre éléments : le Carbone (C), l'Hydrogène (H), l'Oxygène (O) et l'Azote (N) (Anonyme 6, 2017). Les acides aminés (acides alpha-aminés) sont formés de 3 composantes essentielles. La fonction acide (-COOH), la fonction amine (-NH₂) et le radical R qui change d'un acide aminé à un autre et fait ainsi, la différence entre les différents acides aminés (Anonyme 6, 2017). Les acides aminés (AA) peuvent être subdivisés en AA apolaires (9 AA) et en AA polaires (11 AA). Ces derniers peuvent être des Acides aminés polaires non chargés (6 AA), Acides aminés polaires chargés (-) (appelés aussi AA acides) et des Acides aminés polaires chargés (+) (appelés aussi AA basiques) (Anonyme 6, 2017). Afin de produire de plus de caractéristiques et d'observations, les divers acides aminés libres ont été groupés selon le système de la classification de Kirchhoff *et al.* (1989). Ce système de classification met les divers acides aminés libres dans les groupes distincts comme suit :

- Groupe 1 : Acides aminés hydrophobes ; composé de l'alanine, de la leucine, de la phénylalanine, de la valine, de la tyrosine et de l'isoleucine ;
- Groupe 2 : L'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine, l'acide glutamique et l'histidine composent les acides aminés acides ;
- Groupe 3 : Ce groupe se compose des acides aminés libres qui n'appartiennent ni au groupe 1 ni au groupe 2 ; le tryptophane, la lysine, la sérine, la glycine, l'arginine et la thréonine appartiennent à ce groupe.

I.2.8.2.3. Rôles des acides aminés

I.2.8.2.3.1. Dans le cacao

Les acides aminés se retrouvent dans les cellules et les fluides intercellulaires des plantes et jouent un rôle essentiel dans de très nombreux processus physiologiques : phase de croissance, de développement et de formation des fruits, ou lorsque le gel, la sécheresse ou tout autre stress abiotique ont modifié la capacité de synthèse de la plante (Anonyme 7,

2017). Par exemple, la phénylalanine est à l'origine des acides phénoliques, des flavonoïdes, des gluconisates, des alcaloïdes, des subérines et des lignines qui jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense et de constitution des parois et des fibres. Elle favorise la germination des pousses et stimule l'enracinement (Anonyme 7, 2017) (Fig. 10).

L'acide aminé a une corrélation significative avec la formation de la saveur dans des circonstances normales de fermentation (Misnawi *et al.*, 2005). La formation des acides aminés peut être employée comme guide pour déterminer la durée appropriée pour obtenir les fèves de cacao fermentées qui ont de bonnes saveurs (Voigt *et al.*, 1994). Misnawi *et al.* (2005) ont montré que le meilleur arôme de cacao est habituellement produit à partir des fèves de cacao qui ont de niveaux élevés d'acides aminés libres et de sucre réducteur. De plus, Voigt *et al.* (1994) ont constaté que les acides aminés libres et les oligopeptides sont les précurseurs essentiels d'arôme. Les acides aminés ont une diversité de fonction mais une seule organisation avec comme unité de base les protéines. L'activité combinée des enzymes, de l'aspartate d'endoprotéase et de la peptidase de carboxyl, sur la protéine des fèves de cacao est exigée pour la formation de certains précurseurs d'arôme de cacao.

I.2.8.2.3.2. Dans le corps humain

Les années récentes ont été témoin de la découverte que les acides aminés (AA) sont non seulement les cellules signalantes des molécules mais sont également des régulateurs d'expression de gènes et de la cascade de phosphorylation de protéines (Wu, 2009). En plus, elles sont responsables du métabolisme et de la croissance du corps humain.

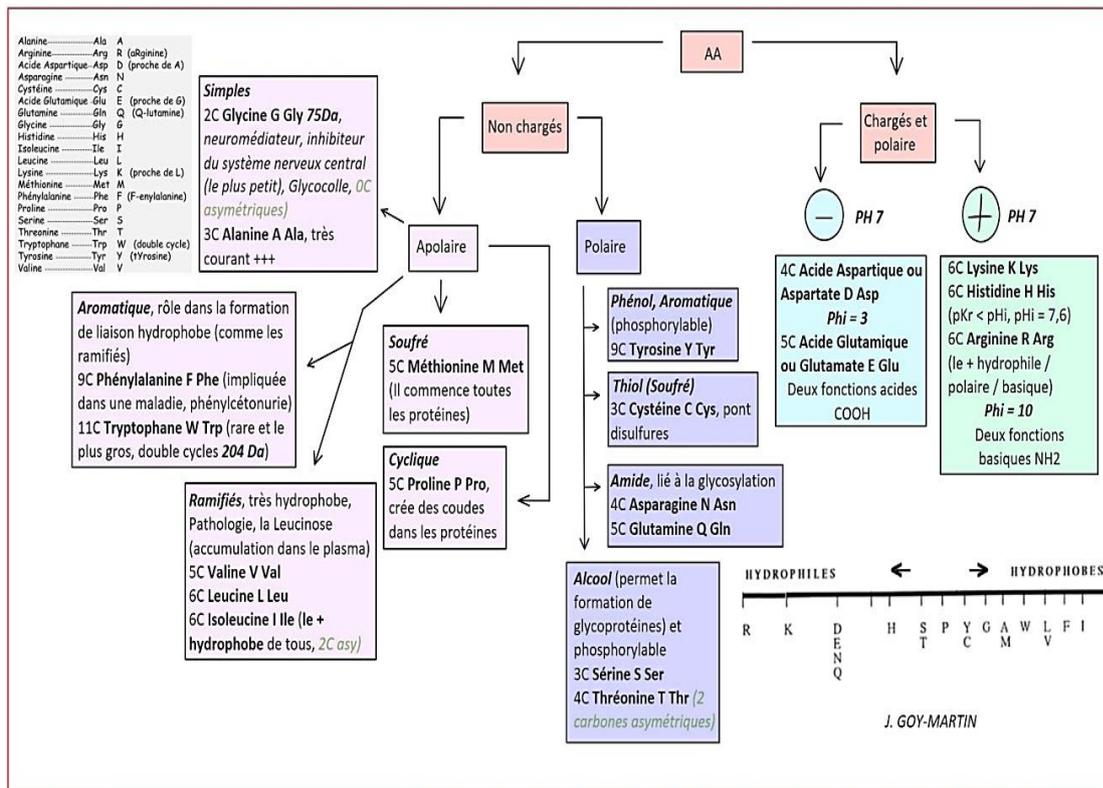


Fig. 10. Différents rôles et fonctions des acides aminés (Anonyme 7, 2017).

Les acides aminés ont des fonctions très différentes. Chaque acide aminé a un impact différent sur l'organisme. Les acides aminés ont une diversité de fonction mais une seule organisation avec comme unité de base les protéines. Certains acides aminés règlent les voies métaboliques principales qui sont nécessaires pour l'entretien, la croissance, la reproduction, et l'immunité (Wu, 2009). Ils s'appellent acides aminés fonctionnels, qui inclut l'arginine, la cystéine, la glutamine, la leucine, la proline, et le tryptophane (Wu, 2009). Les acides aminés ou leurs radicaux carbonés peuvent être les précurseurs de composés biologiquement actifs (Wu, 2009) et de certains acides aminés.

I.2.8.3. Sucres

Les sucres courants de faible masse moléculaire sont le glucose, le fructose, le saccharose, le lactose, le maltose et ceux de masse moléculaire élevée, les polymères glucidiques appelés polysaccharides ou encore polyholosides, sont l'amidon, le glycogène ou la cellulose.

I.2.8.3.1. Généralités

Les sucres ou saccharides sont les biomolécules les plus abondantes sur la planète (Gillet, 2012). Ils sont importants dans bon nombre de rôles biologiques. Ce sont les constituants majoritaires de l'alimentation. Les sucres insolubles servent également de matériel structurel dans la paroi cellulaire des végétaux (Gillet, 2012). On englobe dans le terme « glucide » les sucres réducteurs ou les composées donnant par hydrolyse un ou plusieurs sucres réducteurs. Le glucide le plus abondant dans la nature est le glucose qui par polymérisation peut donner la cellulose, l'amidon ou le glycogène. Les glucides sont des hydroxyaldéhydes et de hydroxycétones (Gillet, 2012).

La pulpe douce mucilagineuse des fèves mûres contient des quantités variables de sucres (les hexoses et le saccharose) et de polysaccharides (pectines, hémicelluloses, et cellulose), (Biehl & Ziegleder, 2003). La pulpe de cacao est riche en sucres réducteurs, tels que le glucose, le fructose et le saccharose, et a un pH bas de 3,0-3,5, principalement en raison de la présence de l'acide citrique (Ardhana & Fleet, 2003 ; Guehi *et al.*, 2010) rendant le milieu riche pour la croissance microbienne (Lefeber *et al.*, 2010). De même, Afoakwa *et al.* (2008) ont rapporté que, pendant la fermentation, le saccharose est converti en sucres réducteurs (fructose et glucose) due à l'activité d'invertase. Des sucres réducteurs sont impliqués dans le développement de la saveur typique de chocolat par les réactions de Maillard avec les acides aminés pendant la torréfaction (Zhao *et al.*, 2014). Jusqu'à 90 % de glucose et de fructose sont consommés pendant la torréfaction (Biehl & Ziegleder, 2003). Les travaux réalisés par Lefeber *et al.* (2010) ont prouvé que le rapport du saccharose, glucose, et le fructose actuel dans la pulpe change avec l'âge de la cabosse.

I.2.8.3.2. Synthèse et classification des glucides

I.2.8.3.2.1. Synthèse des glucides

Le sucre se trouve naturellement dans certaines plantes (fruits, racines, feuilles, tiges et même dans la sève des arbres). Toutes les plantes vertes utilisent, grâce à la chlorophylle, l'énergie solaire pour transformer le CO₂ de l'air et de l'eau du sol, en matières organiques, en particulier en glucides (Gillet, 2012). La photosynthèse a lieu majoritairement dans les cellules du mésophylle des feuilles matures (organes sources) (Piel, 2002). Au cours de cette photosynthèse, le composant glucidique le plus important qui apparaît est le fructose (Piel, 2002). Ces molécules sont soit directement utilisées pour la synthèse d'amidon dans les chloroplastes où elles ont été synthétisés, soit exportés vers le cytosol pour être converties en

saccharose (Frommer & Sonnewald, 1995). En effet, une partie du fructose se transforme en glucose et la molécule de glucose se lie au fructose pour former le saccharose (Piel, 2002). Une partie de ces glucides est utilisée pour la respiration de la plante (la réaction se passe la nuit avec dégagement de CO₂), ainsi que ses besoins de croissance. Le reste de glucides est stocké dans les organes de réserve (Fig. 11).

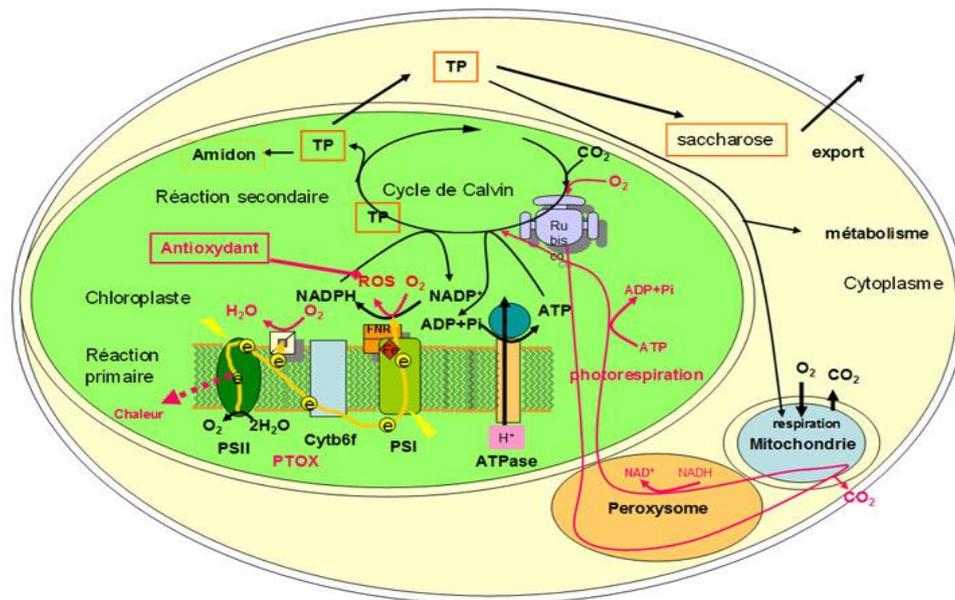


Fig. 11. Biosynthèse des glucides (Raven, 1986).

Les Trioses phosphate (TP), qui contiennent le CO₂ assimilé, peuvent être utilisés de plusieurs façons dans les cellules chlorophylliennes :

- Pour régénérer l'accepteur du CO₂ ;
- Pour la synthèse de glucose et d'amidon dans le chloroplaste ;
- Pour être exportés vers d'autres compartiments de la cellule où ils fournissent énergie et chainons carbonés pour sa maintenance ;
- pour la synthèse de saccharose qui est exporté vers d'autres parties de la plante comme source d'énergie et fournisseur de squelettes carbonés alimentant de nombreuses biosynthèses (Fig. 11) (Raven, 1986).

Le dioxygène peut se fixer sur le RuBP: cette oxygénation est à l'origine d'une voie métabolique, la photorespiration, qui consomme aussi de l'ATP et du NADPH.

I.2.8.3.2.2. Classification des glucides

Les sucres diffèrent les uns des autres non seulement par le nombre d'atomes de carbone mais également par la position dans l'espace des groupements OH (Touitou, 2005). Les glucides sont des hydroxyaldéhydes et des hydroxycétones. Ils sont subdivisés principalement en oses et osides (Touitou, 2005) (Fig. 12).

Les oses, encore appelés monosaccharides ou sucres simples sont les plus simples des glucides. Ils sont réducteurs (Touitou, 2005). Les sucres simples sont des chaînes carbonées de trois à huit carbones. Ce sont des « dérivés » d'une chaîne droite de polyhydroxy-alcool. Deux classes existent : dans la première, un alcool primaire terminal est oxydé en un aldéhyde pour donner un membre de la série des aldoses, tandis que dans la seconde, un alcool non-terminal secondaire est oxydé pour donner un membre de la famille des cétooses (Touitou, 2005). Les osides résultent de la condensation, avec élimination d'eau, des molécules d'oses et, éventuellement, de substances non glucidiques également appelés "groupement aglycones". Ils se subdivisent en holosides et hétérosides (Touitou, 2005) (Fig. 12).

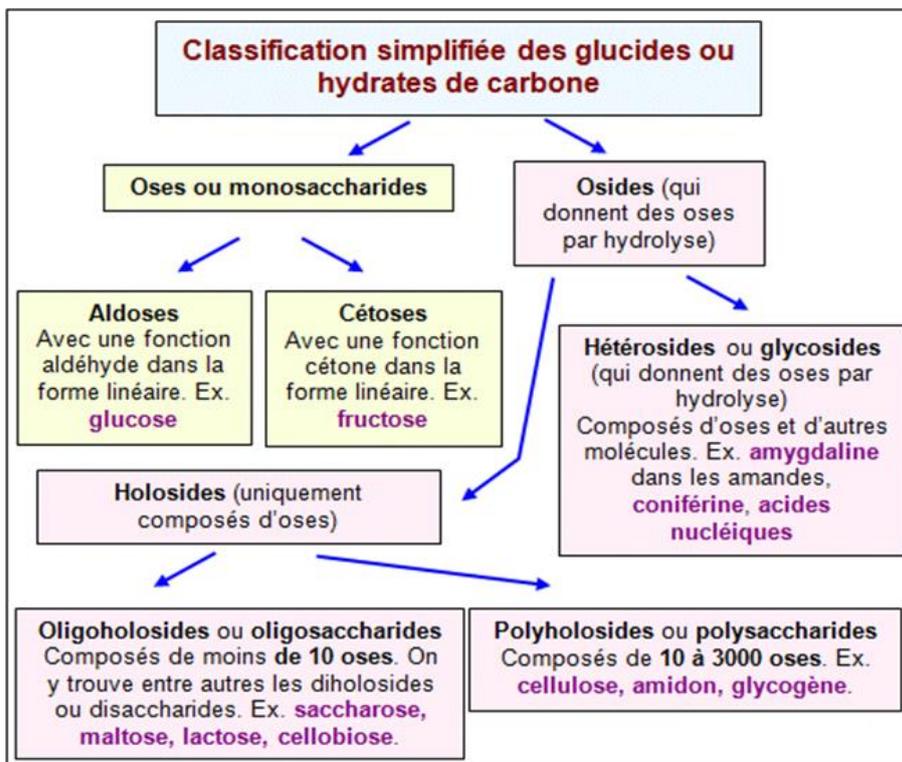


Fig. 12. Classification des glucides (Touitou, 2005).

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des fèves issues de seize (16) cabosses de cacao de type Forastero et Trinitario (Tableau III, Fig. 13). Ces cabosses proviennent des plantations de la station de recherche expérimentale de Nkoemvone (localité de la région du Sud Cameroun). Les cacaoyers de type Forastero et Trinitario sont connus pour leur productivité, rusticité, taille moyenne des fèves et leur résistance aux maladies (Nyassé, 2007). Les Trinitario du Cameroun se distinguent de leur saveur plaisant. Au début des années 1900, des variétés de cacao d'Amérique latine, ont été introduit au Cameroun. Parmi les principales variétés introduites à cette époque, on compte les Trinitario (Tr), originaire des Trinidad et les Forastero originaire de upper amazonien (UA). Des champs expérimentaux ont été créés pour le développement des variétés hybrides à partir des clones parentaux Tr et UA.

Tableau III. Différents génotypes de cacaoyer utilisés au cours de ce travail

Trinitario	Forastero
TIKO31	IMC67
TIKO32	T60/887
SNK10	SNK64
SNK16	SNK620
SNK450	SNK624
SNK377	T79/501
SNK48	German cocoa
SNK15	/
ICS40	/

Des fèves de cacao séchées provenant des échantillons ont été rassemblées pendant la campagne 2009-2010 de cacao dans les régions du Sud (latitude 255'; longitude 1107'), Centre (latitude 434'; longitude 1128') et Littoral (latitude 933'; longitude 429'), du Cameroun. Dans chaque région, 30 échantillons (sachet contenant des fèves de cacao fermentées et sechées) ont été collectés auprès de 30 différents fermiers. Des échantillons

d'environ 1-2 kilogrammes par fermier ont été collectés pour chaque région, scellés dans des sachets en plastique et conservés à température ambiante pour les analyses ultérieures.

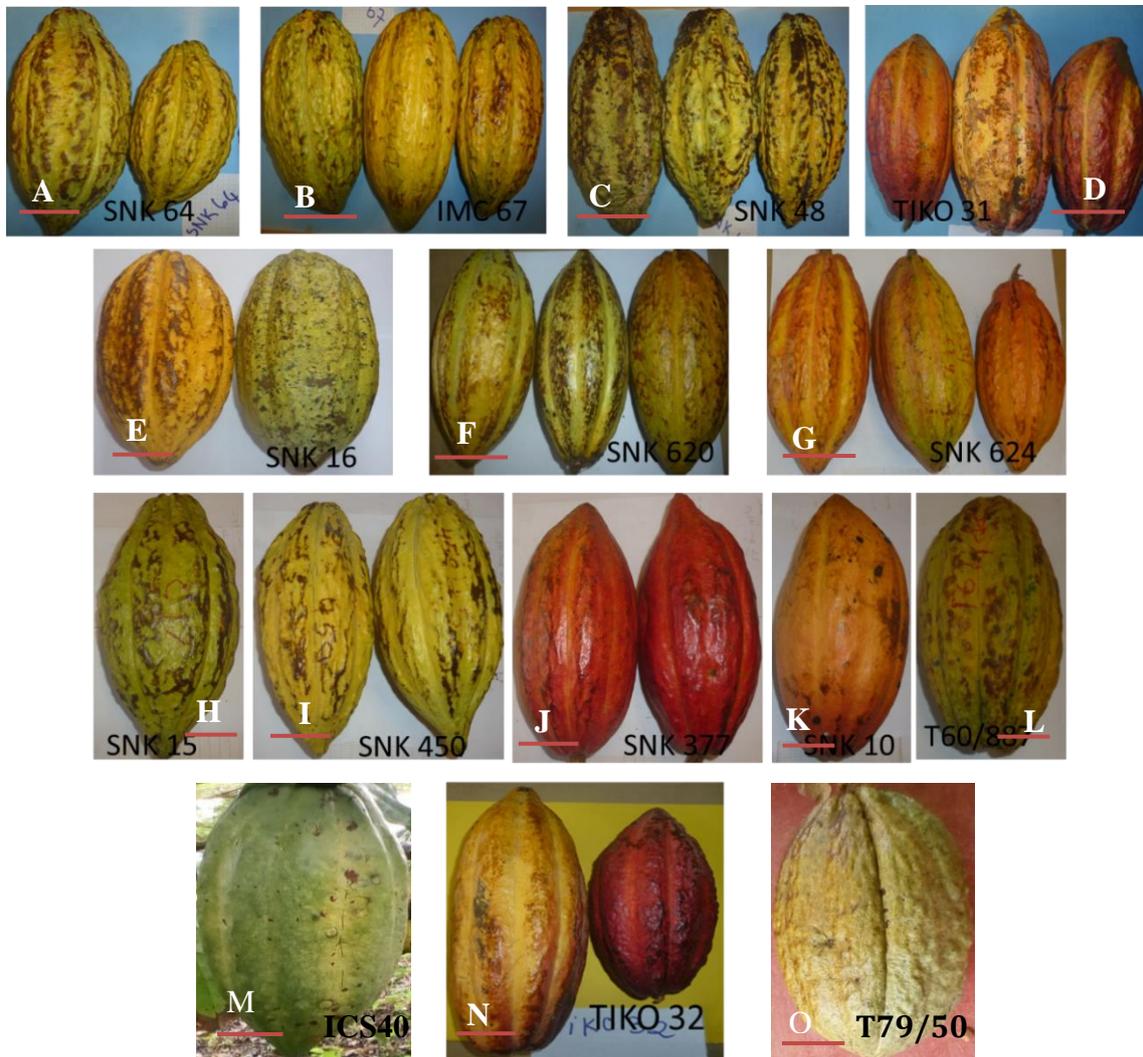


Fig. 13. Cabosses matures de cacao. (E : 1 cm) (photo crédit : Tchouatcheu, 2016).

III.1.1. Description des cabosses de cacao

Le cacao marchand collecté auprès des planteurs et 16 génotypes de cacao provenant de 2 variétés différentes ont été utilisés au cours de cette étude. La revue de littérature des études morphologiques ont permis d'établir le tableau ci – dessous (Tableau IV).

Tableau IV. Caractéristiques morphologiques des différents génotypes utilisés.

Clones	Couleur des cabosses	Forme de bout des cabosses	Originaire	Rugosité de la cabosse
IMC67	Verte (immature) Jaune (mature)	ronde	Iquitos/ Perou	Rugueuse
TIKO31	Verte (immature) Jaune orangée (mature)	Allongée	Tiko/sud-ouest Cameroun/	Rugueuse
T60/887	Verte (immature) Jaune (mature)	Rond	Tafo/ Ghana	Rugueuse
TIKO32	Verte (immature) Jaune orangée (mature)	Allongée	Tiko/sud-ouest Cameroun	Rugueuse
SNK64	Verte (immature) Jaune (mature)	pointu	Locale/ Nkoemvone (Cameroun)	Rugueuse
SNK10	Verte (immature) Jaune-orangée (mature)	Rond	Locale/ Nkoemvone (Cameroun)	Lisse
SNK16	Verte (immature) Jaune (mature)	pointu	Locale/ Nkoemvone(Cameroun)	Rugueuse
SNK620	Verte (immature) Jaune (mature)	Rond	Haute amazonie	Rugueuse
SNK624	Verte (immature) Jaune-orangée (mature)	Pointu	Haute amazonie	Rugueuse
SNK450	Verte (immature) Jaune (mature)	Pointu	Locale/ Nkoemvone	Rugueuse
SNK377	Verte (immature) Jaune-orangée (mature)	Pointu		Rugueuse
SNK48	Verte (immature) Jaune (mature)	Pointu	Locale/ Nkoemvone (Cameroun)	Hyper rugueuse

SNK15	Verte (immature) Jaune (mature)	Pointu		Rugueuse
T79/501	Verte (immature) Jaune (mature)		Tafo/ Ghana	
ICS40	Verte (immature) Jaune (mature)		Trinidad/ Trinidal	
German cocoa	Verte (immature) Jaune (mature)			

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des solutions d'incubation

La préparation des solutions et les incubations ont été réalisées au laboratoire de physiologie et de biochimie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé suivant la méthode de Eyamo *et al.* (2016).

La solution d'acide lactique (Sigma-Aldrich) (1 L) 100 mM, pH 4 a été préparée en diluant 7,73 mL d'acide lactique dans de l'eau distillée pour un volume total de 1 L. Le pH de la solution obtenue a été ajusté à 4 avec une solution de NaOH (Sigma-Aldrich) de 1 M. Les solutions d'acide acétique (Fluka) (1 L) de 100 et 200 mM ont été préparées en diluant respectivement 5,88 et 11,77 mL, dans l'eau distillée pour volume total de 1 L. Le pH de la solution obtenue a été ajusté à 4 ou 5 avec une solution de NaOH de 1 M. La solution mixte (acides lactique et acétique) a été obtenue en mélangeant à volume égal les solutions d'acide lactique et / acétique préalablement préparées (au pH 4 chacune). Ensuite le pH de la solution finale a été ajusté à 4.

II.2.2. Milieu et conditions d'incubation

II.2.2.1. Milieu d'incubation

Le milieu d'incubation comprend trois traitements préparés à partir de l'acide lactique et / ou de l'acide acétique.

II.2.2.2. Aseptisation et conditions d'incubation

Les conditions d'incubation ont été appliquées suivant le protocole de Rohsius (2007) révisé par Eyamo *et al.* (2016). Les cabosses matures et saines récoltées ont été trempées pendant 15 min, et deux fois de suite dans l'hypochlorite de sodium à 3 %, puis rincées trois fois dans l'eau distillée et séchées sous la hotte à flux laminaire (MECAPLEX AG, CH – 2540 GRENCHEN). Elles ont été ensuite flambées à l'éthanol puis ouvertes. Vingt-cinq fèves en moyenne ont été introduites dans les bouteilles stérilisées contenant 150 mL du milieu d'incubation suivant les traitements (Tableau V et VI). Après deux jours d'incubation dans le bain marie, les fèves ont été transférées sous hotte à flux laminaire dans une autre bouteille contenant le second milieu d'incubation. La température du bain marie était comprise entre 30-50 °C suivant les étapes décrites dans le tableau. Les fèves ont été séchées au soleil entre 8 h et 17 h avec remuage toutes les trois heures jusqu'à l'obtention d'un taux d'humidité de 6,9 %. Les fèves sèches obtenues ont été emballées dans les plastiques noires et conservées à température ambiante 25-28 °C. L'expérimentation a été répétée trois fois.

Tableau V. Dispositif expérimental des incubations pour 13 génotypes

Traitements	Jours d'incubation				
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	50 °C
1	Acide acétique 100 mM; pH 4		Acide acétique 200 mM; pH 5		
2	Acide lactique 100 mM; pH 4		Acide acétique 200 mM; pH 5		

Pour évaluer la dynamique des acides aminés et polyphénols après incubation, quatre autres traitements ont été utilisés pour 3 génotypes.

Tableau VI. Dispositif expérimental des incubations pour 3 génotypes (T79/501, German cocoa, ISC40).

Traitements	Jours d'incubations				
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	50 °C
1	Acide acétique 100 mM; pH 4		Acide acétique 200 mM; pH 5		
2	Acide lactique + acide acétique 100 mM + 100 mM; pH 4		Acide acétique 200 mM; pH 5		
3	Acide lactique 100 mM; pH 4		Acide acétique 200 mM; pH 5		
4	Acide lactique 100mM; pH 4		Acide lactique + acide acétique 100mM + 100 mM; pH 5		

II.2.3. Coloration des fèves

L'épreuve à la coupe a été conduite suivant la méthode Shamsuddin & Dimmick (1986), avec quelques modifications. Dix fèves issues de chaque traitement ont été fendues longitudinalement en deux parties égales. Chaque partie a été observée à la lumière du jour et photographiée.

De plus, cent graines par échantillon (fèves marchandes) collecté ont été coupées en long avec une guillotine de cacao (type MAGRA, compagnie suisse TESERBA). L'aspect des fèves à chaque stade de fermentation a été évalué : les fèves ardoisées, violettes, brunes et blanches. Les fèves ont été regroupées en couleurs obtenues à chaque stade de fermentation, de chaque région, puis les couleurs obtenues dans chaque région ont été combinées pour chaque stade de fermentation. Les coquilles et les radicules ont été enlevées. Cinquante grammes (50 g) de fèves ont été écrasées avec un mélangeur et les poudres ont été stockées à -20 °C. Les analyses ont été faites en trois répétitions et à chaque stade de l'incubation.

II.2.4. Indice de fermentation

L'évaluation de l'indice de fermentation a été conduite suivant la méthode décrite par Gourrieva & Tsirrevitinov (1979) révisée par Misnawi (2008). Cinq cent milligrammes (500 mg) de poudre de cacao délipidée ont été dissous dans 50 mL de méthanol acidifié (MeOH-HCl) (97:3, v/v) et le mélange a été incubé à 8 ± 2 °C durant 16 à 18 heures. La solution a été ensuite filtrée et 50 mL de méthanol acidifié ont été ajoutés au filtrat obtenu. L'absorbance du

filtrat a été mesurée à 460 nm et à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY). L'indice de fermentation de l'échantillon est égal au rapport de l'absorbance à 460 nm sur 530 nm.

II.2.5. pH des fèves

La détermination du pH des fèves a été conduite suivant la méthode décrite par Eyamo (2017) en accord avec la méthode officielle N 970.21 de «l'Association of Analytical Chemists (AOAC)». Quatre à cinq fèves ont été débarrassées de leur testa puis écrasées au blinder. Trois grammes (3 g) de cette poudre ont été dissous dans 30 mL d'eau bouillante puis homogénéisé pendant 10 min. le mélange obtenu a été laissé au repos puis filtré sur papier (Whatman N° 4). La mesure du pH a été effectuée sur le filtrat obtenu. L'opération a été réalisée trois fois pour chaque échantillon.

II.2.6. Détermination des polyphénols par RP-HPLC

Les analyses ont été faites sur des poudres délipidées. Les fèves ont été écrasées au blinder, 10 ml de n-hexane ont été ajoutés à 2 g de poudres, le mélange a été homogénéisé. L'homogénat a été rincé avec environ 75 ml de l'éther de pétrole (point d'ébullition 40 – 60 °C), puis, a été filtré et séché dans une étuve de vacuum.

II.2.6.1. Extraction des polyphénols

L'extraction et l'analyse des composés phénoliques a été faite suivant la méthode de Rohsius (2007). Pour l'analyse RP-HPLC, cinquante milligrammes (50 mg) de la poudre de cacao délipidée dans un tube à centrifuger (16 x 100 mm²) a été pesé. Puis, trois millilitres (3 ml) de méthanol a été ajouté et, enfin le mélange a été agité pendant 20 à 30 s avec un ULTRA-TURRAX® T 25 (Ika Labortechnik, Staufen, Allemagne). L'agitateur a ensuite été rincé avec 2 mL de méthanol et les solutions ont été combinées. Le tube de centrifugation a été refroidi pendant 15 min à 0 °C, puis centrifugé pendant 10 min à 5 000 trs / min. Le surnageant méthanolique contenant des composés phénoliques a été décanté dans un ballon en forme de poire de 50 ml. L'extraction a été répétée 3 fois supplémentaires, avec une phase de refroidissement de seulement 2 min. Le méthanol a été éliminé des extraits combinés par évaporation rotative sous vide partiel à 40 °C et 100 mbar. Ensuite, le résidu a été dissous dans 1,5 ml de méthanol (Lichrosolv®). L'échantillon a été transféré dans un flacon de HPLC à travers un filtre seringue de 0,45 µm (PTFE Multoclear®, Service de

chromatographie en phase gazeuse, Langerwehe, Allemagne). Le flacon a été scellé hermétiquement et l'échantillon a été conservé à -20 °C jusqu'à une analyse ultérieure.

II.2.6.2. Quantification et identification des polyphénols

Les polyphénols ont été mesurés à l'aide d'un détecteur PDA (Photodiode Array Detector, Waters 996) dans une plage de longueurs d'onde de 225 à 540 nm. Les polyphénols ont été quantifiés à une longueur d'onde de 280 nm et les anthocyanines à 540 nm. La catéchine, l'épicatéchine, le cyanidine-3-galactoside et le cyanidine-3-arabinoside ont été utilisés comme étalons pour la quantification. La détermination de la catéchine, l'épicatéchine, les cyanidine-3-galactoside et les cyanidine-3-arabinoside a été exécutée selon le protocole de Stoll et *al.* (2017).

Tableau VII RP-HPLC gradients utilisés pour la séparation des polyphénols.

Temps (min)	Volume (mL min ⁻¹)	Composition de la solution d'élution	
		A (%)	B (%)
0	1,2	90	10
8	1,2	90	10
38	1,1	77	23
50	1	60	40
70	1	10	90
73	1	10	90
78	1,2	90	10
93	1,2	90	10

II.2.7. Détermination des acides aminés libres par HPLC¶

Avant toute analyse, les fèves séchées ont été délipidées. Deux grammes (2 g) de fèves écrasées de chaque stade de fermentation (ardoisées, violettes, brunes et blanches) a été mélangée avec 10 ml d'hexane. Le lipide a été enlevé en pulvérisant la poudre avec 100 ml

d'éther de pétrole en utilisant un entonnoir à vide. La poudre finale a été séchée sous vide à la température ambiante pendant 30 minutes et stockée à -20 °C pour des analyses.

II.2.7.1. Extraction des acides aminés

Les acides aminés libres ont été analysés selon la méthode de Rohsius *et al.* (2006). 0,5 g de poudre délipidée a été agité à < 4 °C pendant 1 heure avec 1,4 g de polyvinyl-poly pyrrolidone (PVPP) et 50 ml de H₂O. Immédiatement après l'ajout d'eau, le pH a été ajusté à 2,5 avec une solution aqueuse à 50 % d'acide trifluoroacétique. La solution a été centrifugée pendant 10 min à 5000 trs / min. La solution limpide surnageante a été filtrée à travers un filtre de 0,45 µm (Multoclear, CS-Chromatographie). 30 µl de chaque échantillon ont été lyophilisés (1 h; -20 °C, 0,05 mbar) directement dans le flacon et conservés à -20 °C pour les analyses.

II.2.7.2. Séparation des acides aminés par RP-HPLC

Les acides aminés libres ont été séparés avec un système HPLC en phase reverse. Les poudres délipidées ont été analysées après dérivatisation o-phthalaldéhyde (OPA) selon la méthode de Rohsius *et al.* (2006). Colonne de séparation : LicChroCART 250-4 (Merck) ; précolonne: Lichrospher 100 RP-18 (5 µm); température de la colonne: 30 °C; Eluants: A: 1,6 l de solution d'acétate de sodium / acide acétique glacial (50 mmol l⁻¹; pH 6,2), 50 ml de MeOH (Lichrosolv R, gradient grade), 20 ml de tétrahydrofurane (Lichrosolv R; gradient). B : 200 ml de solution d'acétate de sodium / acide acétique glacial (50 mmol l⁻¹ ; pH 6,2), 800 ml de MeOH (Lichrosolv R, gradient gradient); débit: 1,3 ml min⁻¹. La colonne a été équilibrée avec l'éluant A. Gradient (A + B = 100 % v / v) : (1) 2 min 100-95 % A, (2) 10 min, 95-85 % A, (3) 8 min, 85-60 % A, (4) 5 min, 60-50 % A, (5) 15 min, 50-0 % A, (6) 10 min, constant 0 % A, (7) 5 min, 0-100 % A, (8) 20 min, constante 100 % A. Détecteur : spectrophotomètre à fluorescence HitachiF-1050 ($\lambda_{ex} = 334\text{nm}$, $\lambda_{em} = 425\text{nm}$) ; Échantillonneur automatique : Merck-Hitachi AS-4000.

II.2.7.3. Quantification et identification des acides aminés par HPLC

Pour la mesure par HPLC, 800 µl de tampon borate (200 mmol l⁻¹ d'acide borique ; ajusté à pH 9,5 avec du KOH concentré, bouilli pendant 5 min) ont été administrés aux échantillons lyophilisés. Les solutions standard contenaient 1 à 10 pmol µl⁻¹ de chaque acide aminé, dissous dans du tampon borate. Ensuite, 400 µl de réactif OPA ont été ajoutés à ces

solutions avant chaque injection. Préparation du réactif OPA : 100 mg d'ophtaldialdéhyde (Merck, N ° 11452) préalablement solubilisé dans 2,5 ml de MeOH (Lichrosolv R, à gradient de concentration) plus 22,4 ml de tampon borate (pH 9,5) plus 100 µl de 2-mercaptoéthanol (Merck, N ° 15433). Le réactif OPA a été préparé 24 h avant d'être utilisé. Après injection de 20 µl de ce mélange, la dérivation a été stoppée exactement après 2 min en faisant passer l'éluant dans la colonne. Solution de dégazage : Degassex DG-4400, Phenomenex. Quantification : calculée par la surface de pic des chromatogrammes à partir de mélanges standard contenant 1-10 pmol µl⁻¹ de chaque acide aminé. L'écart type des substances de référence était égal à ± 2,0 %, à l'exception de l'acide glutamique, de la glutamine, de l'alanine et du tryptophane (± 2,9 à 3,8 %) ; l'arginine, l'asparagine, la thréonine et la sérine (± 5,7 à 7,3 %) ; la glycine (± 9,2 %) et la lysine (± 9,6 %).

II.2.8. Détermination des sucres par RI-HPLC

II.2.8.1. Extraction des sucres

Le protocole (Töppner *et al.*, 2013) utilisé est le suivant : 100 mg de poudre de cacao délipidée ont été suspendus dans 1 ml d'eau. La suspension a été homogénéisée au vortex pendant 20 s et incubée dans un Thermomixer confort (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) pendant 1 heure à 1300 trs / min et à 80 °C. Après centrifugation à 13000 trs/min pendant 10 min, 300 µL du surnageant ont été recueillis et dilués avec 900 µL d'eau ultrapure. La solution a été filtrée à travers un filtre à membrane de 0,2 µm (PES Perfect Flow, Wicom, Heppenheim, Allemagne) et soumise à une analyse HPLC. L'opération a été réalisée 2 fois.

II.2.8.2. Quantification et identification des sucres par RI-HPLC

Les sucres ont été séparés par chromatographie d'échange de ligands sur une colonne Rezex RCM-Monosaccharide Ca²⁺ avec une réticulation à 8 % (Phenomenex, Torrance, USA). La séparation de 10 µL d'échantillon a été établie à 85 °C en utilisant un débit de 0,6 mL / min d'eau ultrapure. Pour la quantification, un ensemble de cinq standards de 0,02 à 0,1 mg / mL a été appliqué. Le système HPLC utilisé consistait en un dégazeur ERC 3512 (Erma, Tokyo), un échantillonneur automatique AS-2000A, une pompe intelligente L-6200, un four à colonne L-7350D et un détecteur d'indice de réfraction L-7490 (tous Merck Hitachi, Darmstadt, Allemagne). Le logiciel D-7000 HPLC-System-Management HSM version 4.1 a été utilisé pour enregistrer les données. Les durées de rétention des différents sucres ont été déterminées grâce à l'enregistrement de l'indice de réfraction (RI). Le signal RI est

communiqué dans un chiffre sans dimension en nRIU (nano Refractive Index Unit) et indique la différence entre l'indice de réfraction de l'échantillon dans la cellule et la phase mobile dans la cellule de référence.

II.2.9. Analyses statistiques

Les données ont été traitées par l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant les logiciels SPSS 22.0 et R-studio. Le test de Tukey et le test LSD ont été utilisés pour la comparaison des moyennes au seuil 5 %. Les résultats exprimés sous forme de moyenne \pm écart type ont été présentés en histogrammes (Excel 2013), en Boîte de moustache et diagramme en bâton (R-studio). Le logiciel R-studio (version 0.96.122) a été également utilisé pour l'analyse en composantes principales (ACP).

Tableau VIII: Techniques des différentes analyses

Objectifs	Méthodes	Outils	Techniques d'analyse des données
<p>Déterminer les teneurs en acides aminés et en polyphénols dans le cacao marchand</p>	<p>Analyses univariées et multivariées</p> <p>Les analyses univariées permettent de préciser la relation entre deux groupes. Les analyses univariées reposent sur des tests statistiques, permettant l'obtention d'une p-value (qui est la probabilité, que la différence observée soit due au hasard) :</p> <p>Pour une variable numérique et l'autre qualitative</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pour comparer plus de deux groupes <ul style="list-style-type: none"> ○ Plus de 30 patients par groupe : Anova (analyse de variance) <p>p-value réalisera automatiquement ces tests dans un tableau et générera :</p> <p>Des boîtes à moustache lorsqu'on</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Excel - SPSS " Statistical Package for the Social Sciences" - R. interface R-studio 	<ul style="list-style-type: none"> • Anova (analyse de variance) LSD. Utilisation de tests t pour effectuer toutes les comparaisons appariées entre des moyennes de groupe. Le taux d'erreur n'est pas corrigé dans le cas de comparaisons multiples.

	<p>croise une variable numérique avec une variable qualitative,</p> <p>des paramètres de position moyenne percentiles, dont la médiane première (Q1) et troisième quartile (Q3) représentant 75 % de nos échantillons qui sont inférieures ou égales à la valeur du troisième quartile. Ces boîtes sont constituées de 1^{er} quartile (Q1) représentant 25 % de nos observations d'échantillon qui sont inférieures ou égales à la valeur du 1^{er} quartile. Donc, le 1^{er} quartile est également le 25^e percentile. Il est suivie de la médiane de l'échantillon qui se trouve au milieu des données, au moins la moitié des observations lui est inférieure ou égale, et au moins la moitié lui est supérieure ou égale. Enfin, le 3^e quartile (Q3) représentant 75 % de nos observations d'échantillon qui sont inférieures ou</p>		
--	---	--	--

	<p>égales à la valeur du troisième quartile. Donc, le troisième quartile est également le 75° percentile.</p> <p>Les fèves mixées ont été prises dans un stock sans tenir compte de la couleur des cotylédons. Valeurs moyennes (n = 18) Post hoc Test : Fisher LSD, P < 0,05.</p> <p>L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin d'étudier les corrélations entre les acides aminés, les flavonoïdes, les anthocyanines et les couleurs. L'ACP est une analyse factorielle essentiellement descriptive ; son objectif est de présenter, sous forme graphique, le maximum d'information contenue dans un tableau de données, composé de n lignes (individus) et p colonnes (variables) (avec 5 lignes (couleurs) et 22 colonnes (marqueurs de qualité) dans notre cas).</p>		
--	---	--	--

<p>Evaluer la dynamique des acides aminés au cours de l'incubation des fèves</p>	<p>L'histogramme sert à représenter uniquement les séries à caractère quantitatif continu (effectifs ou fréquences). C'est à dire que lorsque les valeurs prises par le caractère sont regroupées en classes : on porte en abscisse les limites des classes. En ordonnée on peut représenter : les effectifs (n_i) : l'effectif d'une classe est représenté par un rectangle dont l'aire est proportionnelle à l'effectif de la classe (les rectangles sont "accolés").</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Excel - SPSS 	<ul style="list-style-type: none"> • Les valeurs avec les lettres différentes dans un même graphique sont significativement différentes au seuil de probabilité $P < 0,05$ (post-hoc-Test : le test de Tukey d'après ANOVA, $n \geq 4$).
--	--	---	--

<p>Evaluer les paramètres physico-chimiques des fèves incubées et séchées ; et analyser l'influence de la variabilité génétique sur la teneur en acides aminés, en polyphénols et en sucres réducteurs dans les fèves incubées et séchées</p>	<p>On réalise des analyses univariées et des analyses multivariées à l'aide de modèles statistiques.</p> <p>Les modèles statistiques permettent d'obtenir des petites p. Ils ont un intérêt supplémentaire non négligeable : ils permettent de mesurer à quel point un facteur agit sur la variable d'intérêt. Ces mesures d'association sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les Odds Ratio pour les régressions logistiques • Les Estimates ou les coefficients pour les régressions linéaires <p>La p-value renseigne sur la significativité statistique, les mesures d'association quantifient le lien entre deux variables.</p>	<p>- R. interface R-studio</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Les valeurs avec les étoiles différentes dans un même graphique sont significativement différentes au seuil de probabilité $P \leq 0,05(*)$, $P \leq 0,01 (**)$ et $P > 0,05 (ns)$ (t-test d'après ANOVA). • LSD. Utilisation de tests t pour effectuer toutes les comparaisons appariées entre des moyennes de groupe. Le taux d'erreur n'est pas corrigé dans le cas de comparaisons multiples. • Tukey. Utilise les statistiques de plages de Student pour effectuer toutes les comparaisons appariées de groupes. Les valeurs de l'indice de fermentation des fèves incubées (jour 5) et les fèves non incubées (jour 0) ont été calculées suivant le ratio des absorbances obtenues aux longueurs d'onde $\lambda = 460 \text{ nm}$ et 530 nm.
---	---	--------------------------------	---

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Variation de la coloration interne des cotylédons issus du cacao marchand

L'épreuve à la coupe des cotylédons a permis de regrouper les fèves suivant leur coloration. L'observation des fèves issues du cacao marchand met en évidence des fèves ardoisées, violettes, brunes et blanches ce qui informe sur la qualité du cacao marchand.

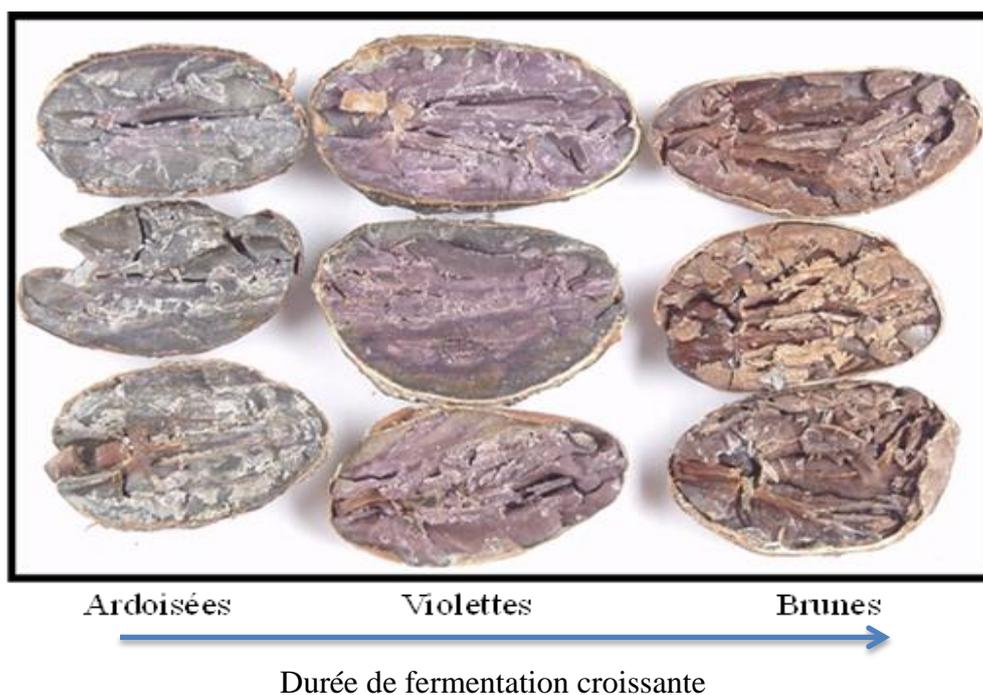


Fig. 14. Principales couleurs des fèves de cacao marchand représentant différents stades de fermentation. Ardoisées, violettes et brunes, pour les fèves pas, assez et bien fermentées respectivement.

III.1.2. Teneur des acides aminés libres dans le cacao marchand

Dans le cacao marchand, on a identifié les acides aminés protéiques et l'acide γ -aminobutyrique (GABA), un acide aminé non – protéique. De façon générale, la valeur moyenne des acides aminés libres totaux a été plus élevée dans les fèves violettes ($11164,85 \pm 4281,072$) et les fèves ardoisées ($4304,47 \pm 1921,576$) présentent des teneurs les plus petites.

III.1.2.1 Acides aminés protéiques

Les acides aminés hydrophobes montrent des valeurs élevées par rapport aux autres groupes après incubation, ces valeurs évoluent en fonction des stades de fermentation. Les

valeurs maximales ont été notées à chaque stade de fermentation, exemple, l'acide aminé alanine des fèves ardoisées et ardoisées-violettes ont enregistré des valeurs de $502,50 \pm 165,136$ mg/kg ffdm et $754,10 \pm 340,87$ mg/kg ffdm respectivement. La leucine a été l'acide aminé dominant de ce groupe pour les fèves violettes, brunes et blanches qui par ailleurs, n'a présenté aucune différence significative entre ces stades.

Les acides aminés acides ont une valeur moyenne plus faible que les acides aminés hydrophobes. En fonction des stades, des valeurs maximales ont été notées chez : ardoisée (Glu : $595,28 \pm 256,579$ mg/kg ffdm), ardoisée-violette (Asn : $810,41 \pm 567,521$ mg/kg ffdm). De plus, aucune différence significative n'a été notée entre ces deux stades de fermentation. Toutefois, les fèves violettes, brunes et blanches ont eu pour acide aminé dominant le glutamate (Glu). Une différence significative est notée entre : les stades ardoisés, ardoisés - violettes et les stades violettes, brunes, blanches.

Les acides aminés autres ont enregistré des valeurs maximales pour la sérine, qui a été l'acide aminé dominant dans tous les stades de fermentation. Toutefois, une différence significative a été notée entre les fèves au stade ardoisé et ardoisé – violette d'une part et d'autre part entre les fèves aux stades violette, brune et blanche (Tableau X).

De façon générale, les valeurs moyennes des acides aminés libres totaux ont évolué avec la fermentation excepté les acides aminés des fèves de coloration brune qui diminuent légèrement comparé aux fèves de coloration violette.

Pour les acides aminés hydrophobes, les valeurs moyennes sont situées entre $242,17 \pm 949,658$ mg/kg ffdm (ardoisées), $2\ 849,71 \pm 1\ 353,062$ mg/kg ffdm (ardoisées-violettes), $6\ 892,14 \pm 2\ 693,92$ mg/kg ffdm (violettes), $6\ 411,91 \pm 1\ 679,062$ mg/kg ffdm (brunes) et $7\ 812,17 \pm 2\ 219,857$ mg/kg ffdm (blanches).

Pour les acides aminés acides, les valeurs moyennes sont de $1\ 615,94 \pm 782,494$ mg/kg ffdm (ardoisées), de $2\ 119,38 \pm 1\ 254,054$ mg/kg ffdm (ardoisées-violettes), de $3\ 195,23 \pm 1\ 220,185$ mg/kg ffdm (violettes), de $3\ 187,6 \pm 849,465$ mg/kg ffdm (brunes) et de $4\ 259,69 \pm 1\ 758,535$ mg/kg ffdm (blanches).

Les acides aminés autres ont enregistré des valeurs moyennes de $446,36 \pm 189,424$ mg/kg ffdm (ardoisées) soit 5 fois moins que les ardoisés des acides aminés hydrophobes, de $598,65 \pm 226,175$ mg/kg ffdm (ardoisées-violettes), de $1\ 077,48 \pm 366,96$ mg/g ffdm (violettes) soit 6 fois moins par rapport aux violettes des acides aminés hydrophobes, de

963,76 ± 176,62 mg/kg ffdm (brunes) et de 1 493,75 ± 424,40 mg/kg ffdm (blanches) (Tableau X).

Entre les fèves ardoisées et les fèves ardoisées-violettes, il n'y a pas de différence significative ; le même constat est fait entre les fèves violettes, brunes et blanches. Toutefois, entre les deux groupes, il y a une différence significative au seuil $P < 0.05$.

Tableau IX. Profil des individus des acides aminés libres totaux hydrophobes, acides et autres à différents stades de fermentation

	Ardoisée	A - V	Violette	Brune	Blanche
Val	280.13 ± 152.732 ^a	433.14 ± 139.796 ^a	856.39 ± 310.524 ^b	868.62 ± 317.383 ^b	1555.26 ± 616.251 ^c
Leu	341.10 ± 171.334 ^a	667.67 ± 359.275 ^a	1716.24 ± 753.896 ^b	1546.29 ± 390.177 ^b	2192.63 ± 286.233 ^b
Ile	297.13 ± 111.123 ^a	405.29 ± 112.373 ^a	708.77 ± 294.718 ^b	674.69 ± 189.113 ^b	852.10 ± 261.295 ^b
Ala	502.50 ± 165.136 ^a	754.10 ± 340.879 ^{ab}	1176.16 ± 298.435 ^{cd}	1051.93 ± 230.776 ^c	1394.19 ± 360.175 ^d
Tyr	441.00 ± 148.176 ^a	-	747.70 ± 367.252 ^b	844.12 ± 132.525 ^b	-
Phe	380.31 ± 201.157 ^a	589.51 ± 400.739 ^a	1686.88 ± 669.102 ^b	1426.26 ± 419.088 ^b	1817.99 ± 695.903 ^b
Total Hydro	2242.17±949.658 ^a	2849.71±1353.062 ^a	6892.14±2693.927 ^b	6411.91±1679.062 ^b	7812.17±2219.857 ^b
Asp	118.56 ± 52.854 ^a	173.15 ± 79.325 ^{ab}	251.94 ± 85.912 ^b	259.82 ± 57.519 ^b	393.33 ± 155.740 ^c
Glu	595.28 ± 256.579 ^a	680.49 ± 314.955 ^a	1149.78 ± 333.126 ^b	1075.82±184.320 ^b	1344.13 ± 447.553 ^b
Asn	527.05 ± 255.145 ^a	810.41 ± 567.521 ^a	926.08 ± 370.028 ^{ab}	905.94± 318.249 ^{ab}	1299.00 ± 578.311 ^b
Gln	219.43 ± 89.713 ^a	172.49 ± 68.260 ^a	247.95 ± 76.751 ^a	212.41 ± 74.815 ^a	291.92 ± 190.878 ^a
His	155.62 ± 128.203 ^a	282.84 ± 223.993 ^{ab}	619.48 ± 354.368 ^{bc}	733.61 ± 214.562 ^c	931.31 ± 386.053 ^c
Total Acides	1615.94±782.494 ^a	2119.38±1254.054 ^{ab}	3195.23±1220.185 ^{bc}	3187.6±849.465 ^c	4259.69±1758.535 ^c
Thr	152.70 ± 62.560 ^a	203.14 ± 82.897 ^a	359.38 ± 123.703 ^b	315.20 ± 60.144 ^b	504.06 ± 118.922 ^c
Gly	124.75 ± 35.544 ^a	154.09 ± 35.336 ^{ab}	260.33 ± 86.364 ^c	219.48 ± 46.874 ^{bc}	343.81 ± 81.972 ^d
Ser	168.91 ± 91.320 ^a	241.42 ± 107.942 ^a	457.77 ± 156.893 ^b	429.08 ± 69.617 ^b	645.88 ± 223.507 ^c
Total Autres	446.36±189.424 ^a	598.65±226.175 ^a	1077.48±366.96 ^b	963.76±176.635 ^b	1493.75±424.40 ^d
Total AA	4304.47±1921.576 ^a	5567.74±2833.291 ^a	11164.85±4281.072 ^b	10563.27±2705.162 ^b	13565.61±4402.793 ^b

III.1.2.2. Acide aminé non – protéique : acide gamma-aminobutyrique (GABA)

La méthode pour la fonction récapitulative graphique est donnée par les boîtes de moustaches. L'acide gamma-aminobutyrique (GABA), a présenté des valeurs comprises entre 1 200 à 2 673 mg/kg ffdm avec une moyenne de 1 667 mg/kg pour les fèves blanches (Fig. 15). Statistiquement, aucune différence significative ($P>0,05$) n'a été observée entre les différents stades de fermentation car la p value associée entre les teneurs en GABA et les couleurs représentant les différents stades de fermentation a été de $P>0,05$.

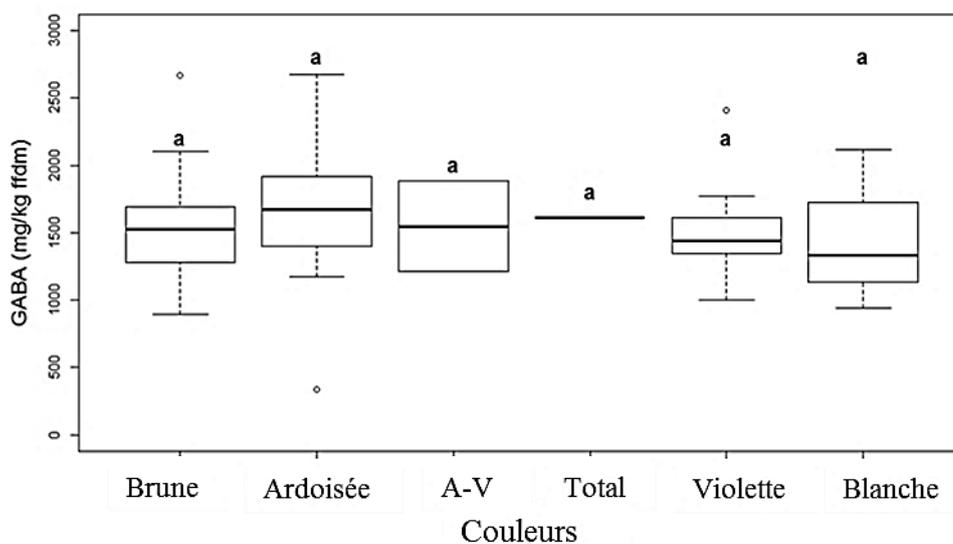


Fig. 15. Variation du contenu de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) dans différentes fèves de cacao à différents stades de fermentation (ardoisée, ardoisée-violette (A-V), violette, brune, blanche et fèves de cacao mixées (total)).

III.1.3. Polyphénols dans les fèves du cacao marchand

III.1.3.1. Teneur en flavonoïdes

L'évaluation de la teneur en flavonoïde (épicatéchine et catéchine) en fonction des couleurs des fèves à différents stades de fermentation présente des valeurs variables. En effet, la forme générale de la boîte à moustaches n'est pas identique pour toutes les couleurs et la teneur en catéchine dans la distribution est moins importante que la teneur en épicatéchine (Fig. 16). Les moustaches inférieures sont bien plus courtes que les moustaches supérieures pour les couleurs brunes et blanches dans les flavonoïdes (épicatéchine et en catéchine).

Cependant, les moustaches inférieures sont plus longues que les moustaches supérieures pour la couleur violette (Fig. 16).

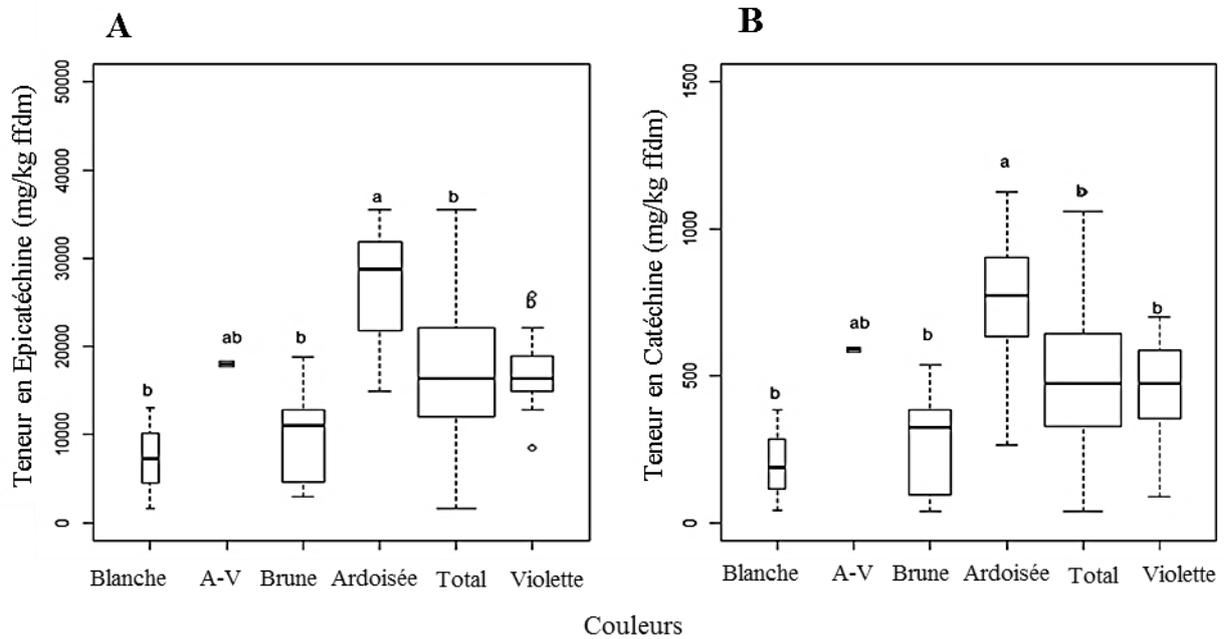


Fig. 16. Variation du contenu de l'épicatéchine (A) et de la catéchine (B) dans différentes fèves de cacao à différents stades de fermentation.

Les valeurs avec des lettres différentes dans un même graphique sont significativement différentes au seuil de 5 %.

L'analyse des flavonoïdes a présenté des teneurs moyennes en épicatechine comprises entre 30 000 mg, 15 000 mg, 10 000 mg et 8 000 mg pour les fèves ardoisées, violettes, blanches et brunes, respectivement. La teneur moyenne en catéchine a été de 700 mg (fèves ardoisées), 450 mg (fèves violettes), 200 mg (fèves blanches) et 300 mg (fèves brunes). Le contenu d'épicatéchine et de catéchine a été sensiblement plus élevé dans les fèves ardoisées par rapport aux autres stades de fermentation (Fig. 16). La fermentation réduit la teneur en flavonoïdes des fèves de cacao. L'analyse statistique n'a présentée aucune différence significative entre les fèves blanches, brunes et violettes, pour l'épicatéchine et la catéchine (Fig. 16).

III.1.3.2. Teneur en anthocyanines

L'analyse de la teneur en anthocyanine en fonction des couleurs des fèves à différents stades de fermentation, la teneur en cyanidine-3-arabinoside et en cyanidine-3-galactoside ont été étudiées. Ces deux anthocyanines présentent une distribution relativement similaire entre

les couleurs des fèves à différents stades de fermentation. La distribution de la teneur en cyanidine-3-arabinoside et en cyanidine-3-galactoside dans des fèves de cacao a montré une prépondérance dans les échantillons ardoisés avec des quantités de 2 840 mg/kg ffdm et de 4 789 mg/kg ffdm respectivement (Fig. 17). Les teneurs des fèves ardoisées sont plus élevées suivies des teneurs des fèves ardoisées-violettes. Les autres couleurs de fèves ont une teneur faible proche du total moyen.

Les moustaches sont asymétriques, les moustaches inférieures sont inexistantes contrairement aux moustaches supérieures qui sont observées dans tous les stades de fermentation excepté le stade ardoisé. Cependant, le cyanidine-3-arabinoside présente les moustaches supérieures et longues chez les fèves ardoisées et violettes (Fig. 17).

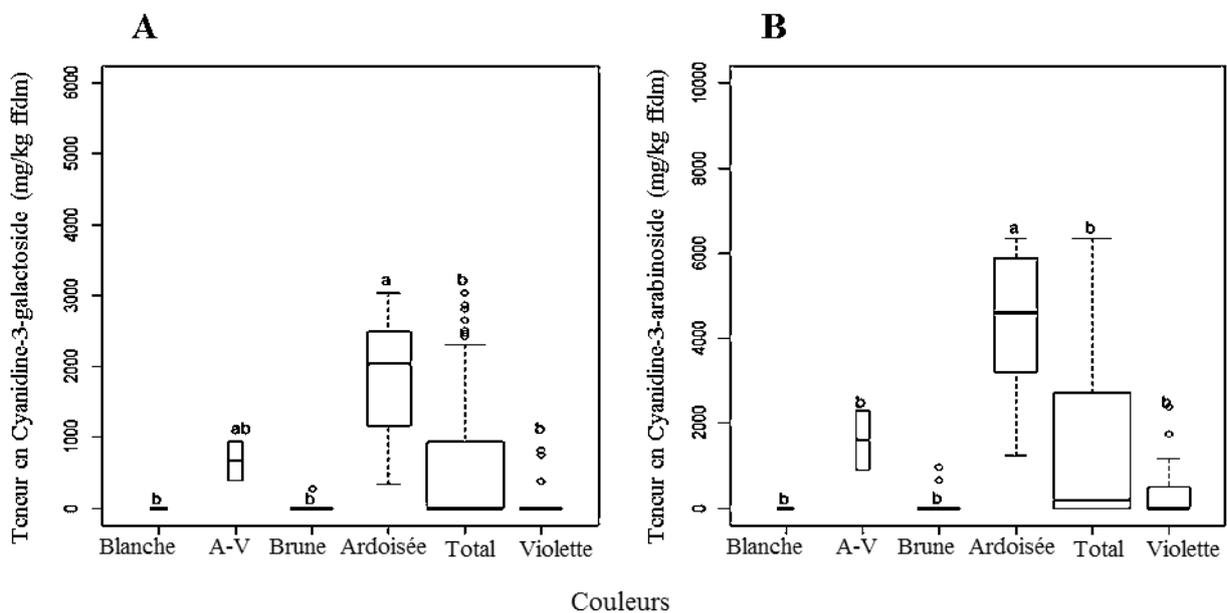


Fig. 17. Variation du contenu de Cyanidine-3-galactoside (A) et cyanidine-3-arabinoside (B) dans les fèves à différents stades de fermentation (ardoisée ardoisée-violette (A-V), violette, brune, blanche et fèves de cacao mixées (total)). Les valeurs avec des lettres différentes dans un même graphique sont significativement différentes au seuil de 5 %.

Bien que, la distribution soit découpée en 4 zones (quartiles) de même effectif (25 %) chez les fèves ardoisées, les plages de teneur en anthocyanine diffèrent en fonction des couleurs (Fig. 17). La quantité totale de cyanidine-3-arabinoside a été 3 fois plus élevée que celle du cyanidine-3-galactoside.

III.1.3.3. Corrélation entre les couleurs et les marqueurs biochimiques des fèves

La corrélation entre les couleurs caractéristiques des différents stades de fermentation et les marqueurs biochimiques des fèves a été évaluée par analyse en Composante Principale (APC). En effet, 22 marqueurs de qualité des fèves de cacao ont été étudiés. Il s'agit des flavonoïdes (épicatéchine et catéchine), des anthocyanines (cyanidine-3-arabinoside et cyanidine-3-galactoside) et les acides aminés. L'ACP a indiqué que les couleurs des fèves de cacao marchand ont été bien discriminées les unes des autres selon les constituants biochimiques (Fig. 18).

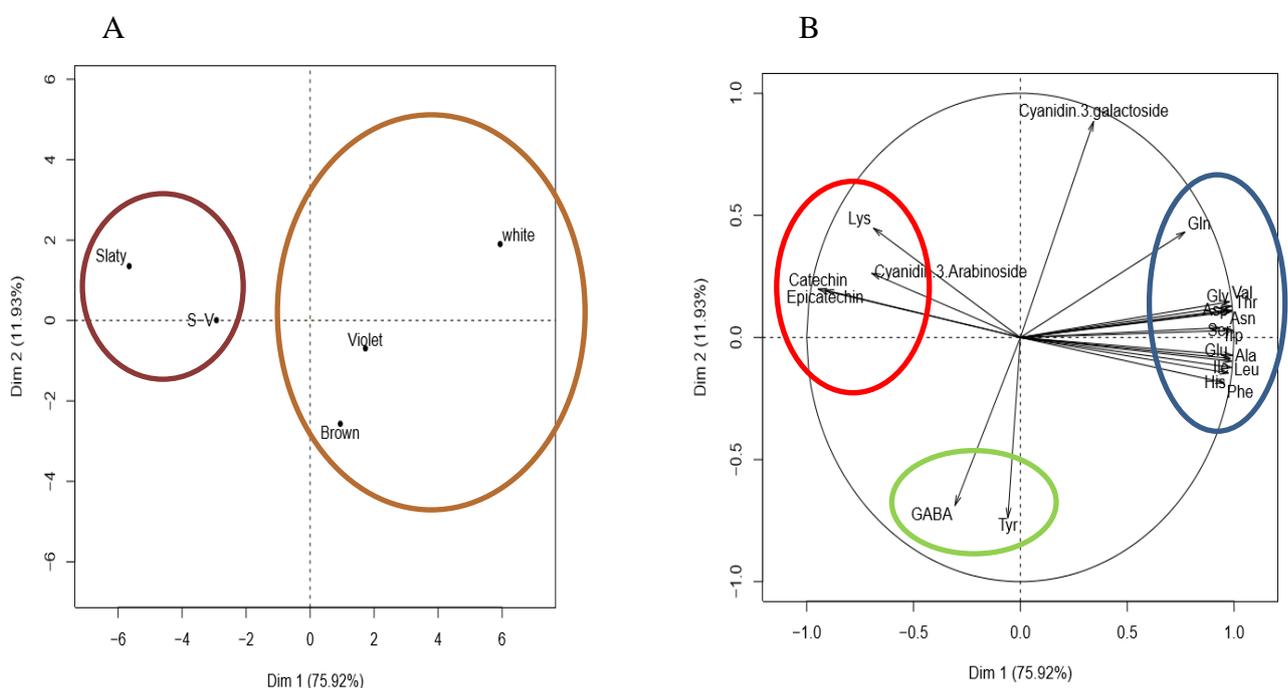


Fig. 18. Analyses en composantes principales de la composition biochimique des fèves de cacao marchand à différents stades de fermentation selon leurs attributs biochimiques. (A) nuage de points des stades de fermentation des fèves de cacao (B) Cercle de corrélation de l'ACP entre les différents attributs biochimiques.

Selon les deux premiers axes de cette ACP, 87,84 % de la variance totale est expliquée. Ce pourcentage de variance totale est expliqué à 75,92 % par la première composante principale (Dim 1) et à 11,93 % par la seconde composante principale (Dim 2).

Suivant ces deux premières composantes trois groupes bien distincts (cercles verte, bleu et rouge) se discriminent dans le cercle des corrélations. En effet, Dim 1 est fortement corrélé du côté positif par les fortes teneurs en acides aminés (par exemple Asp et Asn) qui conditionne dans le nuage de points la discrimination des différents stades de fermentation caractérisés par les couleurs blanche, violette et brune. Tandis que, dim 2 est fortement

corrélé du côté positif par les fortes teneurs en flavonoïde (épicatechine et catéchine), en acide aminé (lysine) et en cyanidine-3-araboside et également corrélé par de faibles teneurs en acides aminés. Alors que, suivant la Dim 2, la teneur élevée en GABA et tyrosine conditionne la discrimination des nuages de points violette et brune où on a des valeurs faibles en cyanidine-3-galatoside.

III.1.4. Teneur des acides aminés libres dans les fèves au cours de l'incubation chez 3 génotypes

III.1.4.1. Acides aminés hydrophobes

Les acides aminés hydrophobes identifiés dans cette étude sont : l'alanine, la leucine, la phénylalanine, la tyrosine, la valine et l'isoleucine.

III.1.4.1.1. Génotype T79/501

La teneur en acides aminés hydrophobes dans cet échantillon a été évaluée entre 100 et 550 mg/g ffdm au jour 0 dans les traitements 1, 2, 3 et 4.

La concentration en alanine (500 mg/g ffdm) et tyrosine (550 mg/g ffdm) respectivement dans les traitements 1, 2 et 3 est plus élevée par rapport à d'autres acides aminés hydrophobes observés dans ce génotype. Aucune différence significative n'a été observée entre l'alanine et la tyrosine au jour 0, cependant, entre ses deux acides et les autres du même jour, une différence significative est notée.

La teneur des acides aminés hydrophobes du génotype T79/501 montre une même tendance au cours des traitements 1, 2, 3 et 4 pendant les deux premiers jours. Après le deuxième jour, suite au changement du milieu, on note une diminution des acides aminés dans les traitements 1 et 3 et une augmentation au jour 5 dans les traitements 2 et 4. Dans le traitement 1, on note l'effet délétère de l'acide acétique uniquement sur les acides aminés après un séjour de plus 4 jours dans ce milieu d'incubation. Les valeurs des acides aminés hydrophobes sont comprises entre 700 mg/g ffdm et 1 400 mg/g ffdm pour la leucine et l'alanine dans les 4 traitements avec une différence significative entre la leucine, la phénylalanine et l'alanine exception faite dans le traitement 1 (Fig. 19).

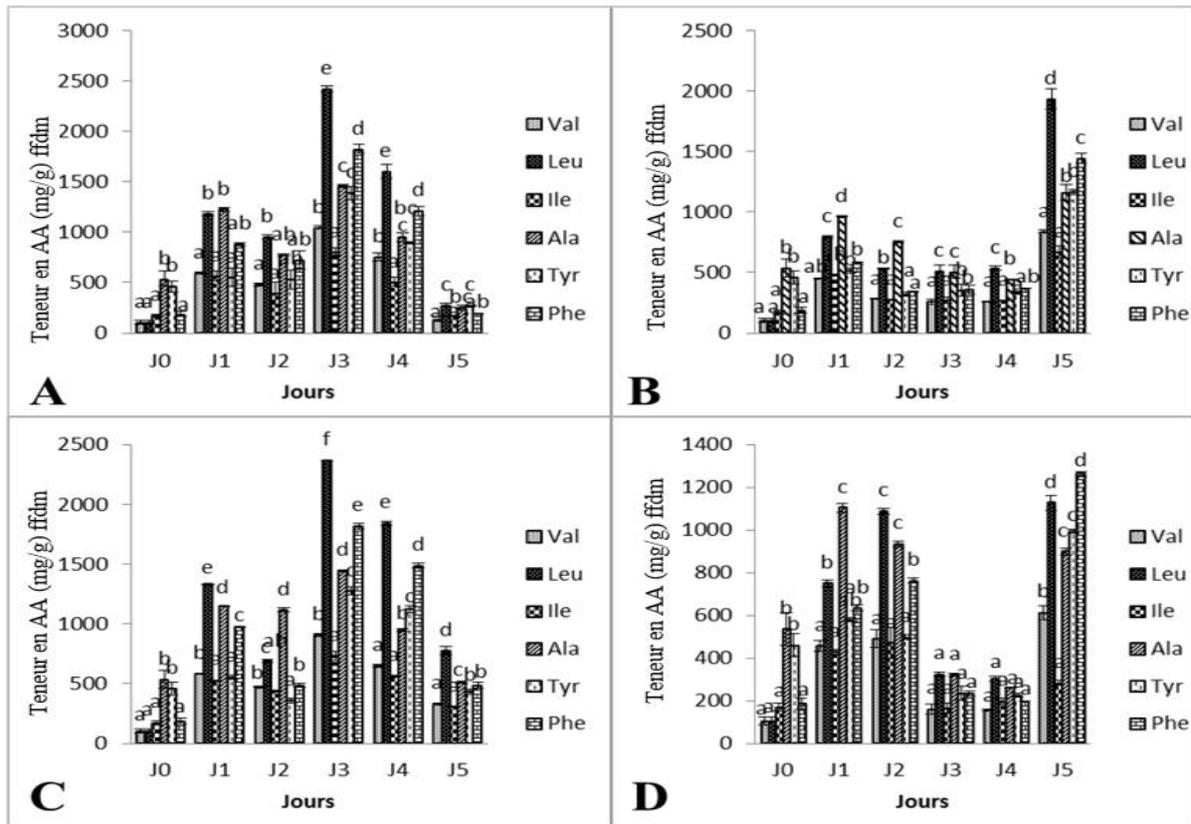


Fig. 19. Variation en teneur des acides aminés hydrophobes libres des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez T79/501. (A : traitement 1 = fèves incubées à l'acide acétique ; B : traitement 2 = acide lactique + acide acétique puis acide acétique ; C : traitement 3 = acide lactique puis acide acétique ; D: traitement 4 = acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

De même au jour 3 pour les traitements 1 et 3 respectivement, la leucine (2 400 mg/g ffdm), la phénylalanine (1 800 mg/g ffdm) et la leucine (1 800 mg/g ffdm) a été marqué par une différence significative dans chaque traitement. Une légère diminution a été notée au jour 3 pour les traitements 2 et 4 où les valeurs sont comprises entre 500 et 400 mg/g ffdm respectivement.

Les acides aminés hydrophobes diminuent au jour 5 pour les traitements 1 et 3 et les valeurs sont comprises entre 250 et 400 mg/g ffdm excepté la leucine (700 mg/g ffdm). Par contre, une augmentation est notée dans le traitement 2 ainsi que la différence significative entre les acides aminés. La même observation a été faite pour le traitement 4 mais sans aucune différence significative entre la leucine (1 100 mg/g ffdm) et la phénylalanine (1 300 mg/g ffdm) respectivement (Fig. 19).

Dans le génotype T79/501, l'alanine, la leucine et la phénylalanine ont eu des valeurs élevées au cours du temps et ce dans tous les traitements.

III.1.4.1.2. Génotype ICS40

Dans ce génotype, la distribution est pareille dans tous les traitements. Les teneurs en acides aminés libres commencent à montrer des fluctuations des valeurs dès les premiers jours (jour 1 et 2) (Fig. 20). Ces fluctuations diminuent à partir du jour 3, puis gardent une certaine stabilité entre le jour 4 et le jour 5.

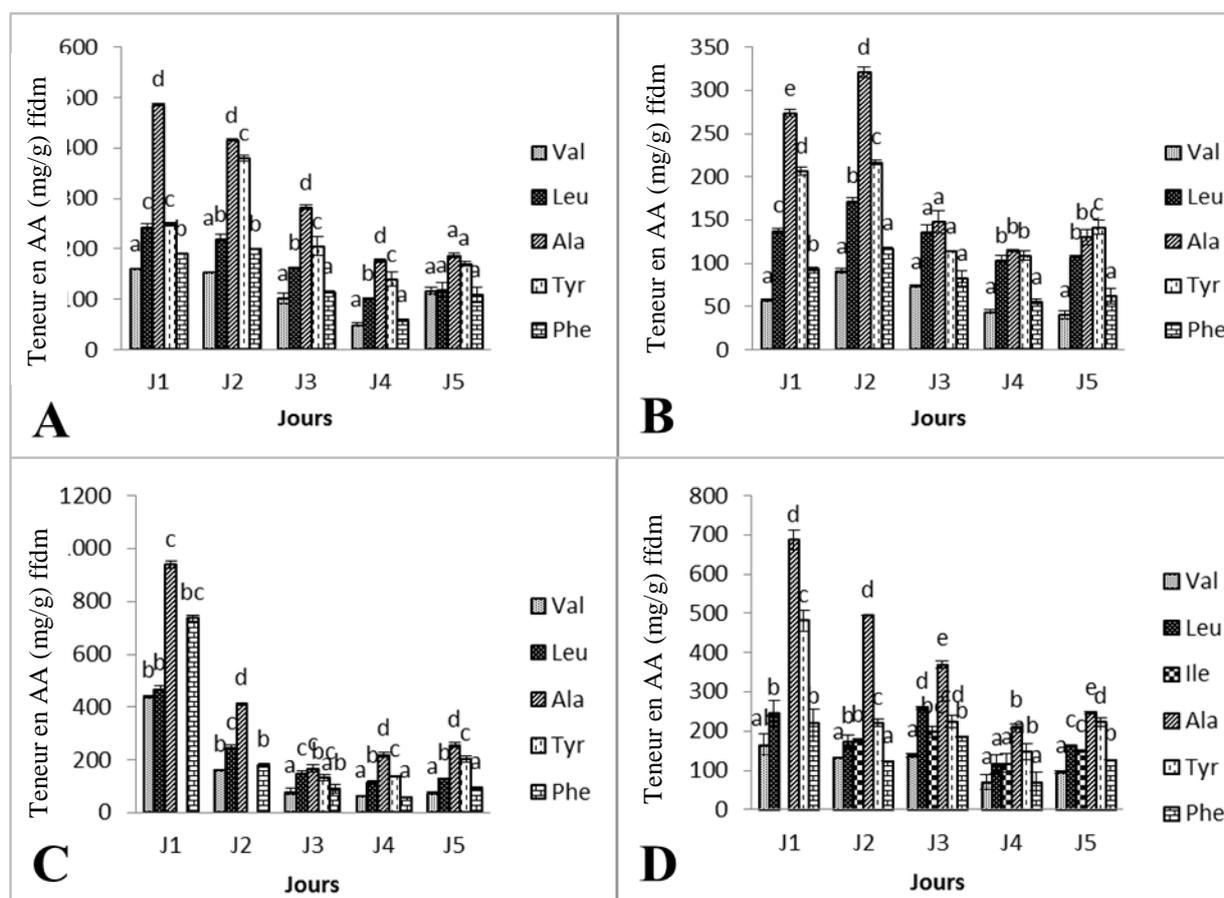


Fig. 20. Variation en teneur des acides aminés hydrophobes libres des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez ICS40. (A : traitement 1= acide acétique ; B : traitement 2= acide lactique + acide acétique puis acide acétique; C: traitement 3= acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4= acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

De manière générale, la teneur des acides aminés hydrophobes du génotype ICS40 montre une diminution au cours de l'incubation et ce dans tous les traitements. Le traitement 1 présente une différence significative entre le jour 2 et le jour 5 de même que le traitement 2.

Cependant, le traitement 3 ne présente pas de différence significative entre le jour 2 et le jour 5 de même que le traitement 4.

Les traitements 1, 2 et 3 ont synthétisé 5 acides aminés, tandis que le traitement 4 en a 6 soit un acide aminé (Ile) de plus.

Dans le génotype ICS40, les acides aminés dominants avec des concentrations élevées au cours de l'incubation et ce dans tous les traitements sont l'alanine, la leucine et la tyrosine (Fig. 20).

III.1.4.1.3. Génotype German cocoa

Les teneurs en acides aminés hydrophobes chez German cocoa, dans les fèves non incubées (jour 0) présentent des valeurs élevées dans tous les traitements et au cours de l'incubation.

Cependant, au début de l'incubation (jour 1), les teneurs ne changent pas vraiment de celles du jour 0, excepté dans le traitement 3. Les traitements 1 et 3 ont la même tendance (synthèse des acides aminés) tandis que les traitements 2 et 4 présentent également la même tendance avec des différences significatives entre certains acides aminés (Fig. 21). Au jour 2, le milieu d'incubation change, une légère augmentation des acides aminés est notée. Cette augmentation continue au jour 3, aucune différence significative n'est notée entre ses acides et entre les traitements. A partir du jour 4, une diminution des acides aminés est observée dans le milieu avec une différence significative entre les traitements mais pas entre les acides aminés. De façon générale, une diminution continue des acides aminés est observée à partir du jour 4 (Fig. 21).

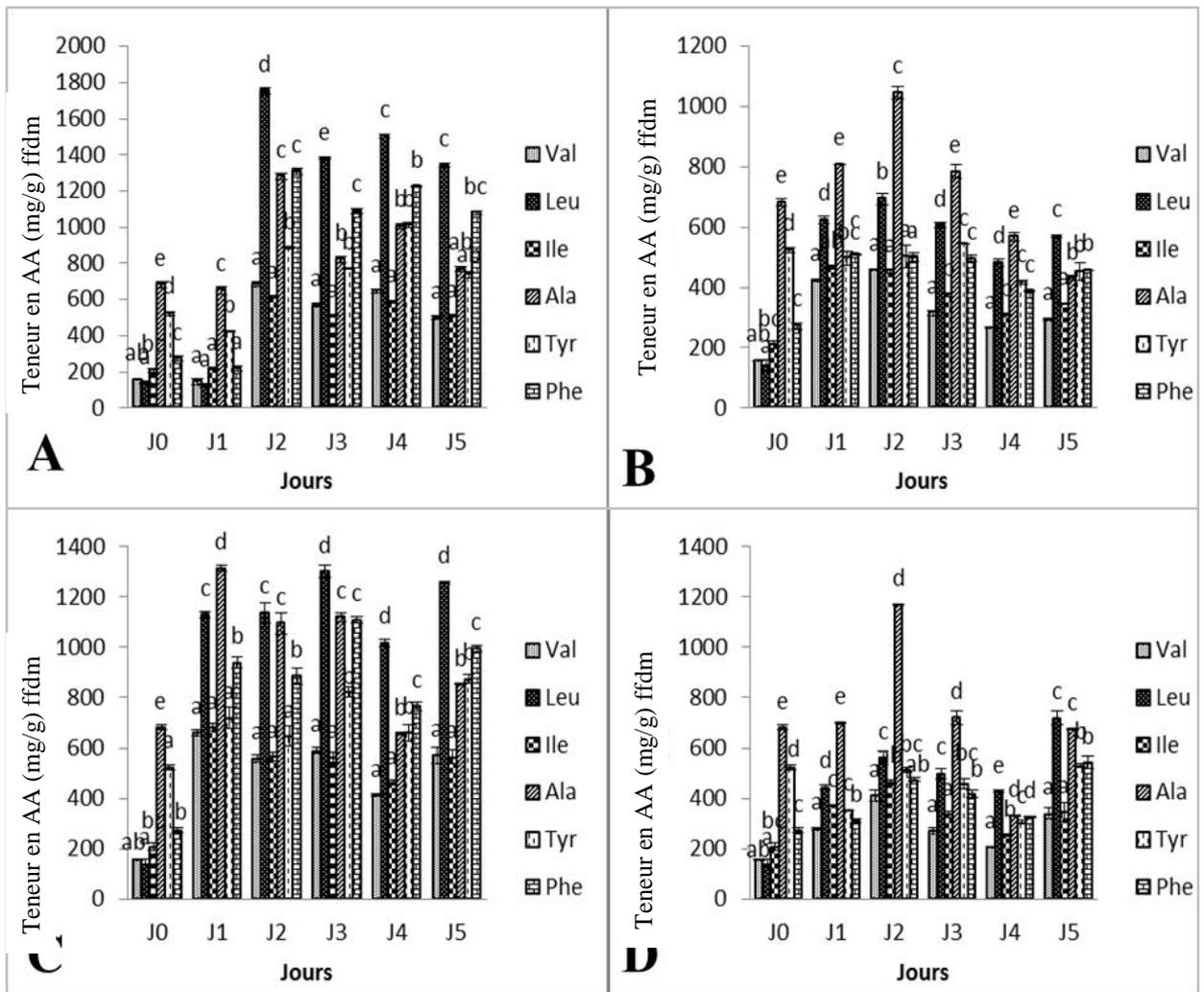


Fig. 21. Variation en teneur des acides aminés libres hydrophobes des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez German cocoa. (A : traitement 1= acide acétique ; B : traitement 2= acide lactique + acide acétique puis acide acétique ; C: traitement 3= acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4= acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

III.1.4.2. Acides aminés acides

Les acides aminés acides sont constitués de l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine, l'acide glutamique et d'histidine.

La teneur approximative de ces acides aminés libres est comprise entre 98, 100 et 150 – 1 770 mg/g ffdm pour les traitements 4, 1, et 3 respectivement chez T79/501 (Fig. 22).

Les teneurs comprises entre 93 – 850 et 580 mg/g ffdm pour les traitements 1 et 3 respectivement, 95 - 580 mg/g ffdm pour le traitement 2 et 93 - 1425 mg/g ffdm pour le traitement 4 chez ICS40 (Fig. 23).

Les teneurs obtenues sont situées entre (200 – 2 000 mg/g ffdm) dans tous les traitements du géotype German cocoa (Fig. 24).

III.1.4.2.1. Géotype T79/501

Ce géotype montre une variation entre les traitements. En effet, du jour 2 au jour 5 du traitement 1 et du traitement 3, on note une diminution des acides aminés avec une différence significative entre les acides aminés mais pas entre les deux traitements. On obtient 3 acides aminés au jour 5 dans les deux traitements contrairement aux traitements 2 et 4 au jour 5 où l'on note la présence de cinq acides aminés. Ces acides aminés libres montrent une distribution irrégulière dans les traitements avec des teneurs comprises entre 200 – 185 mg/g ffdm et 100 – 430 mg/g ffdm des jours 0 et 5 respectivement du traitement 1, le traitement 2 montre des teneurs comprises entre 200 – 1 700 mg/g ffdm et 300 – 1 400 mg/g ffdm des jours 0 et 5 respectivement. De même, des teneurs de 220 – 1 780 mg/g ffdm et 220 – 700 mg/g ffdm des jours 0 et 5 respectivement du traitement 3, et enfin, le traitement 4 présente des teneurs approximativement de 220 – 1 780 mg/g ffdm et 220 – 990 mg/g ffdm (Fig. 22).

La teneur élevée en glutamine a été enregistrée dans les 4 traitements et fait de cet acide, l'acide aminé dominant de ce géotype. De plus, la présence de l'asparagine, la glutamine et l'acide aspartique a été notée dans les fèves non incubées et au cours de l'incubation avec des différences significatives entre eux mais pas entre les traitements.

Au début de l'incubation (jour 1), 5 acides aminés apparaissent dans les traitements 1, 2, 3 et 4. Mais aux jours 2, 3 et 4, ces acides disparaissent dans les traitements 2 et 4 pour réapparaître au jour 5. Par contre, aucune différence significative n'a été notée entre les acides aminés (asparagine et acide aspartique) des jours 3 et 4 des traitements 1 et 3.

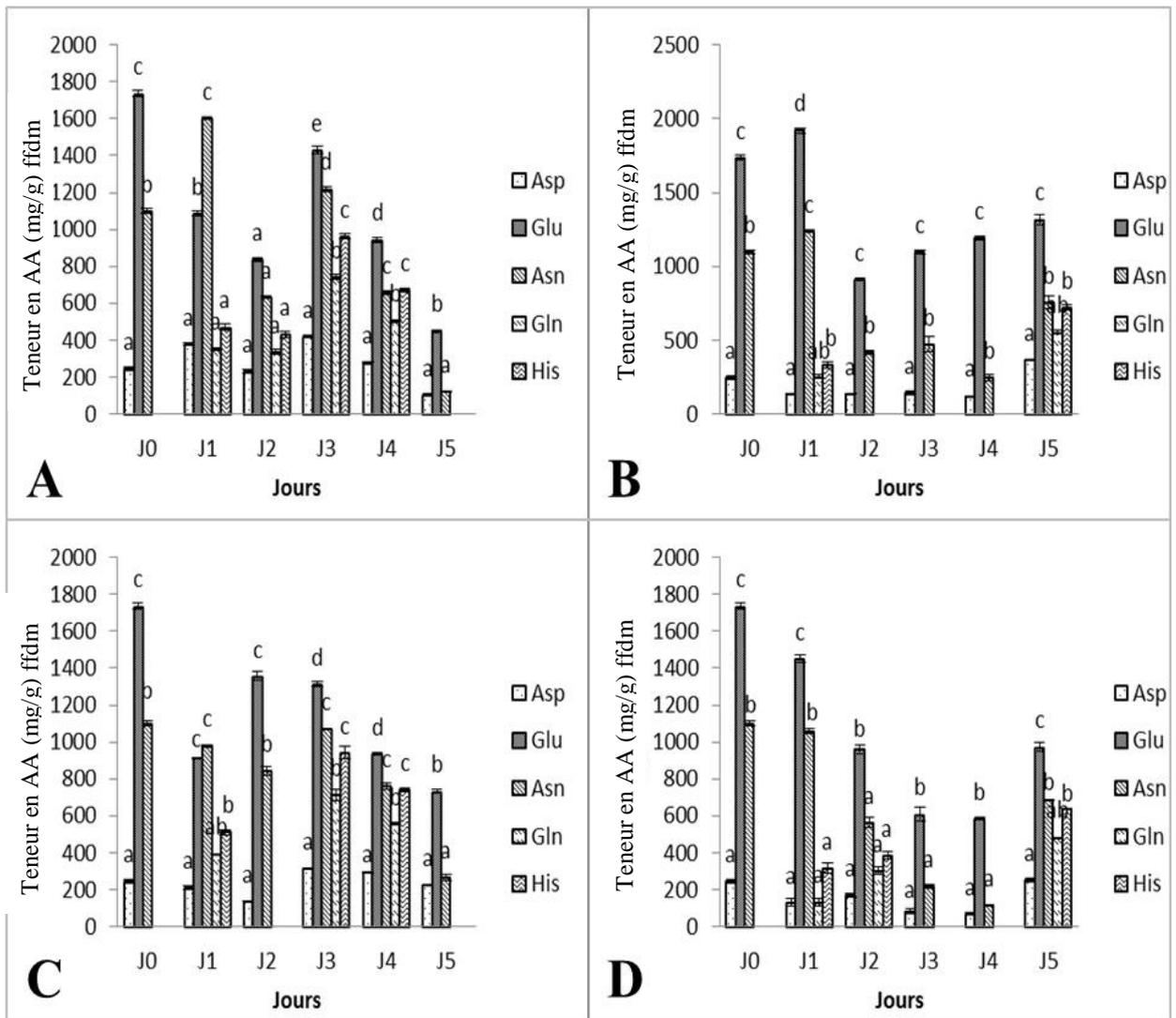


Fig. 22. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez T79/501. (A : traitement 1 = acide acétique; B: traitement 2 = acide lactique + acide acétique puis acide acétique; C: traitement 3 = acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4 = acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

III.1.4.2.2. Génotype ICS40

Les quatre traitements présentent une diminution des acides aminés au cours du temps mais sans aucune différence significative entre les traitements.

En effet, l'analyse des acides aminés acides a révélé la présence de 3 acides aminés (asparagine, glutamine et l'acide aspartique) dans tous les traitements exceptés le traitement 3 (Fig. 23).

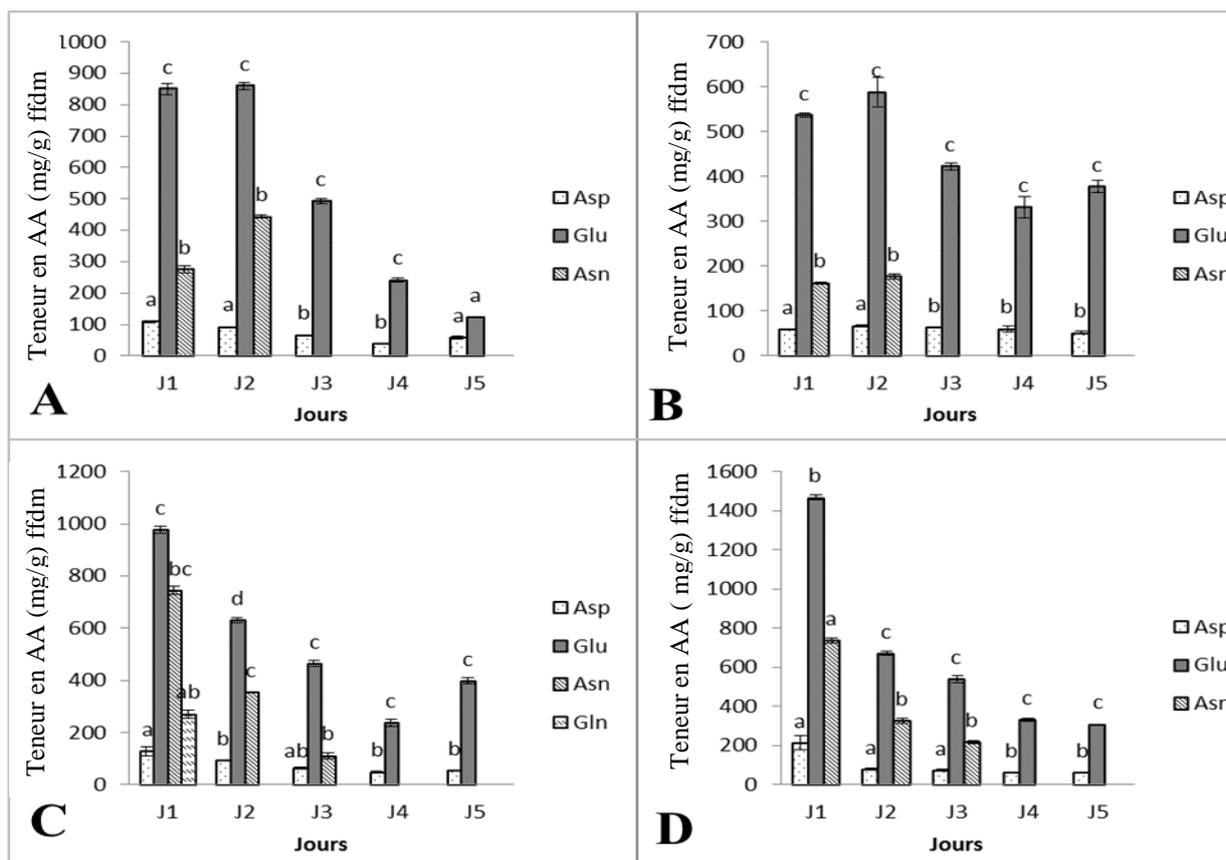


Fig. 23. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez ICS40.

(A : traitement 1= acide acétique; B: traitement 2= acide lactique + acide acétique puis acide acétique; C: traitement 3= acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4= acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

Les teneurs des acides varient entre 20 – 980 mg/g ffdm, 96 – 600 mg/g ffdm, 100 – 980 mg/g ffdm et 200 – 1 450 mg/g ffdm des traitements 1, 2, 3 et 4 respectivement. Les traitements 1 et 2 présentent 3 acides aminés au jour 1 et 2, sans différence significative. Le traitement 3 révèle au début de l'incubation 4 acides aminés acides (asparagine, glutamine, l'acide glutamique et l'acide aspartique). Ces acides disparaissent progressivement au cours de l'incubation (du jour 3 jusqu'au jour 5), ce qui correspond au changement du milieu d'incubation pour les traitements 1 et 2. Par contre, l'acide (Asn) disparaît au jour 4 jusqu'au jour 5 des traitements 3 et 4, (Fig. 23).

III.1.4.2.3. Génotype German cocoa

Chez German cocoa, les acides aminés acides sont constitués de l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine, l'acide glutamique et d'histidine.

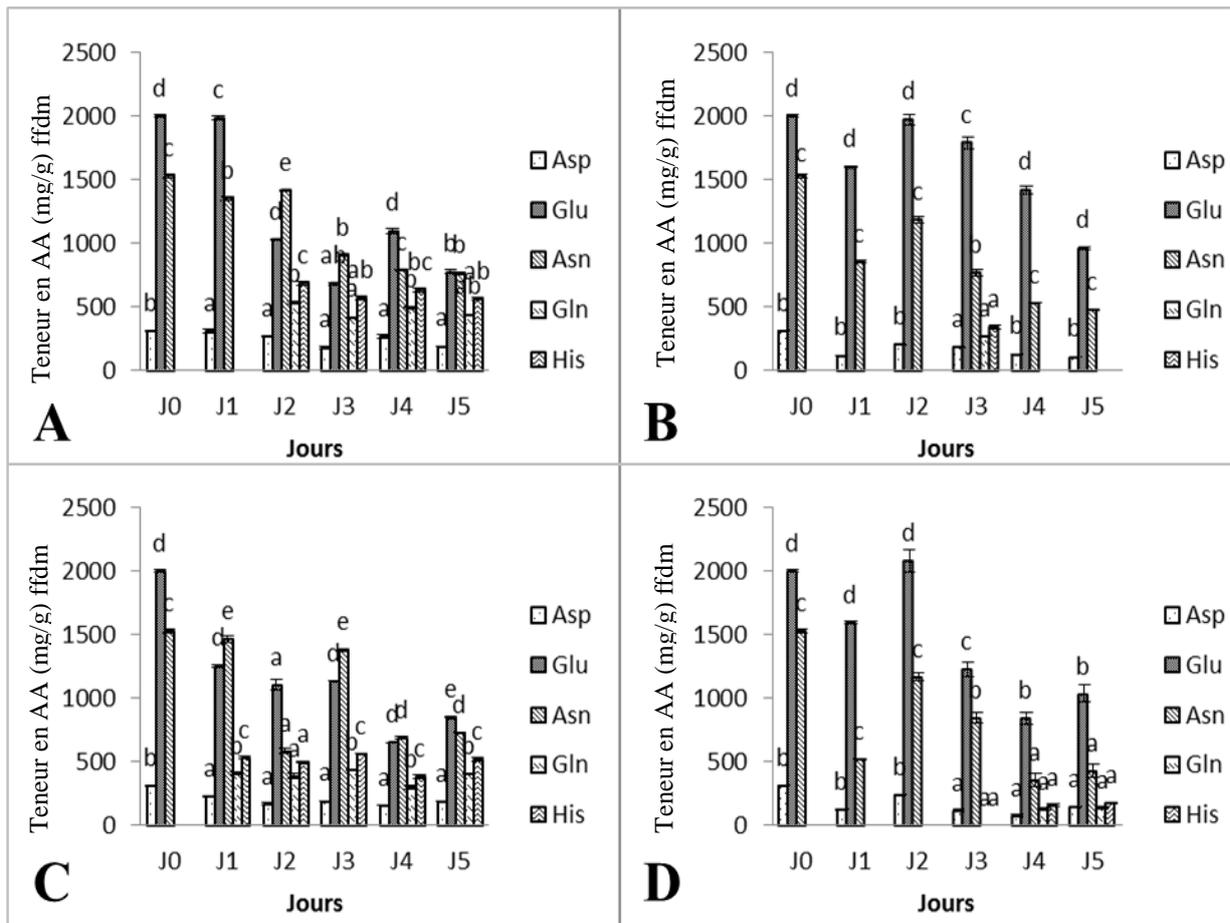


Fig. 24. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez German cocoa. (A : traitement 1 = acide acétique; B: traitement 2 = acide lactique + acide acétique puis acide acétique; C: traitement 3 = acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4 = acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

L'apparition et la teneur de ces acides aminés varient d'un traitement à l'autre. Dans le traitement 2, on note une diminution mais également la disparition de 2 acides aminés au jour 5. L'acide aminé dominant dans les quatre traitements est le glutamate qui présente par ailleurs une différence significative avec les autres acides aminés acides (Fig. 24). Les traitements 1, 2 et 4, ont été notés au jour 0 et 1, une teneur approximative de 2 000 mg/g ffdm de la glutamine, l'asparagine et l'acide aspartique (Fig. 24).

Au jour 2, il y a changement de milieu d'incubation, l'apparition de 2 autres acides (l'histidine et l'acide glutamique) a été notée dans les traitements 1 et 3. Toutefois, ces acides (l'histidine et l'acide glutamique) apparaissent au jour 3 dans le traitement 2, puis, leur absence est notée jusqu'à la fin de l'incubation.

III.1.4.3. Autres acides aminés libres

Les autres acides aminés libres : tryptophane, lysine, thréonine, sérine, glycine, arginine et lysine ont été répertoriés dans ces échantillons.

III.1.4.3.1. Génotype T97/501

L'essai d'analyse de variance des 4 traitements a montré l'existence d'un effet significatif entre les différents traitements.

La teneur en lysine a varié entre 2 500 et 3 000 mg/g ffdm pour les traitements 1, 3 et 4 ; mais, cette teneur a été de 2 000 et 2 500 mg/g ffdm dans le traitement 2 (Fig. 25). La teneur moyenne en lysine présente une différence significative entre les traitements de ce génotype.

Cependant, les teneurs moyennes provenant des différents jours ne sont pas statistiquement différentes, sauf quelques exceptions dans les traitements. Pour le traitement 1, une différence significative a été notée entre la lysine et l'arginine aux jours 3 et 4. La différence significative a été notée entre le tryptophane et la lysine du traitement 2. Dans le traitement 3, cette différence significative est observée entre la sérine, le tryptophane et la lysine au jour 3. Finalement, dans le traitement 4, la différence significative a été notée entre le tryptophane, l'arginine, la lysine.

A la fin de l'incubation (jour 5), 2 acides aminés (lysine et tryptophane) ont été obtenus sans aucune différence significative entre eux dans le traitement 1. Dans le traitement 3, au jour 5, 3 acides aminés (sérine, tryptophane et lysine) ont été notés avec une différence significative entre la lysine et 2 autres (sérine et tryptophane). Dans les traitements 2 et 4, 5 acides aminés (arginine, absent) et 6 acides aminés (Thr, Gly, Ser, Trp, Arg et Lys) ont été enregistrés respectivement (Fig. 25).

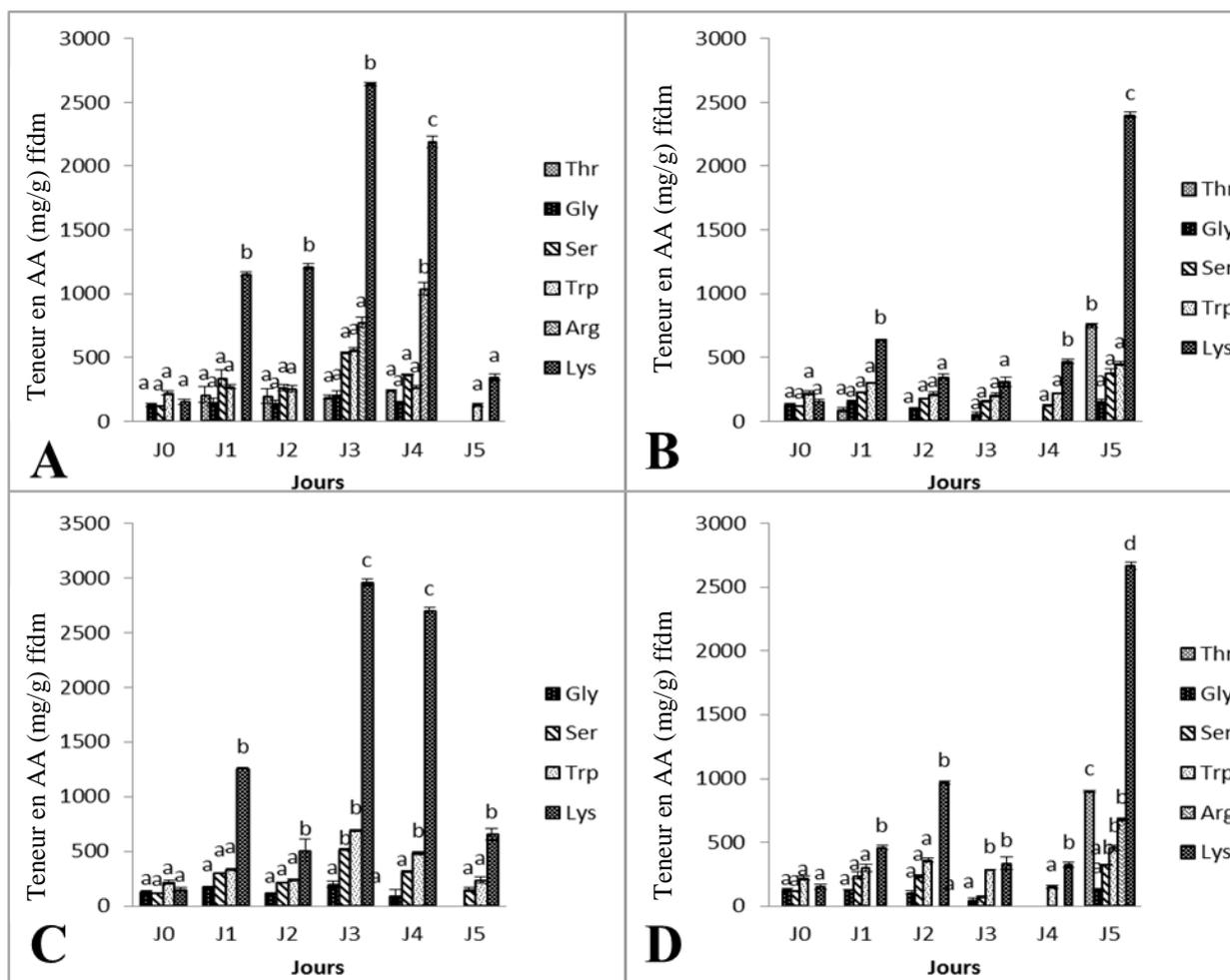


Fig. 25. Variation en teneur des autres acides aminés libres des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez T79/501. (A: traitement 1= acide acétique; B: traitement 2= acide lactique + acide acétique puis acide acétique; C: traitement 3= acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4= acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

III.1.4.3.2. Génotype ICS40

Les acides aminés acides présents et de façon constante dans ICS40 sont : la thréonine, le tryptophane et la lysine. Chez ce génotype, une faible production en acides aminés (200 – 2200 mg/g) a été observée et ce dans tous les traitements (Fig. 26).

La lysine a été notée dans tous les traitements et sa concentration est élevée au cours de l'incubation. Au début de l'incubation (jour 1), 5 AA sont présents dans tous les traitements sauf le traitement 2 où 3 AA apparaissent. Dans le traitement 3, la lysine atteint 780 mg/g ffdm, mais, une diminution est notée au cours de l'incubation. D'après l'analyse de variance des jours 3, 4 et 5, aucune différence significative n'a été observée dans les

traitements 2 et 4. Par contre, au jour 3 dans tous les traitements, une disparition des acides aminés de départ est notée.

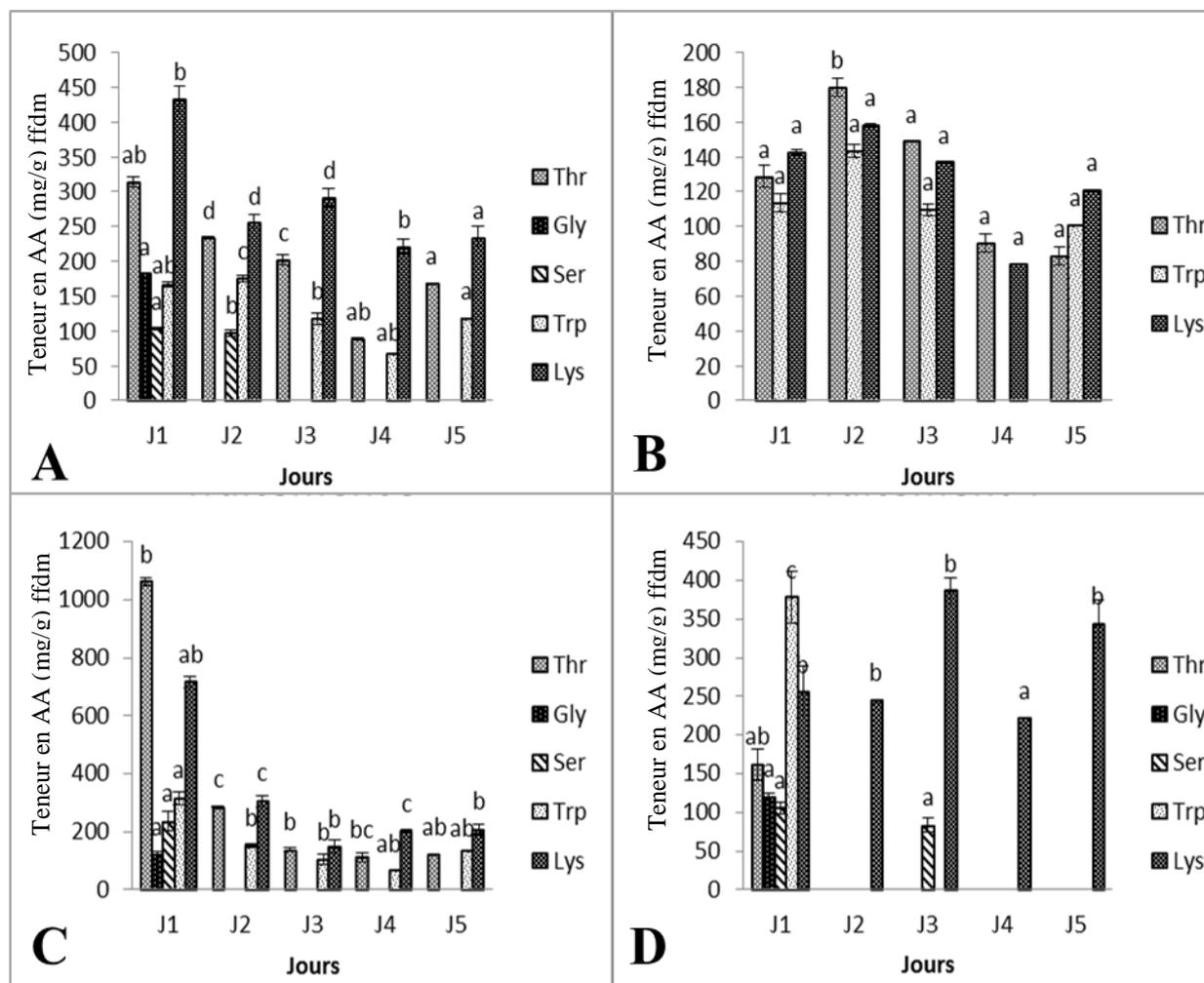


Fig. 26. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/g ffdm) chez ICS 40. (A: traitement 1 = acide acétique; B: traitement 2 = acide lactique + acide acétique puis acide acétique; C: traitement 3 = acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4 = acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

De façon constante, la lysine et le tryptophane demeurent jusqu'à la fin de l'incubation et une différence significative est notée entre eux dans les traitements 1 et 3. De manière générale, les acides ont un effet délétère sur ce génotype (Fig. 26).

III.1.4.3.3. Génotype German cocoa

La teneur des autres acides aminés sont similaires dans tous les traitements. En effet, une augmentation croissante est notée du jour 0 au jour 5 avec une différence significative dans la concentration de chaque acide aminé.

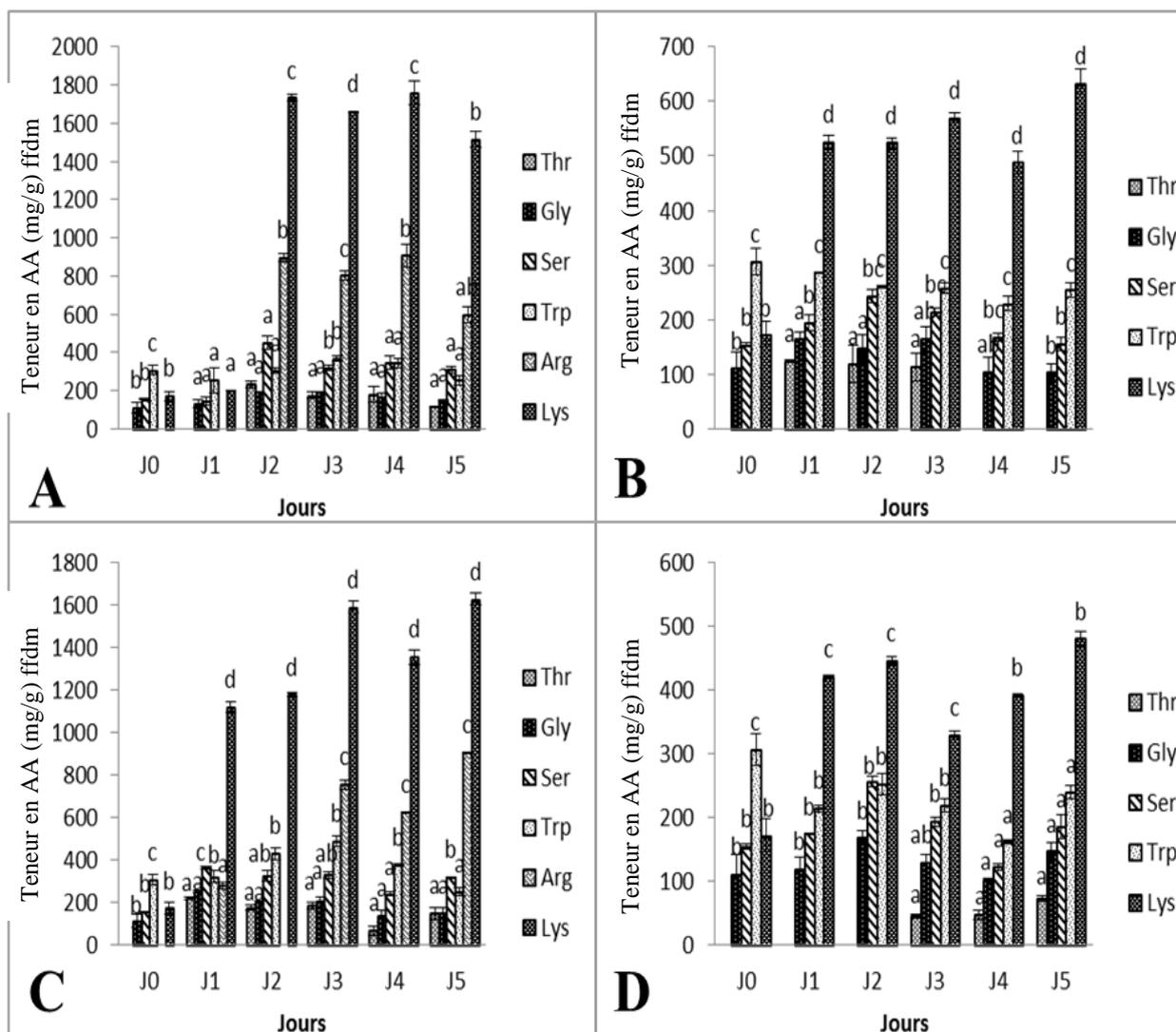


Fig. 27. Variation en teneur des acides aminés libres acides des fèves incubées et non incubées séchées de cacao (mg/kg ffdm) chez German cocoa. (A: traitement 1= acide acétique; B: traitement 2= acide lactique + acide acétique puis acide acétique; C: traitement 3= acide lactique puis acide acétique; D: traitement 4= acide lactique puis acide lactique + acide acétique).

Tous les autres acides aminés libres (Thr, Gly, Ser, Trp, Arg et Lys) sont présents dans les traitements 1 (incubation à l'acide acétique) et 3 (incubation à l'acide lactique puis acide acétique). Cependant, l'arginine est absente dans les traitements 2 et 4. Dans les fèves non incubées (jour 0), aucune différence significative n'a été notée entre la lysine, le tryptophane, la sérine, et la glycine.

La lysine est l'acide aminé dominant dans les traitements 2 et 3 et aucune différence significative n'a été observée entre la lysine des 2 traitements et même entre les jours. De façon générale, une augmentation des autres acides aminés a été notée. La teneur maximale

en lysine varie suivant les traitements, cette teneur a été de 480 et 620 mg/kg ffdm dans les traitements 4 et 2 respectivement et de 1 570 et 1 700 mg/g ffdm dans les traitements 4 et 5 respectivement (Fig. 27).

III.1.4.4. Teneur en acide γ -Aminobutyrique (GABA) dans les 3 géotypes

La teneur de l'acide γ -aminobutyrique observée dans les fèves non incubées et incubées varie entre 100 et 1 180 mg/kg ffdm. Tous les acides aminés libres ont une teneur moyenne maximale de 970 mg/g ffdm chez ICS40, 1 180 mg/kg ffdm chez German cocoa et 1 100 mg/kg chez T79/501 (Fig. 28).

Dans le géotype ICS40, le GABA au cours du traitement 4, diminue dans le temps mais sans aucune différence significative. De plus, on note chez GC, une diminution de GABA dans le temps et dans les traitements 3 et 1 avec une différence significative entre le jour 2 et le jour 5. Cependant, le géotype T79/501 montre une différence significative entre le jour 2 et le jour 5 avec des teneurs de GABA élevées dans les traitements 2 et 4.

De manière générale, les résultats montrent des teneurs variables en acides aminés au cours du temps et ce en fonction du géotype et du milieu d'incubation. Des teneurs élevées de GABA ont été enregistrées dans le traitement 3 suivi de T1 des géotypes T79/501 et German cocoa. Quoique les géotypes (T79/501, ICS40 et German cocoa) aient enregistré des valeurs faibles en GABA dans les traitements 4 et 2, la teneur en GABA diminuent au cours de l'incubation (Fig. 28).

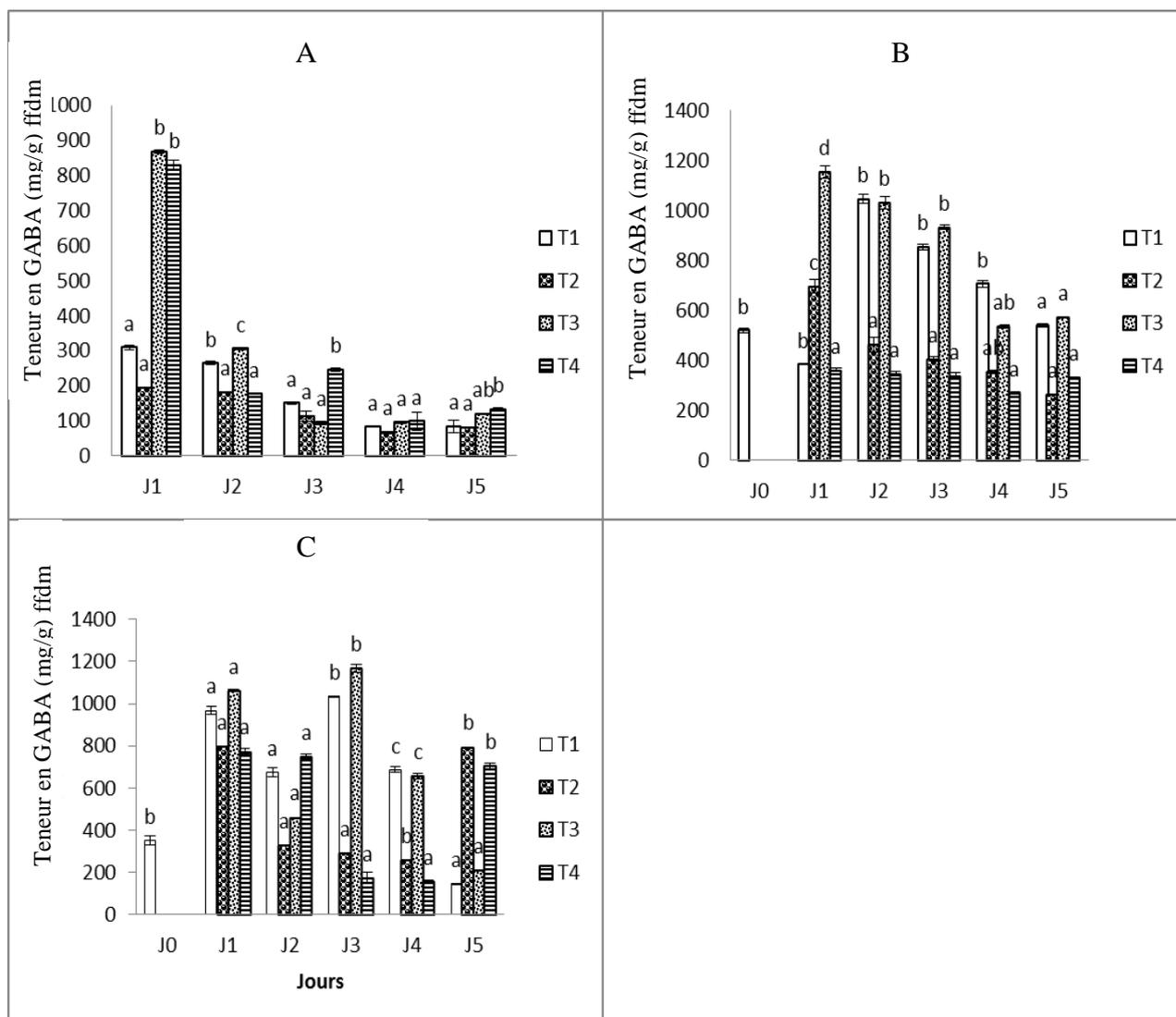


Fig. 28. Teneur en acide γ -Aminobutyrique dans les fèves de cacao incubées et non incubées séchées (mg/kg ffdm) chez A: ICS 40, B: German cocoa et C: T 79/501. T1: traitement 1= acide acétique; T2: traitement 2 = acide lactique + acide acétique puis acide acétique; T3: traitement 3 = acide lactique puis acide acétique; T4: traitement 4 = acide lactique puis acide lactique + acide acétique.

III.1.5. Paramètre physique d'évaluation de qualité du cacao

Les cabosses de cacao (16 différents génotypes) diffèrent les unes, des autres sur la base de leur variété, couleur et génotype.

Une autre différence principale pourrait se situer en différentes années de production ou de culture. Toutefois, cette étude a permis de montrer qu'il existe une variation entre la longueur, le diamètre et la masse des fèves fraîches des cabosses récoltées dans la même région. Les variations morphologiques (physiques) des fèves de cacao des différents génotypes utilisés pourraient influencer la fermentation (Tableau VIII).

Tableau X. Evaluation des paramètres physiques des fèves de cacao.

Clones	Nombre de fèves par cabosse (n=3)	Longueur de la fève (cm) n=10	Diamètre de la fève (cm) n=10	Poids frais (g) n=10	Poids sec (g) n=10
SNK16	35,33 ± 6,50	1,6 ± 0,46	1,36 ± 0,25	4,08 ± 0,18	1,59 ± 0,16
SNK10	41 ± 12,76	2,4 ± 0,1	1,26 ± 0,05	2,22 ± 0,15	1,55 ± 0,08
SNK64	37 ± 8,54	2,3 ± 0,26	1,46 ± 0,15	2,49 ± 0,41	1,03 ± 0,08
T60/887	38,33 ± 16,44	2,1 ± 0,1	1,26 ± 0,05	1,7 ± 0,24	1,76 ± 0,12
IMC67	50 ± 7,21	2,47 ± 0,25	1,36 ± 0,05	3,61 ± 0,03	1,20 ± 0,32
TIKO31	28 ± 8	2,33 ± 0,15	1,1 ± 0,1	2,79 ± 0,42	1,73 ± 0,07
TIKO32	30,66 ± 10,06	2,47 ± 0,15	1,53 ± 0,05	4,50 ± 0,14	1,76 ± 0,12
SNK620	26,33 ± 3,78	2,47 ± 0,25	1,53 ± 0,20	3,08 ± 0,11	1,46 ± 0,14
SNK624	37,33 ± 9,01	2,27 ± 0,21	1,5 ± 0	3,87 ± 0,21	1,21 ± 0,18
SNK15	35,66 ± 7,63	2,57 ± 0,15	1,63 ± 0,11	3,53 ± 0,33	1,45 ± 0,14
SNK450	31,66 ± 8,50	2,5 ± 0,1	1,46 ± 0,15	2,97 ± 0,02	1,32 ± 0,22
SNK377	36,33 ± 11,50	2,3 ± 0,36	2,46 ± 0,20	3,64 ± 0,25	1,24 ± 0,14
SNK48	39 ± 4	2,87 ± 0,35	1,56 ± 0,11	4,46 ± 0,42	1,38 ± 0,20

III.1.6. Impact de l'incubation sur les fèves de cacao

III.1.6.1 Coloration interne des cotylédons



Fig. 29. Variation des colorations des fèves incubées et non incubées dans différents traitements. Ardoisées (jour 0) et brunes (jour 5), non incubées et incubées respectivement. A: traitement 1, acide acétique uniquement; B: traitement 2, acide lactique 2 jours puis acide acétique 3 jours.

L'épreuve à la coupe a permis d'observer les colorations internes des cotylédons suivant les traitements et les génotypes. Les fèves non incubées présentent une coloration ardoisée et les fèves incubées présentent des colorations brunes et marron qui varient en fonction des génotypes (Fig. 29).

III.1.6.2. pH des fèves

De manière générale, l'analyse des fèves incubées et non incubées séchées a permis d'observer une diminution de pH dans les fèves incubées par rapport aux fèves non incubées (Fig. 30).

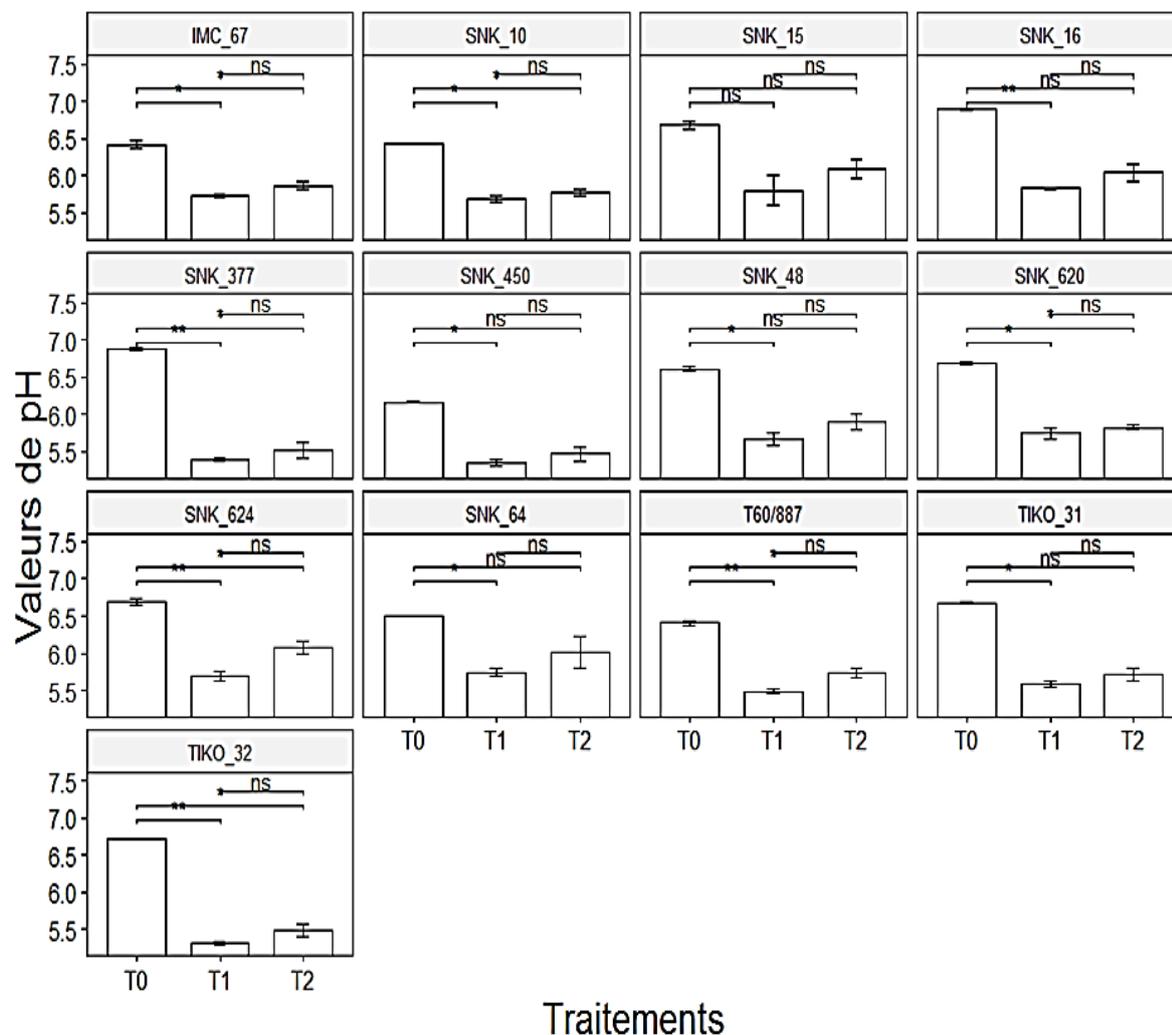


Fig. 30. Variation du pH des fèves incubées et non incubées séchées. (T0: fèves non fermentées; T1: acide acétique uniquement; T2: acide lactique pendant deux jours puis à l'acide acétique durant trois jours).

De manière générale, l'analyse a permis d'observer une diminution de pH dans les fèves incubées séchées. Les valeurs moyennes sont comprises entre 6,88 et 6,17 pour les fèves non incubées des clones SNK16 et SNK450 respectivement. Des valeurs moyennes de 5,82 et 5,35 ont été notées dans les fèves incubées issues du traitement 1 en ce qui concerne les clones SNK16 et SNK450 et enfin des valeurs de 6,10 et 5,47 ont été mesurées dans les

fèves incubées issues du traitement 2 chez les clones SNK15 et SNK450 respectivement (Fig. 30).

Les diagrammes en bâton représentés ont une tendance variable en fonction des traitements. Le traitement 1 a des valeurs faibles par rapport aux valeurs du traitement 2. Toutefois, l'analyse statistique a présenté des variations dans les traitements et au niveau des génotypes.

Chez les génotypes IMC67, SNK10, SNK620 des fèves non incubées et des fèves incubées à l'acide acétique, une différence significative au risque $P \leq 0,05$ a été notée. Entre les fèves non incubées (T0) et les fèves incubées à l'acide lactique puis acide acétique (T2), une différence significative ($P \leq 0,05$) a été notée. Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été notée entre les fèves incubées à l'acide acétique (T1) et les fèves incubées à l'acide lactique puis à l'acide acétique (T2).

Toutefois, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements du génotype SNK15; mais, entre T0 et T1 du clone SNK16, une différence significative au risque $P \leq 0,01$ a été notée. Les génotypes SNK377, SNK624, T60/887 et TIKO32 ont présentés une différence significative au risque $P \leq 0,01$ entre T0 et T1. De même, entre T0 et T2 une différence significative au risque $P \leq 0,05$ a été notée, mais aucune différence entre T1 et T2 n'a été relevée.

Chez les génotypes SNK450, SNK48, TIKO31 et SNK64, aucune différence significative n'a été notée entre T0 et T2, T1 et T2; mais une différence significative a été notée entre T0 et T1 (Fig. 30).

III.1.6.3. Evolution de l'indice de fermentation (FI)

L'indice de fermentation des fèves incubées pendant cinq jours et les fèves non incubées a été comparé. L'ensemble des génotypes (SNK377, TIKO32, T60/887, SNK15, SNK64, SNK48, SNK450, SNK10, SNK620, TIKO31, IMC67, SNK16 et SNK624) présente un IF < 1 lorsque les fèves ne sont pas incubées. A la fin de l'incubation, les fèves issues des traitements (T1 et T2) présentent des valeurs supérieures à 1 excepté le génotype SNK 620 qui a une valeur de 0,977 (Fig. 31). Cependant, l'indice de fermentation varie en fonction des génotypes et des traitements.

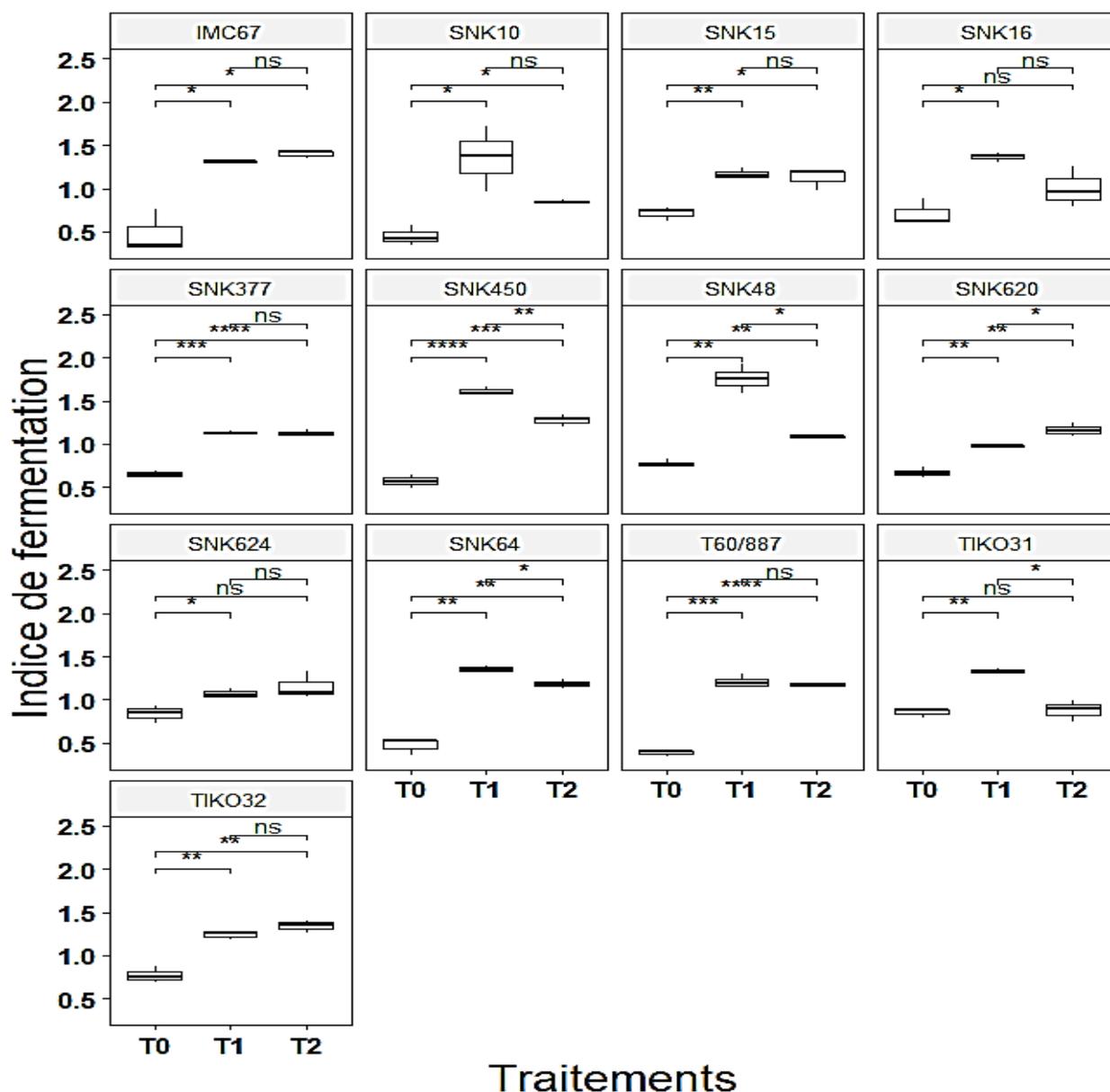


Fig. 31. Variation des valeurs d'indice de fermentation pour les fèves incubées et séchées. (T0 : fèves non fermentées ; T1: fèves traitées à l'acide acétique uniquement; T2: fèves traitées à l'acide lactique pendant deux jours puis à l'acide acétique durant trois jours.

Dans le traitement 1 (fèves incubées à l'acide acétique uniquement), les indices de fermentation obtenus sont compris entre 0,964 pour le génotype SNK10 et 1,92 pour le génotype SNK48. Les analyses statistiques présentent des similitudes et des variations. Chez les génotypes IMC67 et SNK10, le seuil de signification est inférieur à 5 % dans les T0 et T1, T0 et T2; mais entre T1 et T2 aucune différence significative n'est notée.

De plus, chez le génotype SNK15, une différence significative au risque d'erreur $P \leq 0,01$ est notée entre T0 et T1; mais un risque d'erreur de $P \leq 0,05$ est noté entre T0 et T2 ;

aucune différence significative entre T1 et T2 n'est observée. Chez les génotypes SNK16 et SNK624, une différence significative est notée entre T0 et T1, mais aucune différence entre T0 et T2, T1 et T2 n'est notée. Toutefois, chez les génotypes SNK377 et T60/887 montre une différence très hautement significative entre T0 et T1, T0 et T2 (Fig. 31). Chez le génotype SNK450, T0 et T2, T0 et T1, T1 et T2 présentent des différences très significatives. Chez les génotypes SNK48, SNK620 et SNK64 des différences ont été notées entre T0 et T1; T0 et T2 au risque d'erreur $P \leq 0,01$ et entre T1 et T2 au risque d'erreur $P \leq 0,05$. Les mêmes observations ont été faites chez les génotypes TIKO31 et 32 mais sans différence entre T1 et T2 de TIKO32 (Fig. 31).

III.1.7. Teneur en acides aminés dans 13 génotypes

III.1.7.1. Teneur totale des acides aminés libres

La composition des acides aminés obtenus dans les fèves incubées et non incubées ont permis de regrouper ces acides selon la classification de Kirchhoff : les acides aminés acides, hydrophobes et autres.

Les fèves non incubées ont montré des teneurs en acides aminés acides (Asp, Glu, Asn et His) comprises entre 5 334,57 mg/kg ffdm, valeur minimale du clone SNK10 et 11 140,69 mg/kg ffdm, valeur maximale du clone SNK450.

Les acides aminés acides dominants sont l'acide glutamique (2 683,22 mg/kg ffdm) et le glutamine (3 462,10 mg/kg ffdm).

Les acides aminés hydrophobes (Leu, Ala, Phe, Tyr, Val et Ile) ont présenté des teneurs oscillant autour de 2 668,66 mg/kg ffdm, valeur minimale du génotype SNK10 et 6 103,32 mg/kg ffdm, valeur maximale du génotype SNK377. Les acides aminés dominants de ce groupe sont l'alanine (1 087,06 mg/kg) et la tyrosine (763,56 mg/kg).

Les autres acides aminés (Trp, Lys, Ser, Gly, Arg et Thr) ont enregistré des teneurs comprises entre 431,39 mg/kg provenant du clone SNK15 et 3142,45 mg/kg provenant du génotype SNK377. L'acide dominant de ce groupe a été le tryptophane (815,59 mg/kg) (Annexe 2).

Les fèves issues dans le traitement T1 (incubation à l'acide acétique uniquement), les acides aminés acides (Asp, Glu, Asn, Gln et His) ont enregistré des teneurs moyennes comprises entre 3 403,01 mg/kg ffdm chez le génotype SNK16 et 5 890,62 mg/kg chez le

génotype IMC67. Les acides dominants de ce groupe sont le glutamate (1 819,54 mg/kg), l'asparagine (1 614,18 mg/kg) et la glutamine (1 025,44 mg/kg).

Les teneurs moyennes en acides aminés hydrophobes oscillent autour de 4 404,80 mg/kg chez le génotype SNK10 et 1 4535,62 mg/kg ffdm chez le clone TIKO31. Les acides aminés dominants de ce groupe sont la leucine (3 161,86 mg/kg) et la phénylalanine (2 426,86 mg/kg). Les teneurs moyennes en autres acides aminés sont comprises entre 4 354,33 mg/kg chez le génotype SNK620 et 12 123,57 mg/kg ffdm chez le génotype T60/887. Les acides aminés dominants de ce groupe sont la lysine (2530,04 mg/kg) et l'arginine (2959,31 mg/kg) (Annexe 3). Le teneur moyenne des fèves issues du traitement T2 (incubation à l'acide lactique pendant 2 jours puis dans l'acide acétique pendant 3 jours) sont faible comparé à celle des fèves issues du traitement T1.

Les teneurs moyennes les acides aminés hydrophobes sont comprises entre 2 861,18 mg/kg chez le génotype SNK624 et 8 535,57 mg/kg chez le génotype SNK10. Les acides aminés dominants de ce groupe sont la leucine (1 753,08 mg/kg), et la phénylalanine (1312,82 mg/kg).

Les acides aminés acides oscillent autour de 2 151,06 mg/kg ffdm chez le génotype SNK15 et de 5 693,90 mg/kg chez le génotype TIKO32. Un total de 4 acides aminés acides a été enregistré et 2 acides aminés dominants ont été notés dans ce groupe, le glutamate (1 713,65 mg/kg) et l'asparagine (1 182,53 mg/kg). La glutamine a été absente dans six génotypes, SNK15, SNK16, SNK377, SNK620, SNK624 et IMC67.

Les autres acides aminés ont enregistré des teneurs comprises autour de 2 164,91 mg/kg chez le génotype SNK15 et de 7 838,46 mg/kg chez le génotype SNK10. Une prédominance de lysine (1 352,39 mg/kg) et d'arginine (1 504,81 mg/kg) a été notée dans ce groupe. Cependant, l'absence de la méthionine a été notée dans neuf génotypes, SNK15, SNK16, SNK377, SNK620, SNK624, SNK64, TIKO31, TIKO32 et IMC67 (Annexe 4).

Le contenu total des acides aminés en fonction des génotypes a été étudié. L'observation de la figure ci-dessous permet délimiter les concentrations des acides aminés suivant les traitements.

Les fèves non incubées présentent des teneurs en acides aminés libres comprises entre 5 000 mg/kg et 15 000 mg/kg. Dans cet intervalle, 7 génotypes (IMC67, SNK15, SNK16, SNK377, SNK620, SNK624 et SNK64) issus du traitement 2 (incubation à l'acide lactique

puis à l'acide acétique) y sont représentés et également 2 géotypes (SNK10 et SNK620) issus du traitement 1 (incubation à l'acide acétique uniquement) (Fig. 32).

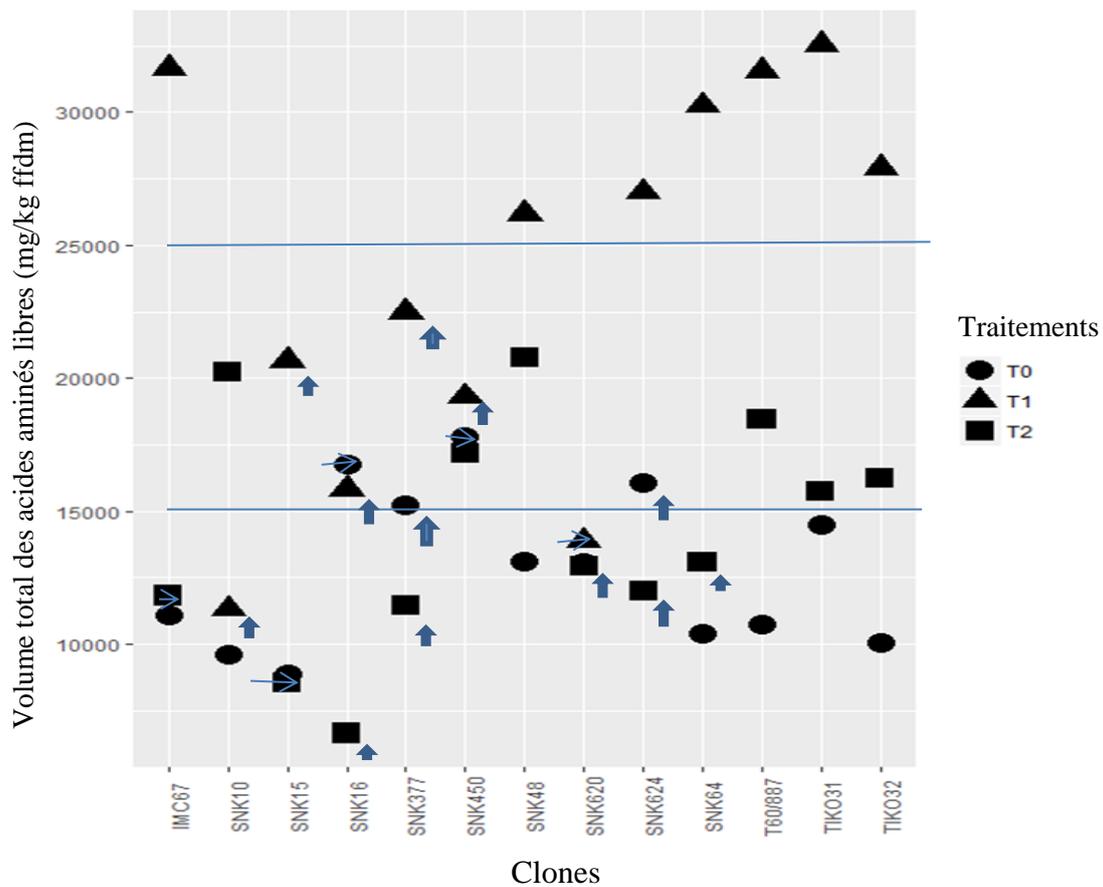


Fig. 32. Contenu total des acides aminés libres présents dans tous les 13 géotypes non incubés et incubés issus des différents milieux d'incubation. (T0: fèves non incubés; T1: fèves incubées à l'acide acétique; T2: fèves incubées à l'acide lactique pendant deux jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours).

Les teneurs en acides aminés libres comprises entre 15 000 – 25,000 mg/kg ffdm, regroupent en majorité les fèves issues du traitement 2. Les teneurs en acides aminés libres comprises entre 25 000 – 35 000 mg/kg ffdm, rassemblent 7 géotypes issus du traitement 1 (Fig. 32).

Le géotype SNK620 présente un volume situé sensiblement en deçà de 15000 mg/g d'acide aminé pour ses 3 traitements par rapport aux autres géotypes. Quel que soit le traitement pour ce géotype, le volume d'acide aminé est faible. Toutefois, chez le géotype SNK10, T2 n'a pas stimulé la synthèse élevée d'acide aminé, de plus, dans les traitements T3

et T0 les mêmes valeurs sont notées. La même observation a été faite pour les traitements T1 et T0 du génotype IMC67 ainsi que pour les traitements T1 et T0 du génotype SNK15.

III.1.7.2. Contenu du ratio des hydrophobes/acides des acides aminés libres

L'ensemble de ratio a permis de classer les acides aminés libres en trois groupes suivant les différents traitements.

Le ratio des fèves non incubées à des concentrations comprises entre 0 et 0,75, cet intervalle regroupe tous les 13 clones, en plus, 2 clones du traitement 2 et 1 clone du traitement T1 (Fig. 32).

Dans l'intervalle 0,75 – 1,25, les clones majoritairement enregistrés sont issus du traitement 2. En addition, 3 clones (SNK10, SNK450 et SNK48) du traitement 1 sont représentés dans cet intervalle.

Des concentrations au-delà de 1,25 sont représentées par 8 clones du traitement 1 et 2 clones (SNK10 et T60/887) du traitement 2.

De façon générale, l'analyse du ratio acides aminés hydrophobes / acides totaux montre que la distribution des hydrophobes, constituants majeurs des précurseurs d'arôme, est fonction non pas du génotype mais du milieu d'incubation, autrement dit le pH du milieu d'incubation et par ricochet de l'environnement fermentaire, qui est le facteur déterminant dans l'accumulation de ces acides aminés dans la fève (Fig. 33).

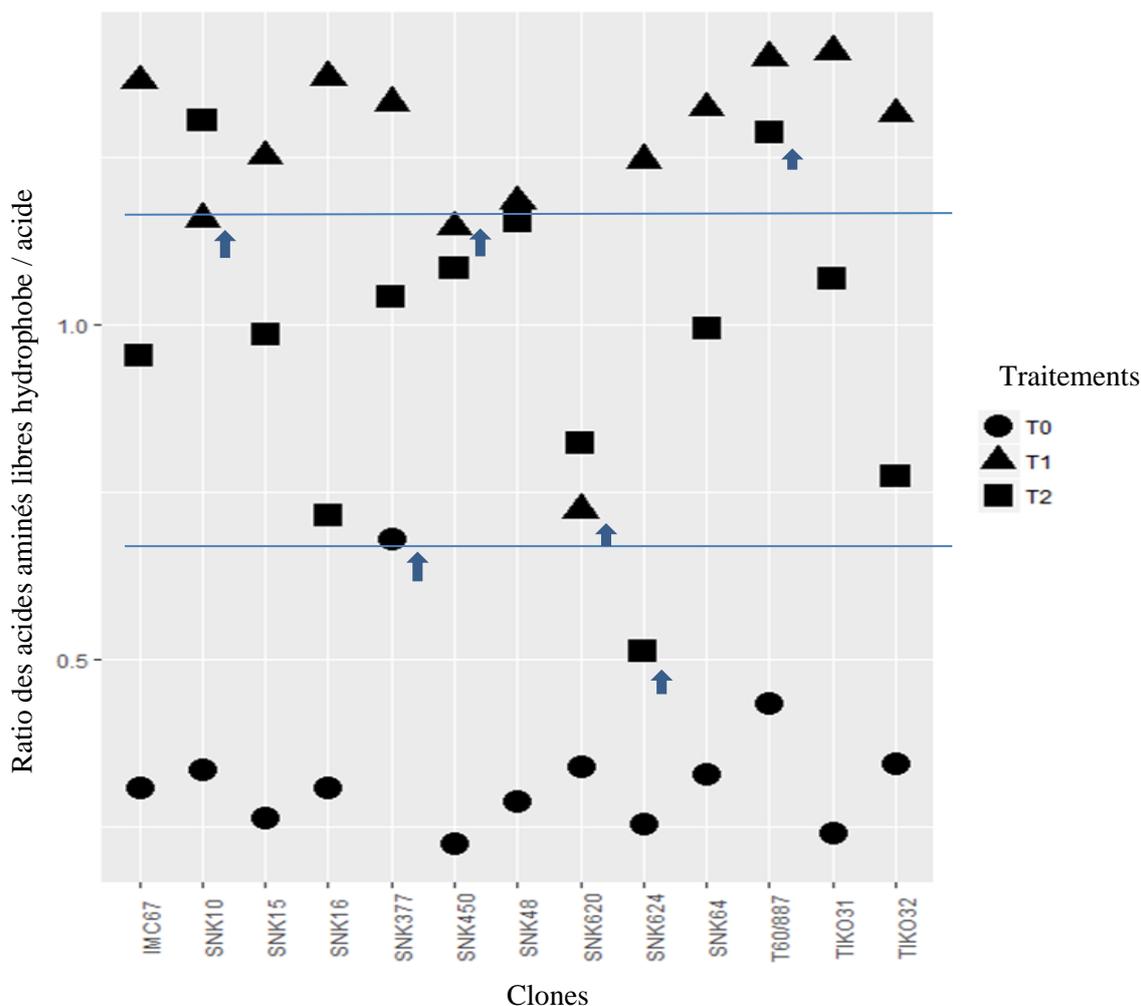


Fig. 33. Ratio des acides aminés libres des hydrophobes/acides dans tous les 13 clones non incubés et incubés dans différents milieux d'incubation. (T0: fèves non incubées; T1: fèves incubées à l'acide acétique; T2: fèves incubées à l'acide lactique pendant deux jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours).

III.1.7.3. Ratio hydrophobes/acides en fonction de la teneur totale en acides aminés libres

Le ratio des acides aminés hydrophobes/acides en fonction de la teneur totale des acides aminés libres des 13 clones est représenté en fonction des concentrations en ratio et des teneurs en volume total des acides aminés.

Des teneurs en acides aminés comprises entre 0 et 15 000 mg/kg ffdm sont notées, la projection sur l'équation de droite montre un ratio de 1,26. Cet intervalle regroupe 10 clones et tous ces clones sont en dessous de l'équation de droite.

Comme observé sur la figure 34, une corrélation positive ($r = 0,56$) entre le volume total des acides aminés et le ratio des hydrophobes/acides des acides aminés libres est observée. A la fin de l'analyse, la modélisation à visée prédictive est obtenue. L'analyse a été effectuée sur la droite de régression avec un intervalle de confiance de 95 %. Une régression linéaire simple a été réalisée entre le ratio des hydrophobes/acides des acides aminés libres en fonction du volume total des acides aminés. Globalement, quelque soit les clones, la projection de ces dernières sont plus ou moins distribuée autour de la droite de régression, ceci témoigne de la forte relation linéaire existante entre ces 2 variables dou la forte corrélation $r=0.56$ trouvé au cours de cette analyse.

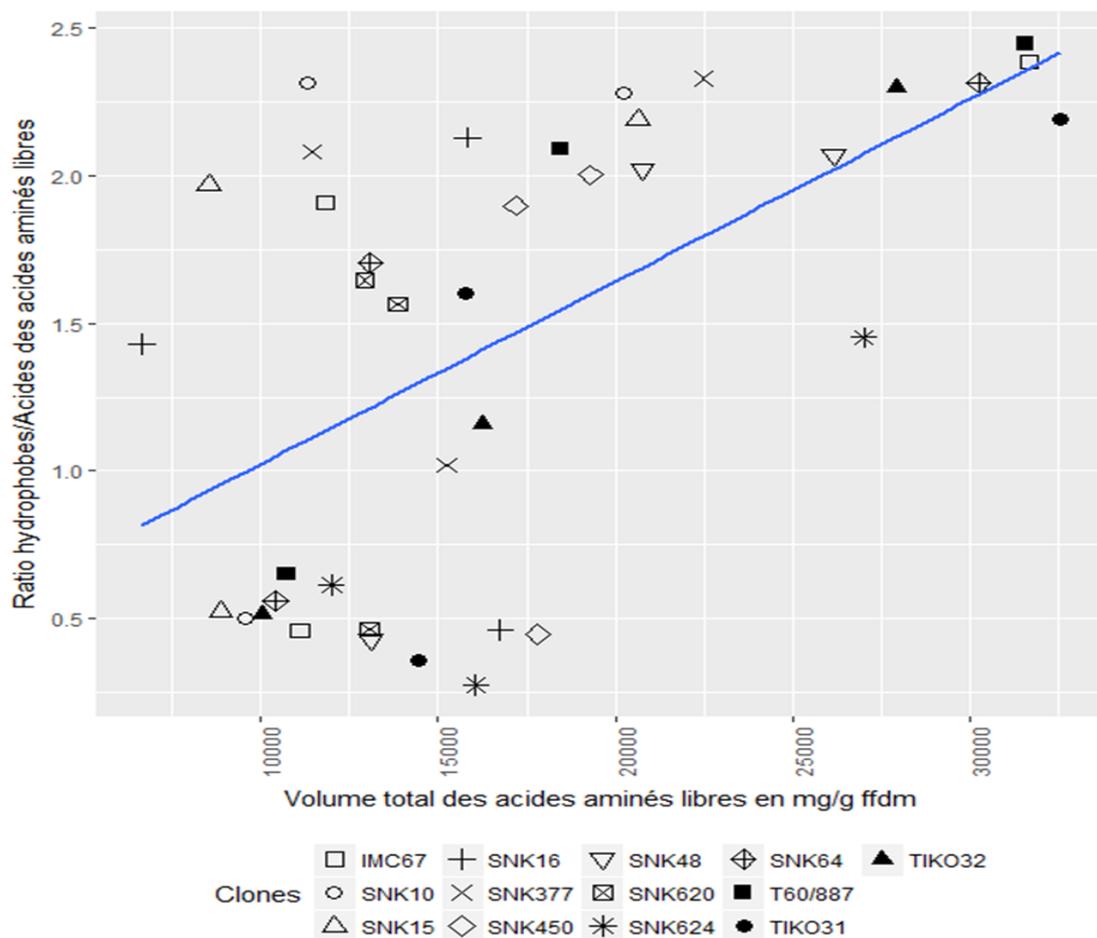


Fig. 34. Ratio des hydrophobes/acides des acides aminés libres en fonction de la teneur totale des acides aminés dans tous les 13 clones non incubés et incubés dans différents milieux d'incubation. Coefficient de corrélation : $r = 0,56$; $P < 0,0001$.

III.1.8. Teneur en polyphénols des fèves

III.1.8.1 Teneur en épicatechine

La teneur en épicatechine a été évaluée au jour 0 (sans incubation) et au jour 5 (fin de l'incubation). Le résultat de l'épicatechine montre que c'est le flavan-3-ol le plus abondant dans les fèves non incubées (30 000 et 45 000 mg/kg) chez les clones SNK450 et SNK48 respectivement.

En effet, Après incubation des fèves dans de l'acide acétique (traitement 1), la concentration maximale en épicatechine est de 5 500 mg/kg chez le clone SNK16 et la minimale est de 500 mg/kg chez le clone SNK450.

Lorsque les fèves sont incubées dans de l'acide lactique puis de l'acide acétique (traitement 2), les concentrations en épicatechine sont de 500 mg/kg et 7 000 mg/kg chez les clones IMC67 et SNK48 respectivement.

Cependant, l'analyse statistique entre T1 et T2 a montré une absence de différence significative entre plusieurs clones sauf chez les clones SNK15, SNK377, SNK450 et SNK16 où les différences significatives ont été observées. La concentration en épicatechine est plus élevée dans le traitement T2 comparé au traitement T1. L'analyse statistique a montré une différence significative entre T0 et T1 dans plusieurs clones sauf dans les clones SNK10 et TIKO31. Une différence significative avec un risque d'erreur $P \leq 0,05$ a été notée chez les clones IMC67, SNK16, SNK377, SNK624, T60/887 et TIKO32. Tandis que, des différences très hautement significatives ont été notées avec un risque d'erreur $P \leq 0,01$ et $P \leq 0,001$ chez les clones SNK15, SNK450, SNK48, SNK64 et SNK620 respectivement.

La concentration maximale dans le traitement 1, est notée de 5 500 mg/kg chez le clone SNK16 et la minimale est de 500 mg/kg chez le clone SNK450.

Les concentrations suivantes dans le traitement 2, sont notées, 500 mg/kg et 7 000 mg/kg chez les clones IMC67 et SNK48 respectivement (Fig. 35).

Cependant, l'analyse statistique entre T1 et T2 a montré une absence de différence significative entre plusieurs clones sauf chez les clones SNK15, SNK377, SNK450 et SNK16 où les différences significatives sont observées au risque d'erreur $P \leq 0,05$ et $P \leq 0,01$ respectivement.

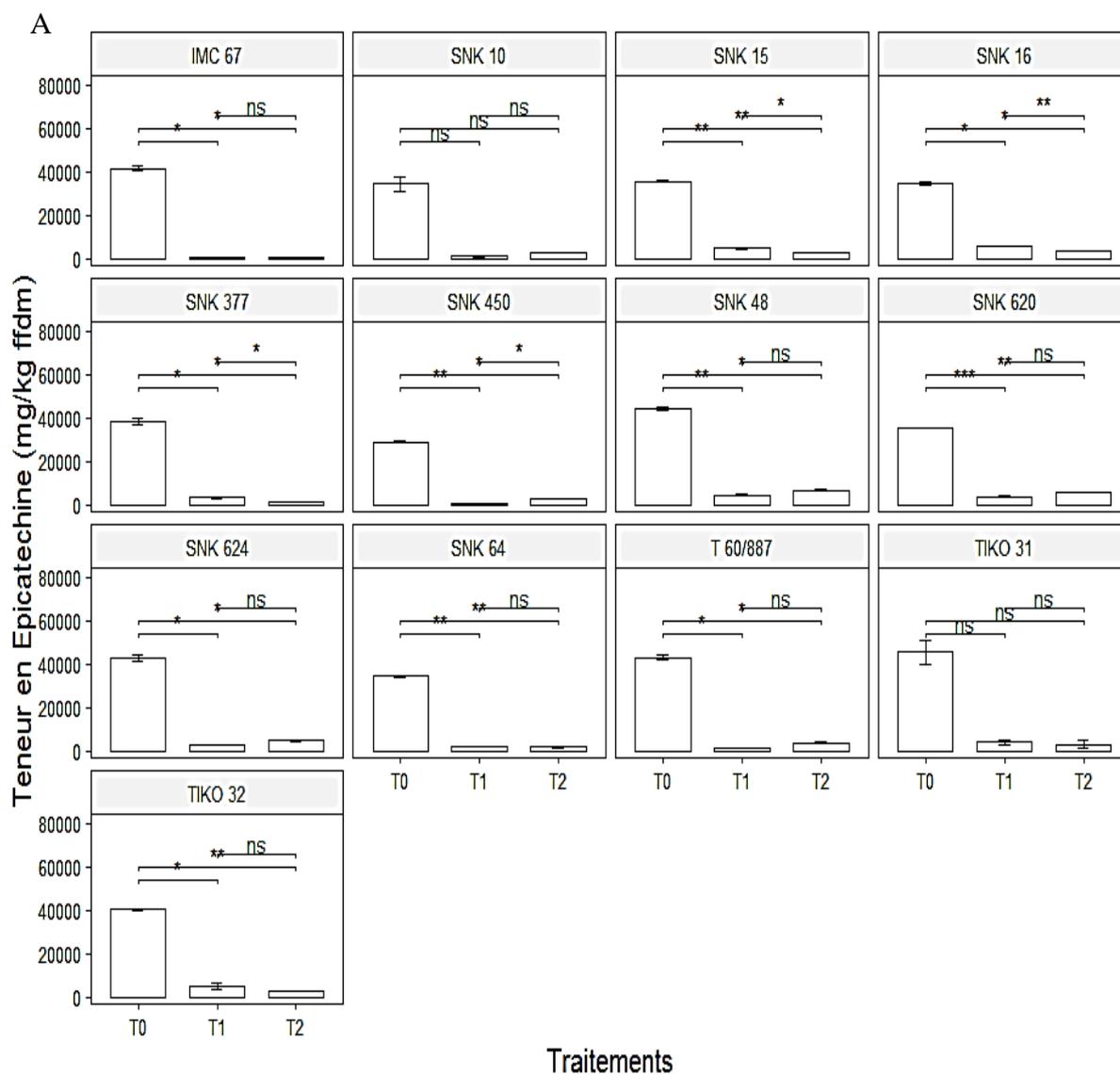


Fig. 35. Variation des teneurs en flavonoïde. (A) épicatechine dans les fèves incubées et non incubées séchées des différents génotypes. T0: fèves non incubées, T1: acide acétique, T2: acide lactique pendant 2 jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours.

Dans le traitement 2 (fèves incubées dans l'acide lactique pendant 2 jours puis dans l'acide acétique pendant 3 jours), la concentration en épicatechine est plus élevée que dans le traitement 1 (fèves incubées uniquement dans l'acide acétique). Chez les clones T60/887 et SNK450, la teneur est 6 fois plus élevée dans le traitement 2 par rapport au traitement 1. L'épicatechine varie en fonction des traitements (T0, T1 et T2) et des génotypes.

III.1.8.2 Teneur en catéchine

Les concentrations en catéchine sont comprises entre 800 et 2 500 mg/kg pour les clones SNK624 et TIKO31 respectivement. Soit une différence de 37,5 fois et 18 fois entre

les deux flavan-3-ol (Fig. 36). Toutefois, la catéchine est présente dans le traitement T2 et absente dans le traitement T1. De plus, la catéchine apparaît dans deux clones (TIKO31 et SNK48) du traitement T2 avec une différence significative au risque d'erreur $P \leq 0,05$ chez le clone SNK48 (Fig. 36).

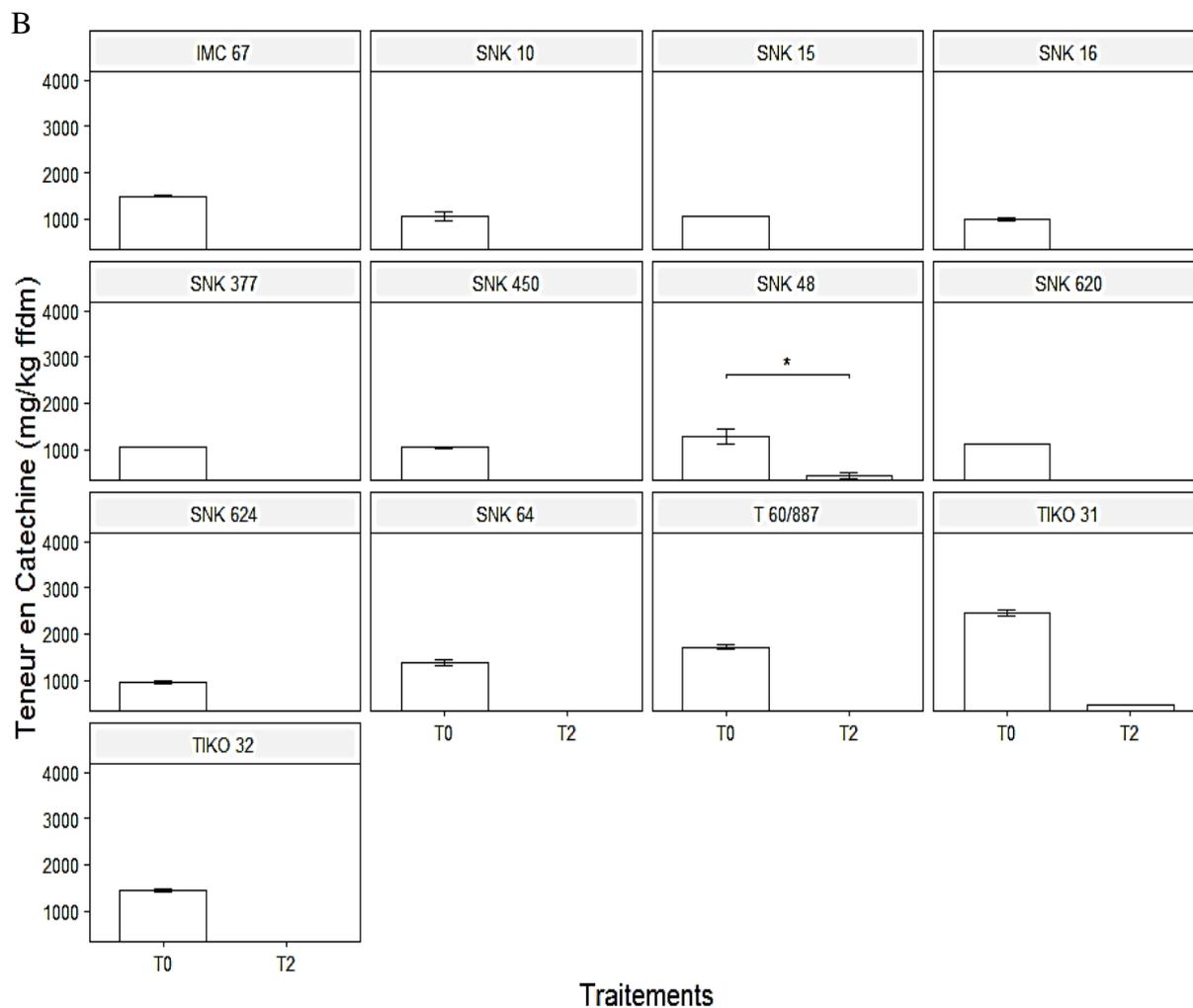


Fig. 36. Variation des teneurs en flavonoïde. (B) catéchine dans les fèves incubées et non incubées séchées des différents génotypes. T0: fèves non incubées, T1: acide acétique, T2: acide lactique pendant 2 jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours.

III.1.8.3. Teneur en anthocyanines

III.1.8.3.1. Teneur en cyanidine-3-galactoside

A la fin de l'incubation, la concentration en cyanidine-3-galactosidose est élevée dans le traitement 1 comparé à celle du traitement 2. La concentration maximale dans le traitement 1 est de 51 mg/kg tandis que la teneur minimale est de 31 mg/kg (Fig. 37). Dans le

traitement 2, la présence du cyanidine-3-galactosidose est notée dans 3 clones uniquement. En effet, une diminution est observée entre le jour 0 jusqu'au jour 5.

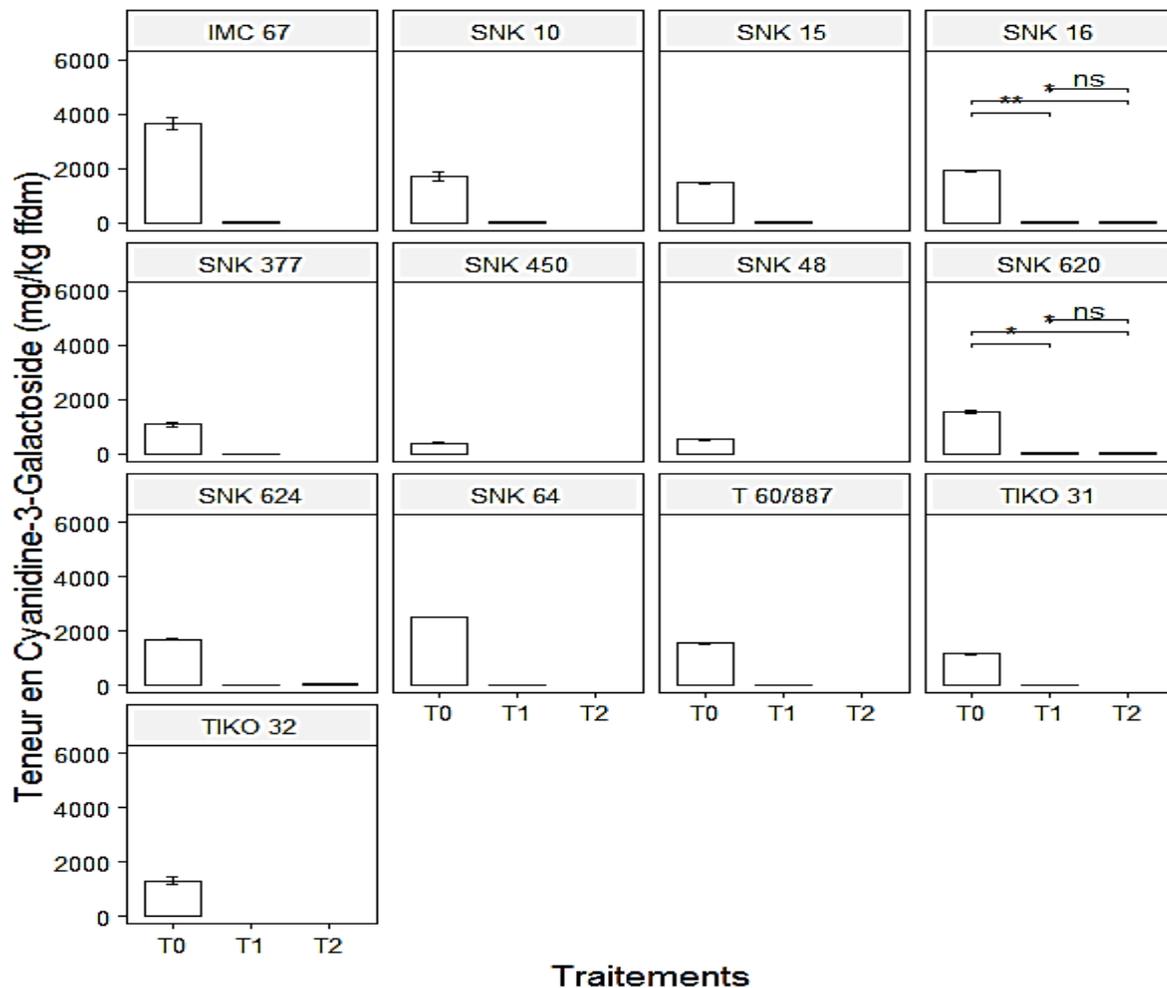


Fig. 37. Variation de la teneur en anthocyanine. (A) cyanidine-3-galactoside dans les fèves incubées et non incubées séchées. T0: fèves non incubées, T1: acide acétique, T2: acide lactique pendant 2 jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours.

Des différences significatives sont notées chez les clones SNK16 et SNK620 avec un risque d'erreur de $P \leq 0,05$ entre T0 et T1 chez le clone SNK16, $P \leq 0,01$ entre T0 et T1, entre T0 et T2 chez le clone SNK620 et entre T0 et T2 du clone SNK16. Aucune différence significative n'a été observée entre T1 et T2. Toutefois, les traitements 1 et 2 ont enregistré des teneurs très faibles en cyanidine-3-galactoside, soit 3 fois plus de cyanidine-3-arabinoside par rapport à la teneur en cyanidine-3-galactoside.

III.1.8.3.2. Teneur en cyanidine-3-arabinoside

La teneur en cyanidine-3-arabinoside a été mesurée dans chaque traitement.

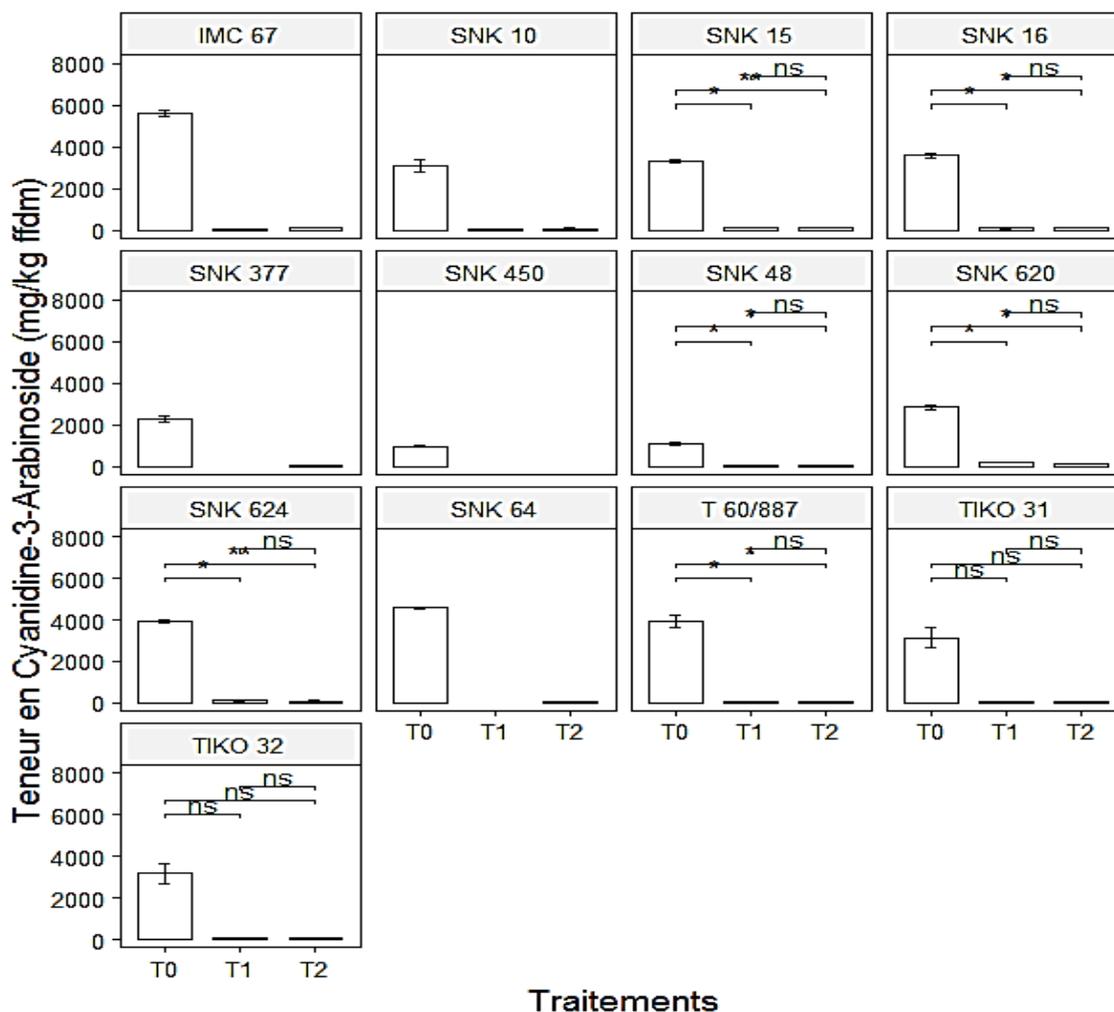


Fig. 38. Variation en teneur d'anthocyanine. (B) cyanidine-3-arabinoside des 13 clones incubés et non incubés séchés dans les différents traitements. T0: fèves non incubées, T1: acide acétique et T2: acide lactique pendant 2 jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours.

Le cyanidine-3-arabinoside est absent chez les clones SNK64, SNK450 et SNK377 du traitement 2 et également chez le clone SNK450 du traitement 1.

Par ailleurs, la teneur en cyanidine-3-arabinoside est faible et ce composé est totalement dégradée dans les clones SNK64, SNK450 et SNK377 après le traitement 2. Les concentrations élevées sont notées dans les clones IMC67, SNK16, SNK620, SNK624, et SNK15 issus du traitement T1, avec des moyennes de 90, 125, 120, 83 et 96 mg/kg respectivement (Fig. 38). Des concentrations moyennes de 80, 102 et 180 mg/kg pour les SNK15, SNK624 et SN 620 respectivement du traitement 2 sont également notées.

L'analyse statistique a montré des différences significatives entre T0 et T1, T0 et T2 de certains clones (SNK15, SNK16, SNK48, SNK620, SNK624 et T60/887). Cependant,

aucune différence significative n'a été notée entre les différents traitements des clones TIKO31 et TIKO32. Une distribution sensiblement égale et faible est observée dans les traitements 1 et 2.

III.1.9. Teneurs en sucres dans les fèves de cacao

III.1.9.1. Teneur en saccharose

L'échantillon analysé a été prélevé au jour 0 et au jour 5 qui marque la fin de l'incubation (Fig. 39).

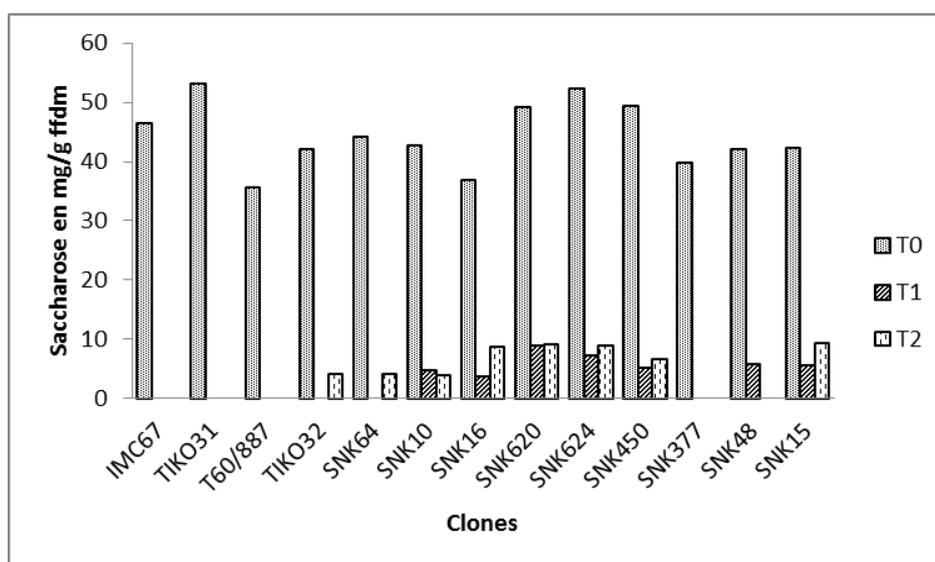


Fig. 39. Teneur en saccharose des fèves incubées dans différents traitements séchées et non incubées chez 13 clones de cacao. T0: fèves non incubées; T1: acide acétique; T2: acide lactique pendant deux jours puis acide acétique pendant 5 jours.

La concentration en saccharose des fèves non incubées est élevée dans tous les clones. Les maxima ont été mesurés dans les clones SNK624 et TIKO31 avec des valeurs de 35 et 52,5 mg/g ffdm respectivement. Après incubation, on note une baisse drastique (5 fois moins) de la quantité de saccharose dans les fèves.

Toutefois, de faibles concentrations en saccharose (4 et 3 mg/g ffdm) ont été observées dans les fèves incubées chez les clones SNK10 et SNK16 dans les traitements 2 et 1 respectivement.

III.1.9.2. Teneur en glucose

La concentration en glucose dans les fèves incubées de cacao a montré un modèle des résultats différent de ceux observés en saccharose.

Le glucose a été détecté dans 3 clones (TIKO32, SNK16 et SNK15) de cacao non incubé et à des concentrations comprises entre 2 et 3,8 mg/g ffdm (Fig. 40).

Dans le traitement 1, la formation des sucres est effective dans presque tous les clones excepté le clone SNK15. La concentration maximale a été de 8,1 mg/g ffdm et la concentration minimale a été de 5,2 mg/g ffdm

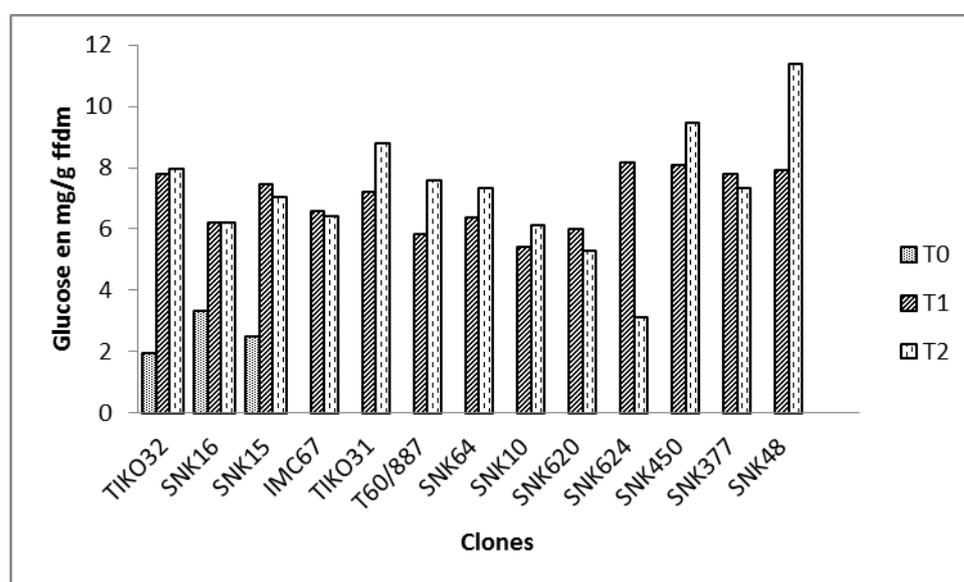


Fig. 40. Teneur en glucose des fèves incubées dans différents traitements et non incubées séchées chez 13 clones de cacao. T0: fèves non incubées; T1: acide acétique; T2: acide lactique pendant deux jours puis acide acétique pendant 5 jours.

Cependant, la plus petite concentration a été notée dans le traitement 2 chez le clone SNK624 (3,2 mg/g ffdm) et le pic (11,2 mg/g ffdm) a été observé chez le clone SNK48 du même traitement. De façon générale, l'incubation induit une accumulation du glucose, du fructose et du galactose dans les fèves.

III.1.9.3. Teneur en galactose

De façon générale, les concentrations en galactose dans les 3 traitements ont été enregistrées.

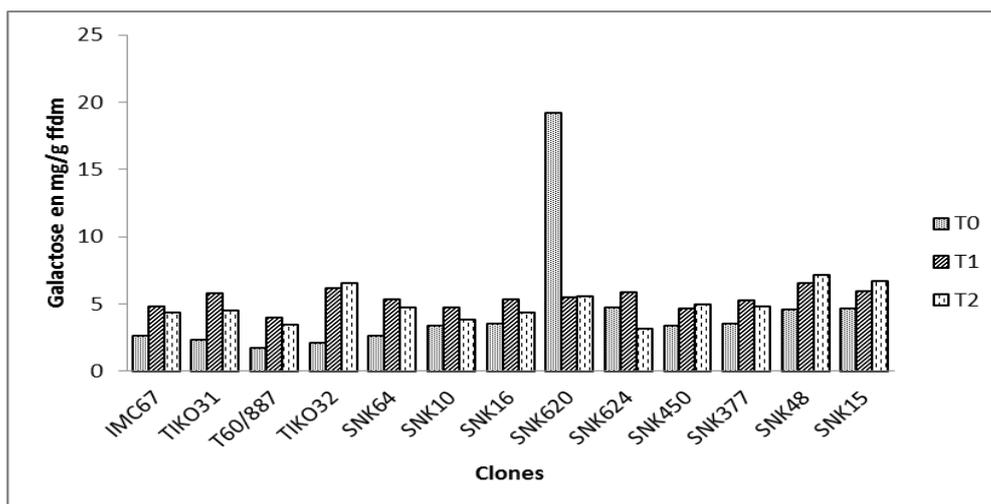


Fig. 41. Teneur en galactose des fèves incubées dans différents traitements et non incubées séchées chez 13 clones de cacao. T0: fèves non incubées; T1: acide acétique; T2: acide lactique pendant deux jours puis à l'acide acétique pendant 5 jours.

A la fin de l'incubation, des teneurs faibles comprises entre 3 et 7,5 mg/g ffdm ont été notées et le pic a été atteint chez le clone SNK620 dans le traitement 0 (fèves non incubées). Toutefois, le clone SNK48 a enregistré la concentration maximale et le clone T60/887 a enregistré la concentration minimale.

Dans le traitement 1, les concentrations obtenues sont supérieures comparées aux autres concentrations des 2 autres traitements exceptés chez les clones TIKO32, SNK620, SNK48 et SNK15 (Fig. 41).

III.1.9.4. Teneur en fructose

De façon générale, les fèves non incubées ont de faibles concentrations en fructose. La concentration en fructose dans chaque clone varie suivant le traitement.

La teneur en fructose dans ces géotypes varie entre 1 et 12,2 mg/g ffdm. En effet, le clone SNK48 a montré un pic dans le traitement 2 avec une concentration de 12,2 mg/g ffdm (Fig. 42). Le traitement 0 (fèves non incubées) a montré une teneur maximale chez le clone SNK16 avec une concentration d'environ 2,5 mg/g ffdm. Une concentration élevée de 9,7 mg/g ffdm du traitement 1 est notée chez le clone SNK377.

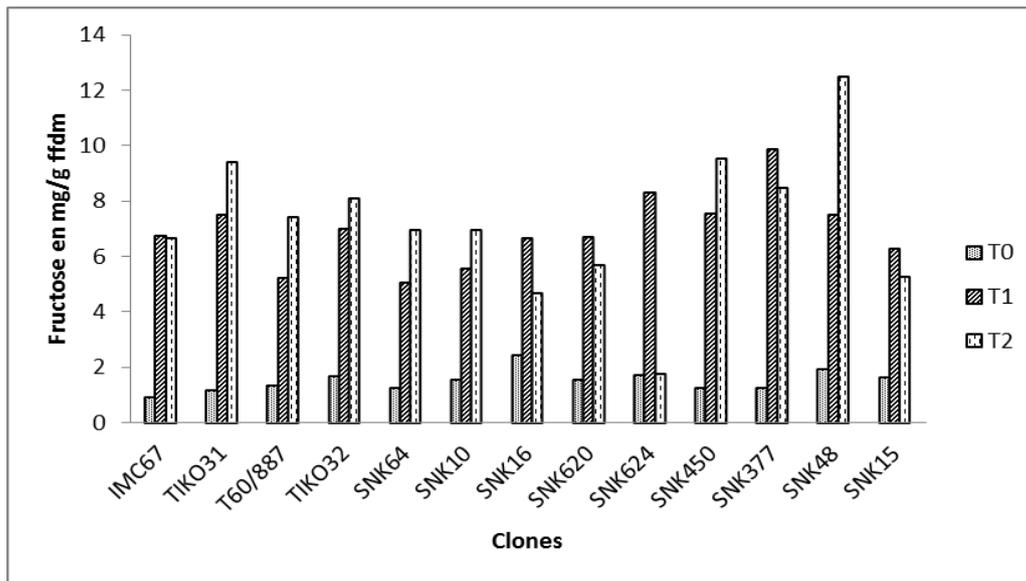


Fig. 42. Teneur en fructose des fèves incubées dans différents traitements et non incubées séchées chez 13 clones de cacao. T0: fèves non incubées; T1: acide acétique; T2: acide lactique pendant deux jours puis acide acétique pendant 5 jours.

III.1.9.5. Teneur en raffinose

La teneur en raffinose a été détectée dans certains clones. Dans les fèves non incubées, ce sucre apparaît dans tous les clones et à des concentrations comprises entre 9,9 et 12,5 mg/g ffdm.

Dans les fèves non incubées, la teneur en raffinose est plus élevée et présente dans tous les génotypes contrairement à la concentration obtenue dans les fèves incubées (Fig. 43).

Par contre, dans les traitements 1 et 2, la raffinose apparaît chez 3 clones SNK16, SNK624 (traitement 2) et SNK620 (traitement 1) et à des concentrations variables.

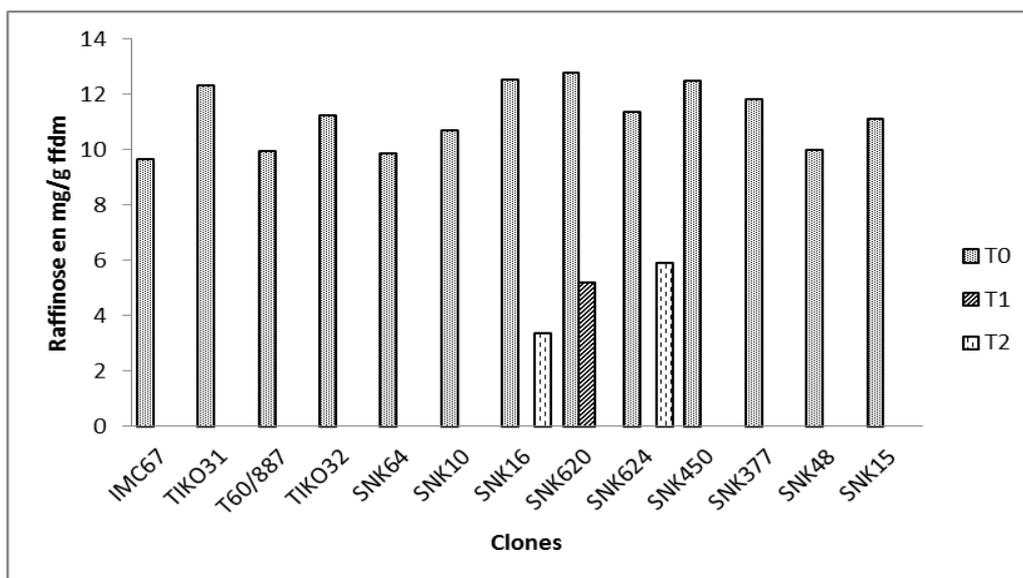


Fig. 43. Teneur en raffinose des fèves incubées dans différents traitements et non incubées séchées chez 13 clones de cacao. T0: fèves non incubées; T1: acide acétique; T2: acide lactique pendant deux jours puis acide acétique pendant 5 jours.

III.1.9.6. Ratio des sucres métaboliques et de transport

III.1.9.6.1. Ratio des sucres glucose/saccharose

Le résultat du ratio glucose/fructose montre des concentrations presque nulles pour les fèves non incubées excepté dans les clones SNK15, SNK16 et TIKO32.

En revanche, le ratio glucose/saccharose varie dans les traitements 1 et 2. En deçà de 1, des clones issus des 2 traitements y sont représentés, 4 clones pour le traitement 2 et un clone pour le traitement 1.

Toutefois, au-delà de 1, environ 10 clones sont présents, 6 clones du traitement 1 et 4 clones du traitement 2 (Fig. 44).

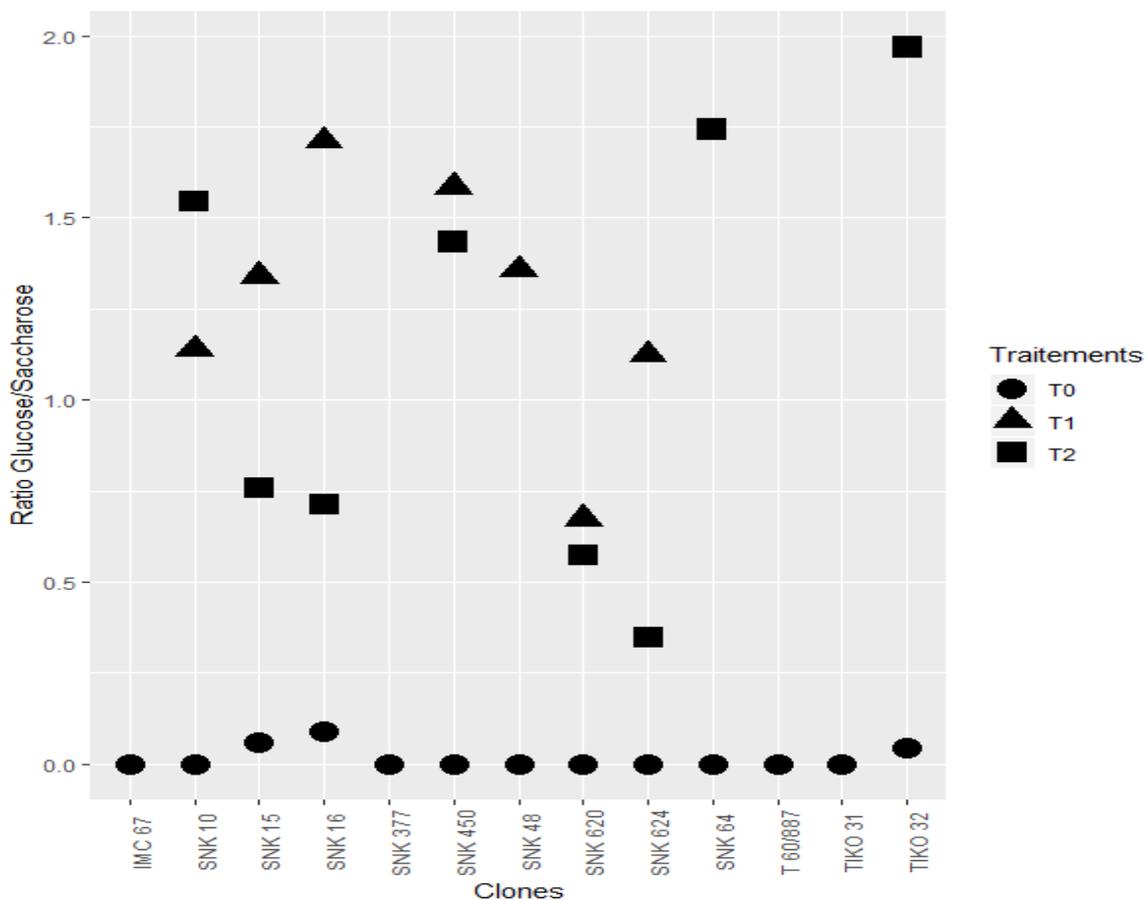


Fig. 44. Ratio des sucres glucose/saccharose dans tous les 13 clones non incubés et incubés séchés dans différents milieux d'incubations. T0: fèves non incubées; T1: acide acétique; T2: acide lactique pendant deux jours puis acide acétique pendant 3 jours.

III.1.9.6.2. Ratio des sucres fructose/saccharose

Le ratio fructose/saccharose est présenté sur la figure ci-dessous. Les ratios obtenus varient en fonction des traitements et des clones. En effet, les fèves non incubées (jour 0) montrent un rapport très faible comparé aux fèves issues des traitements T1 et T2.

A la fin de l'incubation (jour 5), pour des ratios inférieurs à 1, 5 clones sont enregistrés, 4 clones provenant du traitement 2 et 1 clone provenant du traitement 1.

Pour des ratios supérieurs à 1, 10 clones sont présents, 6 clones issus du traitement 1 et 4 clones issus du traitement 2 (Fig. 45).

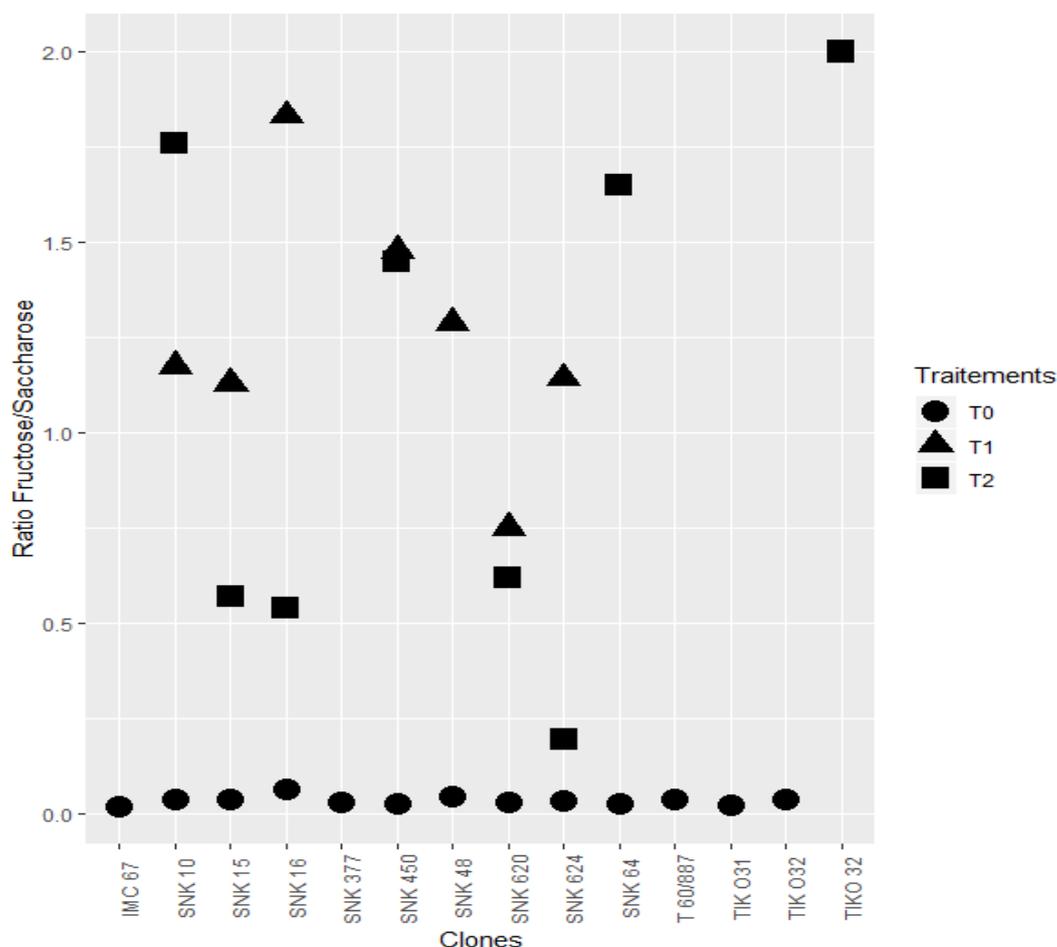


Fig. 45. Ratio des sucres fructose/saccharose dans tous les 13 clones non incubés et incubés séchés dans différents milieux d'incubations. T0: fèves non incubées; T1: fèves incubées à l'acide acétique; T2: fèves incubées à l'acide lactique pendant deux jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours.

III.1.9.6.3. Ratio des sucres glucose/ fructose

Les résultats présentés montrent clairement que le glucose et le fructose (sucres métaboliques) ont des ratios compris entre 0,75 et 1,75.

Les ratios des fèves non incubées sont très faibles excepté chez les clones SNK15, SNK16 et TIKO32 qui ont présenté des ratios supérieurs à 1,5, 1,25 et 1 respectivement.

A la fin de l'incubation (jour 5), les traitements 1 et 2 ont des ratios supérieurs compris entre 0,75 et 1,5 excepté le clone SNK624 du traitement 2. Les traitements 1 et 2 sont regroupés autour des ratios de 1 et 1.5 (Fig. 46).

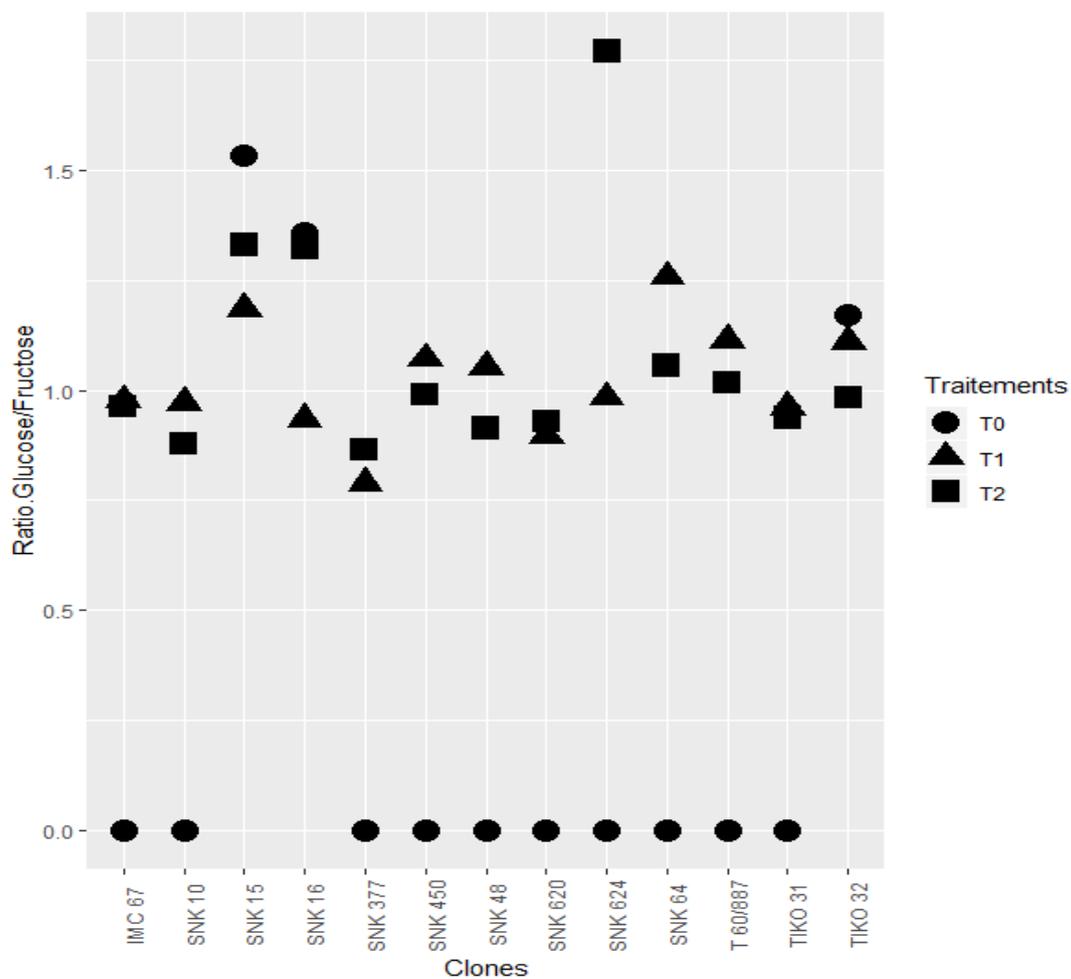


Fig. 46. Ratio des sucres glucose/ fructose dans tous les 13 clones non incubés et incubés séchés dans différents milieu d'incubations. T0: fèves non incubées; T1: fèves incubées à l'acide acétique; T2: fèves incubées à l'acide lactique pendant deux jours puis à l'acide acétique pendant 3 jours.

III.2. Discussion

La qualité aromatique du cacao est liée aux traitements post-récoltes et particulièrement la fermentation. Cette opération est un processus essentiel dans le développement des précurseurs d'arôme et du goût du chocolat, elle imprime en générale les qualités organoleptiques des fèves marchandes. Au cours de cette phase, les composés phénoliques sont dégradés tandis que de la teneur en précurseurs d'arôme, c'est-à-dire les acides aminés et les oligopeptides augmentent. Ainsi, dans un contexte économique tendu pour les chocolatiers et une demande sans cesse croissante en cacao de qualité, la maîtrise de la qualité organoleptique devient un impératif et un avantage compétitif d'où la nécessité d'évaluer les marqueurs physico – chimiques des fèves de cacao.

III.2.1. Qualité du cacao marchand

III.2.1.1. Profil des acides aminés libres du cacao marchand

Dans les fèves violettes, brunes et blanches, la Leu, l'Ala et la Phe sont les acides aminés dominants du groupe hydrophobe et comptent pour 50 % de la teneur totale. La teneur en acides aminés acide totale est de 161 694 à 425 969 mg/kg. Le glutamate et l'asparagine sont les acides aminés dominants du cacao marchand, représentant plus de 60 %. Les autres acides aminés ont été observés, et sont 2 – 2,5 fois supérieurs dans les fèves violettes et brunes que dans les fèves ardoisées.

Ces résultats obtenus, montrent un taux élevé des acides aminés libres dans les fèves blanches, violettes et brunes. La teneur élevée en acides aminés dans les fèves violettes suggère que ceux-ci sont potentiellement capables de générer des arômes de cacao spécifiques pendant la torréfaction. Ces résultats permettent d'indiquer que l'activité protéolytique est probablement plus élevée dans les premiers jours de fermentation et tend à diminuer. En effet, des précurseurs d'arômes du chocolat sont constitués de petits peptides, d'acides aminés libres et de sucres réducteurs (Kadow *et al.*, 2015). Ces résultats montrent donc que la teneur en acides aminés libres varie considérablement en fonction de la coloration des fèves (ardoisées, violettes et brunes). Cette tendance a été observée dans toutes les trois catégories de classification (hydrophobe, acide et autre) dans les échantillons de fèves de cacao et pourrait être attribuée à une fermentation progressive entraînant une hydrolyse plus poussée des peptides en acides aminés, de sorte qu'ils atteignent un maximum dans les fèves violettes et diminuent vers la fin de la fermentation.

Ces résultats sont comparables à ceux de Caligiani *et al.* (2014, 2016) sur l'influence du niveau de fermentation et de l'origine géographique sur le profil des oligopeptides de la fève de cacao. Ces auteurs ont montré que, les quantités d'acides aminés des fèves violettes (fermentation incomplète) ont relativement la même quantité d'acides aminés libres que les fèves brunes. De plus, ils ont également montré que les acides aminés hydrophobes étaient plus abondants dans les fèves violettes que dans les fèves brunes, tandis que des teneurs en peptides mesurées sont légèrement plus élevées dans les fèves violettes. En effet, pendant la fermentation, les quantités significatives de composants solubles des fèves sont lessivées. L'acidification des fèves de cacao par l'accumulation de l'acide lactique et acétique induit la protéolyse de l'albumine et de la viciline (7S) comme montrée par l'incubation des fèves de cacao dans des conditions aseptiques (Biehl *et al.*, 1985 ; kongor *et al.*, 2016 ; Kadow *et al.*, 2015). En raison des caractéristiques des enzymes, les produits de cette protéolyse sont des peptides courts et un groupe d'acides aminés libres, particulièrement les acides aminés hydrophobes.

III.2.1.2. GABA du cacao marchand

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA), est synthétisé à partir de l'acide glutamique par l'Acide Glutamique Décarboxylase, ou Glutamate Décarboxylase (GAD) et est catabolisé par la GABA transaminase (GABA-T); c'est un acide aminé non protéique (Neuromédiateur). La quantité de 2 673 mg/kg ffdm présente dans les fèves ardoisées fait du cacao cru l'une des sources les plus abondantes de ce métabolite dans le règne végétal. Cette forte teneur en GABA observée dans le cacao serait due à la formation de la décarboxylation du glutamate. En effet, le glutamate aminotransférase (GAT), le glutamate déshydrogénase (GDH) et le glutamate décarboxylase (GAD) sont des enzymes clés présentes chez les bactéries lactiques et impliquées dans le catabolisme du glutamate. Les deux premières enzymes sont impliquées dans la formation de l' α -cétoglutarate (Christensen *et al.*, 1999) et responsable de la formation de composés aromatiques à travers les acides aminés (Yvon *et al.*, 1998 ; Banks *et al.*, 2001).

Ces résultats obtenus sont comparables à ceux de Banchuen *et al.* (2010) ; Diana *et al.* (2014) qui ont travaillé sur l'acide gamma-aminobutyrique en tant que composé bioactif dans les aliments. Ces auteurs ont montré que le riz brun germé est une source riche de GABA avec une teneur de 445,3 mg/kg. La GABA est largement étudiée en raison de ses nombreuses fonctions physiologiques et effets positifs sur les désordres métaboliques. Une

des propriétés la plus importante de ces derniers est l'effet hypotenseur qui a été démontré chez les animaux et dans des épreuves d'interposition humaines. Chez les plantes, elle peut participer à la régulation du pH du cytosol et est aussi une molécule signalé dans le rétablissement de l'homéostasie (Shelp *et al.*, 1999). Face à cette observation, la question sur l'importance des micro-organismes agissant pendant la fermentation sur le cacao est encore discutée. Est-ce que l'accumulation de GABA dans les fèves de cacao est le résultat de leur acidification, l'insuffisance de l'oxygène et/ou le produit des bactéries lactiques et des bactéries acétiques ? En effet, une réduction du pH dans le cytosol est notée pendant la fermentation de cacao, ce qui mène à l'augmentation du Ca^{2+} . Le résultat Ca^{2+} / complexe de calmoduline dans le cytosol active l'acide glutamique (AG) décarboxylase pour former l'acide γ -aminobutyrique. Bown & Shelp, (1997) ont montré l'existence d'une corrélation entre la déplétion d'oxygène et la formation de l'acide γ -aminobutyrique dans leur travaux sur le métabolisme et les fonctions de l'acide gamma -aminobutyrique. En l'absence de l'oxygène, le niveau de Ca^{2+} dans le cytosol augmente, cela mène à l'activation du glutamate carboxylase. La tentative de produire les aliments enrichis en GABA a été proposée sur la base de LAB produisant des quantités élevées de GABA (Bhanwar *et al.*, 2013; Lamberts *et al.*, 2012).

III.2.1.1. Profil des polyphénols du cacao marchand

La variabilité des données a été observée pour leur teneur en épicatechine, en catéchine et en cyanidine-3-galactoside. La coloration des fèves brunes, blanches et violettes sont fortement corrélées avec un niveau élevé d'acides aminés et un niveau faible de l'épicatechine et de la catéchine, alors que les échantillons ardoisés indiquent un niveau élevé en cyandine-3-galactoside, en épicatechine et en catéchine ce qui justifie l'astringence typique du cacao. Le cacao marchand avec un faible degré de fermentation est caractérisé par l'astringence désagréable forte (Kadow *et al.*, 2015). Cependant, au cours de la fermentation, le contenu de la cellule se mélange, ce qui permet diverses réactions enzymatiques.

Les teneurs obtenues en épicatechine, en catéchine et en cyanidine-3-galactoside sont proches des résultats de certains auteurs qui ont montré que : les cotylédons sont composés de deux types de cellules du parenchyme. Plus de 90 % des cellules sont de petite taille et contiennent le protoplasme, des granules d'amidon, des grains d'aleurone et des globules gras. Les cellules plus grandes sont dispersées et contiennent l'ensemble des composés phénoliques et les purines. Ces cellules pigmentaires représentent 11 à 13% du tissu et contiennent des

anthocyanines. Trois groupes de phénols sont présents dans la fève de cacao : leucoanthocyanines (environ 58%), catéchines (environ 37%) et anthocyanines (environ 4%). La catéchine principale est la (-) ± épicatechine. Les autres catéchines sont les (+) - catéchine, (+) - gallocatéchine et (-) - epigal-locatechine. La fraction anthocyanes se compose essentiellement de cyanidine -3- arabinoside et cyanidine -3- galactoside (Belitz *et al.*, 2009).

En effet, selon Misnawi *et al.* (2003) travaillant sur les effets de l'incubation et de l'enrichissement en polyphénol oxydase sur la couleur, l'indice de fermentation, les procyanidines et l'astringence des fèves de cacao non fermentées et partiellement fermentées ; ont montré que l'oxydation des polyphénols et leur précipitation avec les protéines sont responsables de l'élimination du goût amer et du changement de couleur des fèves. D'ailleurs, les composés phénoliques empêchent apparemment la réaction de Maillard (réaction chimique que l'on peut observer lors de la fermentation ou une élévation de température ; elle correspond à l'action des sucres sur les protéines qui les font par exemple brunir au terme de la fermentation, et contribue notamment au goût des fèves fermentées) et la formation de flaveur de chocolat pendant la torréfaction par la réaction avec les sucres (Totlani & Peterson, 2005). Ainsi, en raison des propriétés antioxydantes de ces polyphénols, quand les fèves viennent à produire le chocolat promotion-santé, la nécessité de la qualité doit être orientée vers les ingrédients phénoliques. Les fèves violettes peuvent être ajoutées à la masse de cacao des fèves brunes (bien fermentées) pour produire le chocolat ; c'est ainsi que dans le cacao Arriba; les fèves pourpres sont mélangées à volume égales aux fèves brunes en raison de leur richesse en polyphénols (Rohsius, 2007).

Les fèves blanches observées dans l'échantillon du cacao marchand dériveraient certainement de la variété Criollo. En effet, Efombagn *et al.* (2008) utilisant des marqueurs de microsatellite, ont montré l'existence d'un niveau élevé de mélange dans certaines accessions de cacao avec le Criollo atteignant une proportion de 7 %. Les fèves blanches issues de la variété Criollo sont bien connues pour leurs saveurs caractéristiques.

Calligiani *et al.* (2014) ont montré que la variété Criollo est caractérisée par les niveaux élevés en acides aminés (précurseurs de composés aromatiques). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Tchouatcheu *et al.*, 2019. L'ardoisée correspond aux fèves non fermentées, la violette à une fermentation incomplète et la brune aux fèves bien fermentées. Cette classification a exclu le cacao de la meilleure qualité du groupe de Criollo qui manque d'anthocyanine d'où l'absence de coloration des fèves (Lieberei & Rohsius 2003 ;

Rohsius, 2007). Des fèves brunes sont généralement identifiées en tant que haute qualité en raison de la réduction de l'amertume, l'astringence, l'acidité et la formation des précurseurs d'arôme pendant la fermentation et le séchage. Toutefois, selon l'utilisation, les fèves ardoisées ou violettes peuvent être désirées pour leurs caractéristiques biochimiques.

III.2.2. Influence des acides sur les acides aminés après incubation

Le processus de dégradation dans les fèves acidifiées dépend de l'activité des protéases dans les cellules de stockage. En effet, des expériences d'incubation avec des fèves ont pour but d'acidifier les cotylédons afin d'activer les deux protéases importantes dans le tissu de stockage : l'endoprotéase aspartique et la carboxypeptidase (Voigt *et al.*, 1994). La dégradation des protéines de réserve induite par les acides est accomplie dans un délai de 48 heures. La cinétique de l'activité des protéases est-elle fonction des génotypes ? Si oui on observerait une dynamique dans l'accumulation des acides aminés libres.

III.2.2.1. Acides aminés

Les acides aminés hydrophobes obtenus dans le clone T79/501 montrent des concentrations sensiblement égales à celles des fèves incubées à l'acide acétique uniquement et à l'acide lactique puis à l'acide acétique. Cependant, il y'a une diminution des acides aminés mais après changement du milieu, à partir du 3^{ème} jour il y'a une augmentation des acides aminés hydrophobes. Ceci est dû au temps de diffusion de l'acide acétique dans les fèves, car, après 2 jours les fèves sont toujours dans l'acide acétique qui diffuse considérablement dans le génotype augmentant la concentration des acides aminés. De même, les teneurs en acides aminés des fèves issues des incubations acides lactique + acide acétique puis acide acétique et du traitement acide lactique puis acide lactique + acide acétique sont sensiblement égales. Mais, une variation des acides aminés est notée à partir du 3^{ème} jour car diminue légèrement. Une diminution des acides aminés est notée à partir du 3^{ème} jour dans le clone ICS40. Cette diminution est similaire dans tous les traitements. Par ailleurs, le clone German Cocoa a montré un pic d'alanine du jour 0 au jour 2 puis diminue à partir du jour 3. Ceci montre l'effet de l'acide lactique sur l'alanine. En effet, l'acide commence son action sur la fève dès leur premier jour de rencontre, ce qui permet d'activer les réactions biochimiques au sein de la fève. Cependant, il a été admis que les réactions enzymatiques post-mortem au cours de la fermentation, qui donnent naissance à des précurseurs de la saveur de cacao, ne commencent pas avant la mort des graines (Forsyth, 1963 ; Roelofsen, 1998). C'est dire qu'au troisième jour, l'augmentation de la température à 45 °C et la

concentration en acide acétique dans le milieu d'incubation (conditions qui entraînent la mort des fèves) établie la mort de la fève et par conséquent des modifications internes de la structure. Les résultats rapportés ici montrent que cette période est importante pour la protéolyse ultérieure. À la fin de l'incubation, la concentration totale en acides aminés hydrophobes augmentent au jour 5 par rapport au jour 0. Dans le groupe hydrophobe, les concentrations en leucine, phénylalanine, tyrosine et alanine ont augmenté de manière significative et en fonction des génotypes et des jours. Ces résultats sont similaires à ceux Kirchhoff *et al.* (1989) sur la particularité de l'accumulation d'acides aminés libres lors de la fermentation du cacao. Ces auteurs ont également trouvé des quantités considérables d'acides aminés libres hydrophobes, tels que la leucine, la phénylalanine, l'alanine et la tyrosine, accumulées pendant la fermentation du cacao, contribuant à la formation de la saveur de cacao.

En revanche, les résultats obtenus pour les acides aminés acides montrent une diminution chez tous les 3 génotypes. Cependant, chez le clone T79/501, à partir du 3^{ème} jour il y'a une légère hausse des acides aminés. De façon générale, il y'a dégradation des acides aminés acides, ceci s'explique par la présence des acides lactiques et acétiques dans le milieu. Chez le clone ICS40, il y'a dégradation complète de certains acides aminés. Ceci montre le lien étroit entre l'acidification et la dégradation de certains acides aminés. Ces résultats dépendraient également des types et des concentrations d'acides aminés libres présents dans les fèves de cacao non fermentées. Ces résultats sont similaires à ceux de Kirchhoff *et al.* (1989) qui ont montré que la diminution des acides aminés acides était probablement due au métabolisme des acides aminés et à leur dégradation. Biehl *et al.* (1985) ont montré que la diminution des acides aminés acides serait due au stade de protéolyse de la fermentation.

Les acides aminés autres ont montré des résultats variables chez les 3 génotypes. Chez le clone T79/501 il y'a une augmentation des acides aminés au cours du temps. Cependant, dans le traitement 1, il y'a une augmentation constante de la glycine mais une diminution de la thréonine dans le traitement 3. Dans le traitement 2, il y'a dégradation complète de certains acides aminés. Dans le traitement 4, les acides aminés autres diminuent au cours du temps. On peut penser que l'acide lactique a un effet délétère sur la synthèse les autres acides aminés. Chez le clone GC il y'a une constante des acides aminés synthétisés avec un pic de la lysine dans les 4 traitements. Selon les travaux de Bonvehi & Coll (2000), sur l'évaluation de l'amertume et de l'astringence des composés polyphénoliques dans la poudre de cacao ; Ces auteurs ont indiqué une complexation de protéines, réduisant ainsi leur effet de solubilité et

d'astringence au profil des acides aminés. Biehl & Passern (1982) et Jinap *et al.* (2008) ont suivi le développement d'acides aminés libres lors de la fermentation de fèves de cacao, indiquant que différents acides aminés avaient atteint leur valeur maximale différents jours de fermentation.

Les résultats de GABA (acide aminé non protéinogène) obtenus sont variables en fonction des traitements et en fonction des génotypes. Chez le clone ICS40, la teneur en GABA est élevée dans les traitements 3 et 4 au jour 1 puis diminue au cours du temps. Dans les clones GC et T79/501, la teneur élevée est notée uniquement dans le traitement 1. Cependant, du jour 1 au jour 5, il y'a une diminution de la teneur en GABA dans les traitements 1 et 3 mais une constance dans les traitements 2 et 4 comparé au clone T79/501 ou il y'a un pic de la teneur en GABA dans les traitements 1 et 3. Ceci serait dû à l'hydrolyse enzymatique provoquée par la présence des acides. Cette réduction de GABA au dernier jour de l'incubation dans certains traitements montre qu'il serait probablement utilisé dans la synthèse d'un autre composé biochimique. En effet, chez les plantes supérieures, le GABA est principalement métabolisé par une voie courte appelée shunt GABA. Le shunt GABA joue un rôle majeur dans le métabolisme primaire du carbone et de l'azote.

Dans les plantes, le GABA est principalement synthétisé via l'enzyme cytosolique GAD, qui catalyse la conversion irréversible du glutamate en GABA et CO₂. Selon à la spécificité du substrat, l'enzyme GABA-T peut être divisée en deux types : GABA-T dépendant de l' α -cétoglutarate (GABA-TK) et GABA-T dépendant du pyruvate (GABA-TP). Le premier utilise α - le cétoglutarate en tant qu'accepteur de groupe amino pour générer du glutamate, tandis que ce dernier utilise du pyruvate pour générer de l'alanine (Bouché & Fromm, 2004). Il est clair que le GABA-TP contient également du glyoxylate activité dépendante de GABA-T (GABA-TG), qui utilise le glyoxylate en tant qu'accepteur de groupe amino pour générer de la glycine (Shimajiri *et al.*, 2013). La production élevée de GABA par fermentation est corrélée à l'activité de l'acide glutamique décarboxylase (GAD) mais également à l'inhibition des enzymes qui décomposent le GABA. La GABA transaminase (GABA-T) favorise la conversion réversible de GABA en semi-aldéhyde succinique à l'aide de la GABA transaminase dépendante du pyruvate (GABA-TP) ou de la GABA transaminase dépendante du pyruvate (GABA-TP) et de la semi-aldéhyde dépendante du α -cétoglutarate (Takayama & Ezura, 2015).

III.2.3. Qualité du cacao en fonction du génotype

III.2.3.1. Qualité physico-chimique du cacao

L'analyse de la qualité du cacao implique l'évaluation du pH, la coloration des fèves et de l'indice de fermentation.

Le pH est un indicateur approprié pour mesurer le niveau d'acide total dans les procédés de fermentation. La pénétration de l'acide dans les fèves est le point de départ de la fermentation interne. La première population de microorganismes à apparaître est celle des levures qui vont transformer les sucres contenus dans la pulpe en éthanol et en dioxyde de carbone. Cette transformation va s'accompagner d'une production de chaleur laquelle augmente la température du milieu ferment, ce qui provoque la mort de l'embryon (Afoakwa *et al.*, 2013 ; Thompson *et al.*, 2013). Les conditions anaérobies créées par les levures entraînent le développement d'un environnement favorable au développement des bactéries acétiques qui préfèrent une forte concentration de dioxyde de carbone (ou une faible concentration d'oxygène).

Le pH des cotylédons passe de $6,88 \pm 0,007$ à $5,82 \pm 0,05$ dans les fèves de cacao du clone SNK16 pour le traitement 1 et à $5,47 \pm 0,02$ dans les fèves du clone SNK450 du traitement 2. Les fèves non incubées ont un pH élevé mais dès que les acides s'infiltrent dans les cotylédons, ses acides déclenchent une désorganisation des compartiments cotylédonaires à travers des ruptures des différentes membranes, ce qui entraîne une diminution du pH. Le traitement 1 (fèves incubées à l'acide acétique) a un pH faible par rapport au traitement 2 (fèves incubées à l'acide lactique puis à l'acide acétique) ce qui est dû à une forte accumulation de l'acide acétique sans autre alternance. En effet, durant la fermentation, il y a synthèse de l'acide lactique et de l'acide acétique mais avec une augmentation progressive de l'acide acétique (Crafack *et al.*, 2013 ; Zhao *et al.*, 2014). Egalement, selon Biehl *et al.* (1985), dans leur travaux sur l'acidification, protéolyse et potentiel aromatique dans la fermentation des fèves de cacao, ont montré que, la pénétration de l'acide dans les fèves à une température de 40 °C entraîne la mort des fèves par acidification des tissus internes et chute du pH. Outre la diffusion des acides, les tailles variables des fèves issues de ses différents génotypes de cacao expliqueraient également cette variation de pH. Ces résultats sont similaires à ceux de Eyamo, (2017) qui a observé une diminution de pH et cela dès le 3ème jour d'incubation des fèves de German cocoa comparée à celle de ICS40.

L'acidification progressive des fèves entraîne leur changement de coloration. Ce changement de coloration des fèves ardoisées (les fèves non incubées) qui deviennent successivement violettes puis brunes (couleur indicatrice d'une bonne fermentation) serait dû à l'hydrolyse enzymatique des flavan-3-ols et des anthocyanines constituantes majeurs des fèves non fermentées. Par ailleurs, les activités du polyphénol oxydase et des composés phénoliques dans les fèves de cacao non fermentées et fermentées pourraient influencer sur l'intensité de la formation de couleur. Les fèves fraîches étaient séchées sans aucune fermentation, la coloration est de couleur ardoisée, tandis que la coloration violette ou brune est issue des fèves de cacao fermentées et séchées. En effet, le brunissement de cotylédons des fèves résulte simultanément de l'hydrolyse enzymatique des anthocyanines et de l'oxydation des polyphénols. Selon Kongor *et al.* (2013), l'apparition de la coloration violette expliquerait par l'hydrolyse des anthocyanines tandis que l'apparition de la couleur brune résulterait de l'oxydation des flavonoïdes. En effet, les polyphénols oxydases convertissent les polyphénols (principalement l'épicatéchine et les anthocyanidines libres) en quinones. Les polyphénols et les quinones forment des complexes avec d'autres polyphénols, protéines et peptides. Ce processus diminue la solubilité et l'astringence des fèves de cacao et donne la couleur brune typique des fèves de cacao bien fermentées. Ces résultats permettent de confirmer les travaux de Eyamo *et al.* (2016) qui ont montré que le passage de la coloration violette à la coloration brune dépendait de l'oxydation des composés phénoliques tout en indiquant l'effet délétère de l'acide acétique comparé à l'acide lactique sur la teneur en flavan-3-ols.

L'indice de fermentation est calculé à partir de l'abondance résiduelle des anthocyanines et des composés phénoliques bruns mis en place pendant la fermentation (Afoakwa *et al.*, 2013). Les indices de fermentations présentant des valeurs supérieures à 1, indiquent une bonne fermentation (Gourrieva & Tserevitinov, 1979). Tous les génotypes testés ont montré des indices de fermentation inférieurs à 1 pour les fèves non fermentées, ceci s'explique par l'absence totale d'acide pour dégrader les enzymes responsables des composés phénoliques bruns créés pendant la fermentation. Par la suite, tous les génotypes ont présenté des indices supérieurs à 1 après passage dans les traitements 1 et 2 excepté le clone SNK620 qui a un indice de 0,977. Néanmoins, des valeurs variables d'indices ont été observées en fonction des génotypes et des traitements. Les valeurs les plus élevées, observées dans le traitement 1 seraient dues à la présence de l'acide acétique seul. En effet, la présence d'un seul acide entraîne une évolution de l'indice de fermentation comparée aux

indices obtenus dans le traitement 2. Ce résultat s'explique par la présence simultanée des deux acides (acétique et lactique) dans le milieu, ceci à cause de l'inhibition compétitive entre ses deux acides. Cependant, certains génotypes n'ont pas présenté de différence entre les deux traitements (SNK16, SNK624 et TIKO31) ceci est due à la faible diffusion des acides dans les volumes de ses fèves.

III.2.3.1.2. Profil des polyphénols des fèves de cacao après incubation

La réduction des teneurs en flavan-3-ols et des anthocyanines a été observée au cours de l'incubation. L'épicatéchine est le flavan-3-ol le plus abondant dans les fèves non incubées (30 000 et 45 000 mg/kg) pour les clones SNK450 et SNK48 respectivement. Soit une différence de 37,5 fois et 18 fois entre les deux flavan-3-ol. Après incubation, dans le traitement 2 (fèves incubées dans l'acide lactique pendant 2 jours puis dans l'acide acétique pendant 3 jours), la concentration en épicatéchine est plus élevée que dans le traitement 1 (fèves incubées uniquement dans l'acide acétique). Cette réduction de concentrations observée dans le traitement 1 est due à l'acide acétique qui a un effet délétère sur les polyphénols par rapport à l'acide lactique + acide acétique qui sont plus tôt en compétition. Cette dégradation n'est pas très accentuée chez le clone SNK48 du traitement 2. La catéchine est présente dans le traitement 2 chez les clones TIKO31 et SNK48 et absente dans le traitement 1. Ceci confirme la relation entre l'acidification et la dégradation des composés phénoliques et également la taille des fèves sur le déroulement de la fermentation interne. De plus, l'acide lactique déjà présent dans le milieu avant l'ajout de l'acide acétique ce qui va ralentir l'action de dégradation de l'acide acétique. Au cours de la fermentation, les concentrations de polyphénols dans les fèves diminuent en raison de la diffusion par la libération d'eau, ainsi que par l'oxydation et la condensation supplémentaire du composé polyphénol. Ces résultats sont similaires à ceux de Eyamo *et al.* (2016) sur l'influence des acides sur le profil des flavan-3-ols et anthocyanines natives du cacao. Ces auteurs ont montré que la nature de l'acide entré la première dans la fève conditionne le degré de dégradation des flavan-3-ols, ce qui permet le déclenchement immédiat des réactions biochimiques au sein de la fève. En addition, outre l'hydrolyse enzymatique provoquée par la présence des acides, la réduction de la teneur en flavan-3-ols serait due soit à leur liaison avec les protéines (surtout l'albumine) ou à leur polymérisation afin de former les tanins insolubles ; soit alors à leur exsudation (Misnawi *et al.*, 2003). Les teneurs en catéchine sont élevées dans les fèves non incubées par rapport aux teneurs obtenues dans les fèves incubées dans les traitements 1 et 2. Brennette Adam *et al.* (1928), ont travaillé sur la détermination des

constituants producteurs de couleur chez la fève de cacao. Ces auteurs ont indiqué que la fève et de cacao non fermentée contient à la fois du tanin et de la catéchine. De plus, la cyanidine est également présente sous forme de cyanidine-arabinoside et de cyanidine-galactoside. La fraction anthocyane se compose essentiellement de cyanidine-3-arabinoside et cyanidine-3-galactoside (Belitz *et al.*, 2009). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins. Ils ne sont pas directement impliqués dans un processus métabolique quelconque et sont de ce fait considérés comme des métabolites secondaires (Ivory, 2000 ; Niemenak *et al.*, 2006).

III.2.3.1.3. Profil des acides aminés libres après incubation

Les acides aminés acides présents majoritairement chez les fèves non incubées sont Glutamate (Glu) et Asparagine (Asn); Alanine (Ala) et Tyrosine (Tyr) pour les acides aminés hydrophobes et enfin Arginine (Arg) et Tryptophane (Trp) pour les autres acides aminés.

Les acides aminés acides diminuent après incubation dans l'acide acétique (traitement 1) et dans le traitement 2 (fèves incubées à l'acide lactique puis acide acétique) comparés aux acides aminés des fèves non fermentées. Après incubation, la glutamine (Gln) et la méthionine (Met) apparaissent dans les deux traitements à des concentrations élevées, ces acides aminés sont absents dans les fèves non incubées. Toutefois, la disparition de l'histidine (His) est notée dans le traitement 2. Cette diminution de la teneur en acides aminés acides peut s'expliquer par les réactions de catabolisme des protéines de réserves dans les fèves qui se produisent pendant l'incubation. En effet, la dégradation des acides aminés acides a été notée d'où leur diminution au cours des deux traitements. Le processus de dégradation dans les fèves acidifiées dépend de l'activité des protéases dans les cellules de réserve. Les travaux de Cros (1995) sur la qualité du cacao: influence de la fermentation et du séchage, ont montré que la quantité d'acides aminés libres observée chez les fèves non fermentées des génotypes Trinidad de Madagascar était le double de celle observée chez les fèves fermentées. De plus, le degré de maturité des cabosses ou fèves influence également le taux d'acides aminés libres formés.

Au cours de la fermentation du cacao, la protéolyse, catalysée par une endoprotéase aspartique et une carboxypeptidase, donne naissance à des acides aminés et à des oligopeptides. La forte présence des acides aminés hydrophobes à la fin de l'incubation confirme leur rôle de précurseurs spéciaux d'arôme chez le cacao (Voigt, *et al.*, 1993). En effet, la libération prédominante d'acides aminés libres hydrophobes au cours de la

protéolyse entraîne la forte proportion de ces acides aminés après la fermentation. Les résultats de cette étude montrent que l'incubation peut augmenter la concentration des acides aminés (hydrophobes et autres) libres. Dans le traitement 2, la concentration moyenne des acides aminés hydrophobes est de 6 054,02 mg/kg ffdm avec la prédominance de Glu, Asn, leu, Phe, Lys et Arg tandis que dans le traitement 1, cette concentration est de 10 220,30 mg/kg ffdm avec une prédominance de Glu, Asn, Gln, leu, Phe, Tyr, Trp, Lys et Arg soit une différence de 4 166,28 mg/kg ffdm, ceci montre l'effet de l'acide acétique sur l'hydrolyse des protéines pour la synthèse des acides aminés au cours de l'incubation des fèves de cacao. Ainsi, la présence de l'acide acétique de façon continue avec une augmentation de la température dans le traitement 1 activerait, dans les cotylédons les protéases et les enzymes hydrolytiques et augmenterait par conséquent le volume des acides aminés synthétisés dans le milieu. De plus, ces acides aminés libres sont vraisemblablement le résultat de l'activité spécifique de l'endoprotéase aspartique, qui sépare les protéines en peptides hydrophobes, permettant à une action limitée de la carboxypeptidase de libérer des acides aminés libres principalement hydrophobes. Il en est de même pour les autres acides aminés.

Les enzymes hydrolytiques impliquées dans la formation des composés précurseurs incluent l'amylase, la lipase, la décarboxylase d'acide aminé, la peroxydase, et le polygalacturonase. Selon Janek *et al.* (2016), la prédominance des acides aminés hydrophobes sur les acides aminés acides et autres est due aux spécificités d'hydrolyse de la protéase aspartique de cacao et de la carboxypeptidase. En effet, ces deux protéases (l'endopeptidase et l'exopeptidase) sont impliquées dans la protéolyse du cacao. L'endopeptidase est une protéase aspartique qui présente un pH optimal à 3,5; il sépare les protéines au niveau des sites d'acides aminés hydrophobes pour produire des oligopeptides relativement hydrophobes. En effet, cette protéase vient stimuler la diffusion de l'acide acétique dans les fèves réduisant ainsi la quantité d'acides aminés dans le traitement 1. L'exopeptidase est une carboxypeptidase dont le pH est optimal à 5,8; il sépare les oligopeptides hydrophobes produits par l'aspartique peptidase à leurs extrémités carboxy terminales pour produire des oligopeptides hydrophiles et des acides aminés hydrophobes (Biehl *et al.*,1993). Bytof *et al.* (1995) ont montré que la valeur du pH influait sur la spécificité de la carboxypeptidase et que la libération des acides aminés acides était favorisée par les faibles valeurs du pH, mais qu'en général les peptides contenant des résidus d'arginine, de lysine ou de proline carboxy sont résistants à la dégradation par la

carboxypeptidase de la fève de cacao. L'enzyme libère préférentiellement les acides aminés hydrophobes, alors que les acides aminés acides sont libérés très lentement.

Rohsius (2006) a prouvé que le ratio hydrophobes / acides des acides aminés est un indicateur du procédé d'incubation et de fermentation. En termes du ratio hydrophobe/acide/autre des acides aminés libres, les résultats obtenus ont montré que les fèves bien incubées ont une teneur élevée en acides aminés libres et le ratio élevé d'hydrophobe/acide des acides aminés libres pour la qualité. Des génotypes de cacao choisis dans ce travail sont différenciés par la quantité d'acides aminés libres et par le rapport des acides aminés libres hydrophobes aux acides libres. Il est donc possible que, en raison de leurs différences (volumes), l'acidification et, par conséquent, l'induction de la protéolyse se produisent plus tôt et que les quantités élevées d'acides aminés libres soient atteintes après une période de cinq jours d'incubation.

III.2.3.1.4. Profil des sucres réducteurs

Cette étude a montré que des totaux de saccharose, glucose, fructose, galactose et raffinose (alcools de sucre) variés en fonction des traitements et des génotypes. Les sucres dominants dans les fèves de cacao sont le saccharose, le fructose et le glucose. Nombreux autres sucres sont détectés dans les fèves frais de cacao (Berbert, 1979 ; Forsyth & Quesnel, 1963). En effet, La pulpe de cacao contient entre 82 et 87 % d'eau, 10 à 15 % de sucres (60 % de saccharose et 39 % du mélange de glucose et fructose), 1 à 1,5 % de pectine et 1 à 3 % d'acide citrique. Les protéines, les acides aminés, les vitamines (principalement la vitamine C), et les sels minéraux constituent également la pulpe issue de la cabosse mûre (Schwan & Wheals, 2004). Le saccharose a été présent dans tous les génotypes pour les fèves non incubées mais après incubation, ce sucre n'apparaît plus dans tous les génotypes. Ceci s'expliquerait par la présence des acides au cours de la fermentation. En effet, Knapp, (1937) a montré que le saccharose disparaît presque complètement lors de la fermentation. Ces résultats confirment la conclusion de Rohan & Stewart (1967), que la plus grande partie du saccharose aura été hydrolysée au milieu de la période de fermentation. Le saccharose est la principale forme de transport de carbone et une forme de stockage glucidique. De plus, ceci pourrait être dû à la présence de l'acide car la liaison glycosidique des sucres hydrolysée par l'action d'un acide. De façon générale, en présence d'une solution acide même faible l'hydrolyse du saccharose conduit au sucre inverti constitué d'un mélange de D-glucose et de

D-fructose. Cette réaction, dite inversion du saccharose, peut aussi être obtenue par l'enzyme invertase (Corma *et al.*, 2007).

La concentration la plus élevée des sucres a été trouvée pour le galactose dans le clone SNK620. En effet, cette concentration a été 4 fois plus élevée dans ce clone par rapport aux autres et cela dans les fèves non incubées (traitement témoin). Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation de la proportionnalité relative des sucres pendant la maturation. Cependant, les conditions environnementales affectent également la composition biochimique en sucres. La quantité de ce sucre est faible dans tous les génotypes et dans tous les traitements (≥ 6 mg). Toutefois, la teneur de ce sucre est supérieure dans le traitement 2 comparé au traitement 1 pour les clones TIKO32, SNK450, SNK48 et SNK15. Ceci confirme que, l'acide acétique seul dégrade le galactose comparé à l'acide lactique + acide acétique. Au stade initial de la fermentation, la quantité d'oxygène gazeux et dissous diffusant dans le cotylédon est limitée ; cette condition provoque des réactions enzymatiques hydrolytiques. En même temps, les anthocyanes sont hydrolysés par la glycosidase pour produire l'anthocyanidine, du galactose et de l'arabinose ; à côté de la dimérisation des leucocyanidines et de l'exsudation des flavonoïdes hors de la fève (Hoskin & Dimick, 1994 ; Misnawi, 2008).

Le fructose et le glucose sont les principaux sucres réducteurs dans les fèves de cacao. La teneur en fructose est faible dans les fèves non incubées comparée aux fèves incubées. Une variation de la teneur en fructose dans les génotypes est notée avec un pic dans le traitement 2 chez le clone SNK48. Cependant, 7 clones ont présenté des teneurs élevées dans le traitement 2 comparé au traitement 1. Cette différence est due à la pénétration des acides dans les fèves, plus particulièrement à l'acide acétique seul, qui a stimulé l'augmentation de ce sucre dans le traitement 2 comparé au traitement 1. La teneur en fructose est supérieure à celle du glucose dans la fève de cacao incubée. Ceci, en raison de la synthèse d'amidon qui se fait à partir de glucose. Cependant, la teneur en fructose est moins utilisée car, il nécessite une conversion et par conséquent, il se trouve à une concentration supérieure à celle du glucose à la fin de l'incubation. Le saccharose contenu dans les fèves de cacao fraîches est hydrolysé en glucose et en fructose au cours de la fermentation et la vitesse de la réaction confirme l'inclusion possible de sucres réducteurs parmi les précurseurs de l'arôme de chocolat. La concentration optimale en sucres réducteurs dans les fèves est atteinte à peu près au même moment que le développement maximal du goût (qualité) et coïncide approximativement avec le pic de concentration en acides aminés. Les sucres réducteurs sont

des arômes de carbonyle précurseurs dans la fève de cacao fermentée, qui sont principalement produits par hydrolyse du saccharose par l'action de l'invertase (Rohan & Stewart, 1967). Par ailleurs le ratio fructose / glucose montre des valeurs comprises entre 0,75 et 1,25. L'absence de dominance du fructose dans les deux traitements après incubation suggère que d'autres variables, telles que le génotype et le type de fermentation, auront une influence profonde sur le profil du sucre dans les fèves de cacao.

Le raffinose (un triholoside (oligoside)) composé d'une unité de galactose, d'une unité de glucose et d'une unité fructose, ou plus simplement c'est une unité de galactose attachée à une unité de saccharose par son glucose. L'hydrolyse du raffinose par une α -galactosidase donne du saccharose et du galactose. L'augmentation et la variation de ces sucres dans les génotypes après traitements pourraient être liées à la maturation avancée des fruits. Selon Zhang *et al.* (2010), l'accumulation des sucres se produit lors du développement du fruit et continue jusqu'à la période de la récolte. La raffinose est présente dans tous les génotypes non incubés et à des concentrations élevées comparé à sa teneur presque inexistante dans les fèves incubées. Cependant, ce sucre apparait dans les clones SNK16, SNK620 et SNK624. En effet, ce sucre est présent dans le fruit dès sa maturation. Au final, les fèves non incubées contiennent le saccharose, le galactose, le fructose et la raffinose à quantité très élevée. Ces résultats ne sont pas similaires à ceux de Reineccius *et al.* (1972) sur la quantification et qualification des sucres réducteurs dans les fèves de cacao. Ces auteurs ont rapporté que les fèves de cacao non fermentées contiennent 15,8 mg / g de saccharose et des traces de fructose, le sorbose, le mannitol et l'inositol. De plus, Les fèves fraîches ne contiennent très peu de sucres réducteurs.

Au cours de la fermentation, la teneur en saccharose décroît rapidement au bénéfice de la formation de fructose et de glucose dont les teneurs sont maximales vers le 4^{ème} jour, puis diminuent légèrement les jours suivants. Ces sucres sont des précurseurs des réactions de caramélisation et de Maillard (Cros & Jeanjean, 1995). Puziah *et al.* (1998) ont trouvé que le saccharose et les autres sucres ont diminué de manière significative au cours de l'incubation, aux concentrations de 2,0 et 5,0 g/kg, respectivement. La diminution du taux de sucres dans le traitement 1 et 2 serait dû à l'interaction de sucres réducteurs et d'acides aminés et l'ensemble de leurs réactions successives est appelée brunissement non-enzymatique ou encore réaction de Maillard (Maillard, 1912). En effet, une partie du glucose est soit préférentiellement métabolisé, soit polymérisé, car le saccharose est hydrolysé pendant la fermentation. La corrélation apparente entre la fermentation et le degré de domination des

cétoles dans la fraction de sucre réducteur revêt une importance particulière pour le brunissement de Maillard lors de la torréfaction des fèves de cacao afin de développer un goût de chocolat (Reineccius *et al.*, 1972). Ces différences observées, ont été attribuées à la méthode, au temps de la récolte, au type et à l'origine des fèves de cacao. À ce niveau, la fonction amine seulement joue un rôle de catalyseur et l'acide aminé libre ou constitutif d'une protéine n'a pas été encore dégradé. Seul l'ose a été transformé. On pourrait d'ailleurs obtenir une transformation comparable de l'ose sous la seule action de la chaleur. Les réactions de Maillard conduisent donc essentiellement à la formation d'arômes. Le saccharose est présent dans les traitements 1 (SNK10, SNK16, SNK620, SNK450, SNK48, SNK15) et 2 (TIKO32, SNK64, SNK10, SNK16, SNK620, SNK624, SNK450, SNK15) et dans toutes les fèves non incubées. De plus, Reineccius *et al.* (1972) ont montré que ces changements des sucres dans les fèves de cacao sont sans aucun doute des variables importantes affectant la formation de composés volatils à partir de réactions de brunissement non enzymatiques. Les sucres, en particulier les sucres réducteurs, sont reconnus comme une classe de précurseurs importante. En fonction des traitements reçus par les fèves, les sucres de pulpe peuvent être retenus ou libérés et contribuent à la fraction sucres des fèves de cacao.

Conclusion et Perspectives

IV.1. Conclusion

L'objectif général de ce travail était de caractériser les marqueurs physico - chimiques de quelques génotypes de cacao et du cacao marchand.

Les résultats obtenus, montrent que la présence directe des fèves dans l'acide acétique est précoce car provoque une intense dégradation et par conséquent influence le taux de production des flavonoïdes, des anthocyanines et même des acides aminés et des sucres. De plus, la variation des génotypes (variation des tailles des fèves) a également influencé la pénétration des acides dans les fèves. La comparaison entre les fèves issues du traitement 1 révèle une différence par rapport aux fèves issues du cacao marchand. De plus, une différence est observée entre les fèves issues du traitement 2 et les fèves issues du cacao marchand pour les teneurs en polyphénols, acides aminés et sucres. La quantité initiale d'acides aminés libres contribue au volume total d'acides aminés libres dans les fèves fermentées de cacao. Les fèves non fermentées contiennent des quantités faibles d'acides aminés libres par rapport aux quantités obtenues dans les fèves fermentées. Au cours de l'incubation, les concentrations en acides aminés hydrophobes et autres augmentent considérablement. Les acides aminés hydrophobes précurseurs d'arôme, identifiés étaient constitués de l'alanine, la leucine, l'isoleucine, la valine et la phénylalanine. Ainsi, l'addition de l'acide acétique induit une dégradation des protéines en acides aminés. L'hypothèse selon laquelle l'ordre d'apparition des acides influencerait la composition des marqueurs biochimiques est validée.

Ce travail révèle la composition en acides aminés et le profil polyphénol des fèves de cacao à différents stades. Selon les stades de fermentation étudiée, aucune différence significative n'a été observée chez les fèves violettes et les fèves brunes en ce qui concerne les acides aminés libres. De même, l'analyse des composés phénoliques à différents stades de fermentation n'a présenté aucune différence significative. L'analyse en composantes principales des fèves à différents stades de fermentation montrent une forte corrélation pour un niveau élevé d'acides aminés et un niveau faible en épicatechine et en catéchine. Ces résultats montrent que l'utilisation de fèves de cacao partiellement fermentées peut constituer une vaste collection de potentiels bioactifs pouvant être inclus dans la conception d'aliments fonctionnels. Ainsi, ce résultat met en lumière un autre usage des fèves violettes du cacao ce qui permet aux pays producteurs, de renforcer les régimes alimentaires avec un impact positif sur l'état de santé des populations. Ceci permet d'affirmer la première hypothèse de cette étude.

Toutefois, la qualité du cacao en fonction du génotype varie suivant le traitement. En effet, la variation de la teneur en épicatechine dans les fèves incubées et non incubées montre une différence significative entre fèves non incubées et fèves incubées à l'acide acétique uniquement (T1) mais aucune différence significative n'est notée entre (T1) et les fèves incubées à l'acide lactique puis l'acide acétique (T2). De même, la variation de la teneur en cyanidine-3-galactoside des fèves incubées et non incubées montre une différence significative entre T0 et T1, T0 et T2 mais aucune différence entre T1 et T2. Le contenu final des sucres dans différents génotypes varie considérablement dans les fèves incubées et non incubées. Enfin, les travaux présentés permettent de redéfinir les marqueurs de qualité du cacao à partir des constituants du cacao formés lors de la fermentation du cacao. Dans l'industrie cacaoyère, l'état de la fermentation est évalué conformément à la norme ISO 2451. Dans cette méthode, le test de coupe est utilisé pour définir les qualités de la fermentation telles que celles qui sont fermentées et bien fermentées, en procédant à une inspection visuelle d'un pourcentage de fèves.

L'intérêt scientifique global de ce travail est la mise en évidence de l'effet de l'acide sur les marqueurs biochimiques lors de la fermentation. Son intérêt économique et social est la valorisation du cacao marchand camerounais auprès des industries qui utilisent cette matière première pour la production des produits dérivés de cacao. L'application des critères biochimiques, en plus des méthodes traditionnelles d'évaluation, qui sont souvent basées sur l'origine géographique des fèves, améliorerait la différenciation de l'approche de l'industrie des matières premières. Ceci permettrait le développement de nouveaux produits sur la base des fèves présélectionnées de cacao en coopération avec les pays producteurs aussi bien qu'une meilleure influence sur les procédés après la récolte dans le sens de la certification de la qualité. Une fois intéressé pour les attributs salutaires de santé humaine liés aux polyphénols de cacao, les fabricants devraient considérer les fèves ardoisées-violettes ou violettes tandis que pour les produits potentiels aromatisés, les industries auront besoin des fèves brunes c'est-à-dire les fèves bien fermentées.

Impact sur le plan développement : la filière cacao camerounaise gagnerait en transformant ses fèves rejetées pour cause de mauvaise fermentation ou sous valorisées par le marché international. En effet, les résultats obtenus dans ce travail démontrent clairement que les acides aminés et les composés phénoliques obtenus dans les fèves violettes ne présentent aucune différence significative par rapport à ce qui a été trouvé dans les fèves brunes. De même, ce résultat met en avant un autre usage des fèves violettes du cacao ce qui permettra

au Cameroun en particulier, de renforcer les régimes alimentaires avec un impact positif sur l'état de santé des consommateurs.

IV.2. Perspectives

Les résultats obtenus dans ce travail créent d'autres horizons de recherche. Il s'agit :

- d'étudier le profil oligopeptides de ces génotypes pour établir une corrélation entre la disparition de certains peptides, fournissant ainsi un aperçu mécanique de la relation entre les composés précurseurs.
- d'initier une étude sur le protocole de fermentation ou une fiche technique par rapport au type de fermentation effectuée dans les grandes zones de cacaoculture au Cameroun;
- d'étudier les différences de tailles cellulaires pouvant modifier l'invasion des acides tels que les acides acétique et lactique dans les fèves.

REFERENCES

- Abega J., 2017. *Evaluation de l'efficacité des procédés de fermentation sur la qualité du cacao marchand*. Master, Faculté des sciences, Université de Yaoundé, 72P.
- Afoakwa E.O., 2010. *Chocolate Science and Technology*. Wiley-Blackwell. UK., pp 3–82.
- Afoakwa E. O., Paterson A., Fowler M., & Ryan A., 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9): 840-857.
- Afoakwa E.O., Quao J., Takrama J., Budu A.S., & Saalia F.K., 2013. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of food science and technology*, 50(6) : 1097-1105.
- Alet C. , 2013. Consommation: un chocolat au goût amer. *Alternatives économiques*, (1) : 48-48.
- Alverson W.S., Whitlock B.A., Nyffeler R., Bayer C. & Baum D.A., 1999. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from ndhF sequence data. *American Journal of Botany*, 86(10): 1474-1486.
- Aneja M., Gianfagna T. & Ng E., 1999. The roles of abscisic acid and ethylene in the abscission and senescence of cocoa flowers. *Plant Growth Regulation*, 27 (3): 149-155.
- Anonyme 5, 2014. Métabolisme des protéines et des acides aminés. Nutrition, Elsevier.
- Anonyme 2, 2015. About Cocoa: Pests and Diseases. [<https://www.icco.org/about-cocoa/pest-a-diseases.html>] Retrieved from <http://www.icco.org/aboutcocoa/pest-a-diseases.html>.
- Anonyme 6, 2017. Acides aminés. Symbiotech.over-blog.com.
- Anonyme 4, 2017. Biosynthèse des acides aminés chez les plantes. www.takween.com/materiaux.acidesamines.biosynthèse.
- Anonyme 7, 2017. Biosynthèse des acides aminés chez les plantes. Famillesbonin.com
- Anonyme 1, 2018. Cacao: Le Cameroun progresse dans la production afriqueorient.com ; [<http://afriqueorient.com/2018/08/08/cacao-le-cameroun-progresse-dans-la-production/>]
- Anonyme 3, 2018. Filière Cacao. <https://cameroonblog.info/2018/08/08/filiere-cacao-la-reliance-en-marche>.
- Ardhana M.M. & Fleet G.H., 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2): 87– 99.
- Arvy M.P. & Gallouin F., 2003. *Epices, aromates et condiments* Paris: Belin, 412p

- Banchuen J., Thammarutwasik P., Ooraikul B., Wuttijumnong P. & Sirivongpaisal P., 2010. Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of Southern Thai brown rice. *Songklanakarinn Journal Science Technology*, 32(3): 219–230.
- Bennettá Adam W., 1928. Determination of the colour-producing constituents of the cacao bean. *Analyst*, 53(628): 369-372.
- Banks J.M., Yvon M., Gripon J.C, De la Fuente M.A., Brechany E.Y., Williams A.G. & Muir D.D., 2001. Enhancement of amino acid catabolism in Cheddar cheese using aketoglutarate: amino acid degradation in relation to volatile compounds and aroma character, *International Dairy Journal*, 11(4-7): 235-243.
- Barel M., 1995. Traitement du cacao par fermenteur et séchoir intégrés. *Plants Recherche et Développement*, 2 (5) : 35-42.
- Barel M., 2013. *Qualité du cacao. L'impact du traitement post-récolte*. Edition Quae. Versailles, France.
- Bartley B., 2005. *The Genetic Diversity of Cacao and its Utilization*. CABI Publishing, 400 p.
- Basheer L. & Kerem Z., 2015. Interactions between CYP3A4 and Dietary Polyphenols Review Article *Hindawi Publishing Corporation*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 15p.
- Belitz H.D., Grosch W., & Schieberle P., 2009. Cereals and cereal products. *Food chemistry*, 670-745.
- Berbert P.R.F., 1979. Contribuicao para oconhecimento dos acuceres componentes da amendoa e do mel de cacau. *Revista Theobroma (Brasil)*, 9(2): 55–61.
- Bernoulli G., 1869. Über der bis jetzt bekanneten arten von Theobroma neue denkschriften der allegmeinem schweizerischen gesellschaft für die gasamnten naturwissen schaftler, 234:1-5.
- Bhanwar S., Bamnia M., Ghosh M. & Ganguli A., 2013. Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with γ -aminobutyric acid. *International Journal Food Science Nutrition*, 64(1): 77-81.
- Biehl B. & Passern D., 1982. Proteolysis during fermentation like incubation of cocoa seeds. *Journal Science Food and Agriculture*, 33(12): 1280-1290.
- Biehl B., Brunner E., Passern D., Quesnel V.C. & Adomako D., 1985. Acidification, Proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 36(7): 583-598.

- Biehl B., Heinrichs H., Ziegler-Berghausen H., Srivastava S., Xiong Q., Passern D., Senyuk VI. & Hammor M., 1993. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angewandte Botanik*, 67(1-2): 59-65.
- Biehl B. & Ziegleder G., 2003. *Cocoa: chemistry of processing*. Encyclopedia of food sciences and nutrition. Second Edition. pp. 1436–1448.
- Boizot N. & Charpentier J-P., 2006. *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier*. Le Cahier des Techniques de l'Inra. Numéro spécial. Pp: 79-82
- Bonvehí J. S. & Coll F. V., 2000. Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 210(3): 189-195.
- Bouche N., & Fromm H. 2004. GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in plant science*, 9(3): 110-115.
- Bown A.W. & Shelp B.J., 1997. The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115(1): 1.
- Bravo L., 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11) : 317-333.
- Bruneton J. 1993. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Bruneton J., 2008. Acides phénols. In: *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp: 198-260.
- Bytof G., Biehl B., Heinrichs H., & Voigt J., 1995. Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of *Theobroma cacao* L. *Food chemistry*, 54(1): 15-21.
- Caligiani A., Marseglia A., Prandi B., Palla G. & Sforza S., 2016. Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean. *Food Chemistry*, 211: 431-439.
- Caligiani A., Palla L., Acquotti D., Marseglia A. & Palla G., 2014. Application of HNMR for the characterization of cocoa beans of different geographical origins and fermentation levels. *Food Chemistry*, 157: 94–99.
- Chaouche T.M., 2014. *Etude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Analyse par HPLC-SM les extraits les plus actifs*. Thèse, University of Tlemcen.

- Charrier A. 1969. Contribution à l'étude de la morphogenèse et de la multiplication végétative du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Café, Cacao, Thé*, 13(2): 97-114.
- Cheesman E.E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Tropical Agriculture*, 21: 144-159.
- Christensen J.E., Dudley E.G, Pederson J.A. & Steele J.L., 1999, Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4): 217–246.
- Copetti M.V., Iamanaka B.T., Pitt J.I. & Taniwaki M.H., 2014. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology*, 178: 13-20.
- Corma A., Iborra S. et Vely A. 2007. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chemical Review*. pp: 2411-2502.
- Counet C., Ouwerx C., Rosoux D. & Collin S., 2004. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 6243-6249.
- Crafack M., Mikkelsen M. B., Saerens S., Knudsen M., Blennow A., Lowor S. & Nielsen D. S., 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International journal of food microbiology*, 167(1): 103-116.
- Crane J.H., Balerdi C.F. & Joyner G., 2013. Cocoa (Chocolate Bean) Growing in the Florida Home Landscape. *IFAS Extension*, HS1067, University of Florida, USA, 6p.
- Cros E. & Jeanjean N., 1995. Qualité du cacao influence de la fermentation et du séchage. *Plantation, Recherche, Développement*, 3: 21-27.
- Cros E., 1995. *Cocoa aroma formation, Cocoa meetings: The various aspects of quality*, Seminar Proceedings, Montpellier, p. 169-179.
- Croteau R., Kutchan T.M. & Lewis N.G., 2000. Natural Products (Secondary metabolites). *In: Buchanan B., Grissem W, Jones R. (eds), Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society. of Plant Physiologists.*
- Crozier A., 2003. Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. *In Plants" Diet and Health"*. Ed. *Goldberg*. pp: 27- 48.
- Crozier A., Clifford M.N., & Ashihara H., 2006. Plant secondary metabolites: *Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, John Wiley & Sons.
- Cuatrecasas J., 1964. Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*.
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. & Masella R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità*, 43(4): 348-361.

- De Brito E.S., Garcia N.H.P., Gallão M.I., Cortelazzo A.L., Fevereiro P.S. & Braga M.R., 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. *Journal of Science of Food Agriculture*, 81: 281-288.
- De Roos J. & De Vuyst L., 2018. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion Biotechnology*, 49: 115–119.
- De Vuyst L. & Weckx S., 2016. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.13045.
- Delattre A. S., 1995. *Le chocolat* Th: Ph: Angers: 121, 69p
- Dembinska-Kiec A., Mykkänen O., Kiec-Wilk B. & Mykkänen H., 2008. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 99: ES109-ES117.
- Demol J. 2002. L'amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Ed. *Presses Agronomiques Gembloux*. 560 p
- Diana M., Quílez J. & Rafecas M., 2014. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods*, 10: 407-420.
- Dias L.A.S., Barriga P.J., Kageyama Y.P. & Almeida C.V., 2003. Variation and its distribution in wild cacao populations from the Brazilian Amazon. *Brazilian Archive of biology and technology* 46: 507-514.
- Efombagn M.I.B., Motamayor J.C., Sounigo O., Eskes A.B., Nyassé S., Cilas C., Schnell R., Manzanares-Dauleux M.J. & Kolesnikova-Allen M., 2008. Genetic diversity and structure of farm and genebank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. *Tree Genetic Genome*, 4: 821-831.
- Endamana D., Nkamleu G.B., Adesina A. A., Ndoeye O., Sonwa D. J., Gockowski J., 2001. Diversification within cocoa plantation: A Logic Model Application in the Forest Zone of Cameroon. 16 p
- Eskes A. & Lanaud C., 1997. *Le cacaoyer*. In : L'amélioration des plantes tropicales. CIRAD, Montpellier, France, pp. 116-125.
- Evans H.C., 2016. Witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*): history and biology. *In: cacao diseases: a history of old enemies and new encounters*, pp. 137-177.
- Evans H.C., Bezerra J.L. & Barreto R.W., 2013. Of mushrooms and chocolate trees: aetiology and phylogeny of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. *Plant Pathology*, 62: 728–740.

- Eyamo E.J.V., De Taeye C., Niemenak N., Youmbi E. & Collin S., 2016. Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT Food Science Technology*, 68: 514-522.
- Eyamo E.V.J., 2017. *Modélisation de la fermentation du cacao: impact sur les sucres composés phénoliques et caractérisation des marqueurs biochimiques de la qualité*. Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université de Yaoundé, 109p.
- Ferrer J. L., Austin M. B., Stewart Jr C. & Noel J. P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 356-370.
- Folefack D. P., 2003. *Analyse socio-économique de la commercialisation du cacao en zone forestière du sud Cameroun*. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique - Diplôme d'Etudes Spécialisées en Economie et Sociologie rurales, 109p.
- Forsyth W.G.C., 1952. Cocoa polyphenolic substances. 2. Changes during fermentation. *Biochemical Journal*, 51(4) : 516.
- Forsyth W.G.C., 1955. Cocoa polyphenolic substances. 3. Separation and estimation on paper chromatograms. *Biochemical Journal*, 60(1): 108.
- Forsyth W.G.C. & Quesnel V.C., 1963. Mechanism of cocoa curing. *Advance Enzymology relation Areas Molecular Biology*, 25: 457-492.
- Fowler M. S., 1995. Quality of cocoa powder producers. Seminar Proceedings. *Cocoa Meeting*, Montpellier. 147-153.
- Fowler M. S., 1999. Cocoa Beans: from tree to factory. *In: industrial chocolate manufacture and Use*. S. T. Beckett. Blackwell Science, Oxford. 3: 8-35.
- Frommer W. B. & Sonnewald U., 1995. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *Journal of Experimental Botany*, 46(6) : 587-607.
- Ghedira K., 2005. Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4) : 162-169.
- Gillet S., 2012. Rappels de chimie des sucres. Université de Liège. 1-14 .
[[https://orbi.uliege.be › bitstream › Chimie des sucres](https://orbi.uliege.be/bitstream/Chimie%20des%20sucres)]
- Gockowski J. & Dury S., 1999. The economic of cocoa-fruit agroforest in southern Cameroon. IITA. 14 p.
- Gourieva K.B. & Tserrevitinov O.B., 1979. Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans. *USSR Patent No. 646254*.
- Guehi T.S., Zahouli I.B., Ban-Koffi L., Fae M.A. & Nemlin J.G., 2010. Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw

- cocoa material. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(8): 1564–1571.
- Hansen C.E., Del Olmo M. & Burri C., 1998. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(2): 273–281.
- Havsteen B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3): 67– 202.
- Zhao J., & Fleet G. , 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72-87.
- Hopkins W.G., 2003. Assimilation du carbone et productivité. *In: Physiologie végétale. Traduction de la 2ème édition américaine par Serge Rambour. Editions De Boeck université, 515p.*
- Hoskin, J.C. & Dimick P.S., 1994. Chemistry of flavour development in chocolate. *In: Beckett, S.T., Industrial Chocolate Manufacture and Use, 2nd edition. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 102–115.*
- Hulin S., 2001. Le chocolat: un aliment, une drogue Th: Ph : *Angers*: 128, 7- 69p
- International Cocoa Organization (ICCO)., 2019. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLV, No.3, Cocoa year 2018/19. [<https://www.icco.org/statistics/production-and-grindings/production.html>]
- Ivory E., 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. *Revue Nutrition*, 16:7-8.
- Jalil A. & Ismail A., 2008. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13(9) : 2190-2219.
- Janek D., Zipperer A., Kulik A., Krismer B. & Peschel A., 2016. High Frequency and Diversity of Antimicrobial Activities Produced by Nasal Staphylococcus Strains against Bacterial Competitors. *PLoS Pathology*, 12(8).
- Jannel-Oudot M. & Misler L., 1997. Cacao et santé: quels sont les effets de la consommation du cacao sur la santé. *Mémoire Nutrition: Nancy*, 1: 7-48
- Kadow D., Niemenak N., Rohn S. & Lieberei R., 2015. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.). Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT- Food Science. Technology*, 62: 357-361.
- Kebe I.B., N'Guessan F.K., Tahiri G.M., Assiri A.A., Koko L.K., Kohi N.J., Irié B.Z. & Koffi N., 2009. Bien cultiver le cacaoyer en Côte d'Ivoire. *CNRA/CTA, Abidjan, Côte d'Ivoire*, 4p.
- Kirchhoff P.M., Biehl B. & Crone G., 1989. Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chemistry*, 31: 295-311.

- Knapp A. W., 1937. Cacao fermentation: a critical survey of its scientific aspects. *Cacao fermentation: a critical survey of its scientific aspects*. P 149
- Knight I., 1999. *Chocolate and cocoa: health and nutrition* (No. 663.92/K71). (Ed.).Oxford: Blackwell Science.
- Koko L., 2014. Teractiv cacao as a new fertilizer based reactive phosphate rock for cocoa productivity in Côte d'Ivoire: A participatory approach to update fertilization recommendation. *Procedia Engineering* 83: 348-353.
- Kongor J.E., Hinneh M., Van deWalle D., Afoakwa E.O, Boeckx P. & Dewettinck K., 2016. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile A review. *Food Research International*, 82: 44–52.
- Kongor J.E., Takrama J.F., Budu A.S., Mensah-Brown H. & Afoakwa E.O., 2013. Effects of fermentation and drying on the fermentation index and cut test of pulp pre-conditioned Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of Food Science and Engineering*, 3(11): 625.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. & Abdelly C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology Biochemical*, 45: 244-249.
- Lachenaud Ph., Paulin D., Ducamp M. & Thevenin J-M., 2007. Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Scientia Horticulturae*, 113 (4): 313-321.
- Lamberts L., Joye I.J., Beliën T. & Delcour J.A., 2012. Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making. *Food Chemistry*, 130(4): 896-901.
- Lanaud C, Ham P & Duperray C., 1992. Estimation of nuclear DNA content of *Theobroma cacao* L. by flow cytometry. *Café, Cacao, Thé*, 36: 3-8.
- Lea P. J. & Forde B. G., 1994. The use of mutants and transgenic plants to study amino acids metabolism. *Plant Cell Environment*; 17: 541-556.
- Lefeber T., Janssens M., Camu N. & De Vuyst L., 2010. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 7708–7716.
- Lieberei R. & Rohsius C., 2003. Cocoa Atlas 2002 (deutsch: Cacao Atlas 2002). Stiftung der deutschen Kakao- und Schokoladen-Wirtschaft (ed) 1st. edn. *dresenfunke pr/kommunikation production GmbH*, Leverkusen CD-Rom 3-9808866-0-3.
- Lieberei R., Kadow D. & Zeigler D., 2013. Cocoa cultivation, directed breeding and polyphenolics. *Natural products*. Springer, Berlin, 1599-1616.

- Lima L.J.R., Almeida M.H., Rob Nout M.J. & Zwietering M.H., 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.
- Loor R.G., Risterucci A.M., Courtois B., Fouet O., Jeanneau M., Rosenquist E., Amores F., Vasco A., Medina M. & Lanaud C., 2007. Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador (submitted to *Tree Genetics & Genomes*).
- Lopez A., Lehrian D.W. & Lehrian L.V., 1978. Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of *Theobroma cacao* L. *Revista Theobroma (Brazil)* 8(3): 105-112.
- Macheix J. J., Fleuriet A., & Sarni-Manchado P. , 2006. Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. *Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris*, 390-399.
- Maillard L.C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendu Academie Sciences (Paris)*, 154: 66-68.
- McFadden C.& France C. Le grand livre du chocolat Genève: Minerva, 1999.- 253p.
- Mifflin B.J. & Lea P.J., 1982. Ammonium assimilation and amino acid metabolism *In*: Boulter D., Parthier D. Eds. *Encyclopedia of plant physiology*, Vol. 14A, Springer Verlag, Berlin: 5-64.
- Misnawi S., 2008. Physico-chemical changes during cocoa fermentation and key enzymes involved. *Review Penelitian Kopi dan Kakao*, 24(1): 54–71.
- Misnawi, Jinap S., Jamilah B. & nazamid S., 2005. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:917–924.
- Misnawi, Jinap S., Jamilah B., & Nazamid S., 2003. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(3): 285-295.
- Moens F., Lefeber T. & De Vuyst L., 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, 80: 1848–1857.
- Moreira I.M.da.V., Miguel M.G.D.C.P., Duarte W.F., Dias D.R. & Schwan R.F., 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.
- Morot-Gaudry J. F., Job D. & Lea P. J., 2001. Amino acid metabolism. *In*, *In Plant nitrogen*, pp. 167-211.

- Morris D. 1882. *Cacao: how to grow and how to cure it*. Government Printing Establishment.
- Mossu G., 1990. *Le cacaoyer*. Maisonneuve et Larose.
- Mossu G., Paulin D. & De R.P., 1981. Influence de la floraison et de la pollinisation sur les rendements du cacaoyer. Liaisons mathématiques entre les données expérimentales. Equation du rendement. *Café, Cacao, Thé*, 25: 155-168.
- Motamayor J.C, Risterucci A.M, Heath M. & Lanaud C., 2003. Cacao domestication II: progenitor germplasm of Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91: 322-330.
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5): 380-386.
- Motamayor J.C., Lachenaud P., e Mota J.W.D.S., Loor R., Kuhn D.N., Brown J.S., & Schnell R.J., 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PloS one*, 3(10).
- Mpika J., Kebe I.B. & N'Guessan K. F., 2011. Isolation and identification of indigenous microorganisms of cocoa farms in Côte d'Ivoire and assessment of their antagonistic effects vis-à-vis *Phytophthora palmivora*, the causal agent of black pod disease. In: O. Grillo (Ed.), *Biodiversity Loss in a Changing Planet*, INTECH, 303– 319.
- Muller E., Jacquot E. & Yot, P. 2001. Early detection of cacao swollen shoot virus using the polymerase chain reaction. *Journal Virology Methods* 93 (1-2): 15-22.
- Niemenak N., Rohsius C., Elwers S., Omokolo N. D. & Lieberei R., 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (6-7): 612-619.
- Nijveldt R.J., Nood E., Hoorn D. E., Boelens P. G., Norren K. & Leeuwen P., 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418–425.
- Nyasse S., Efombagn M. I. B., Kebe B. I., Tahi M., Despreaux D. & Cilas C., 2007. Integrated management of *Phytophthora* diseases on cocoa (*Theobroma cacao* L): Impact of plant breeding on pod rot incidence. *Crop Protection*, 26: 40-45.
- Opoku I.Y., Appiah A.A., Akrofi A.Y. & Owusu G. K., 2000. *Phytophthora megakarya*: A potential threat to the cocoa industry in Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science*, 33: 237-248.
- Oro Z. F., 2011. Analyse des dynamiques spatiales et épidémiologie moléculaire de la maladie du swollen shoot du cacaoyer au Togo. Thèse de doctorat. Université de Montpellier SupAgro, France. 262 p.
- Paris R.R., Moyse H., 1981. Précis de matière médicale. 2e ed Paris: Masson, tome 2.- 518p.

- Paulin D, Decazy B & Coulibaly N., 1983. Etude des variations saisonnières des conditions de pollinisation et de fructification dans une cacaoyère. *Café, Cacao, Thé*, 27: 165-176.
- Paulin D. & Eskes A.B., 1995. Le cacaoyer: stratégie de sélection. Plantations, recherche, développement 2 : 5-13.
- Paulin D., 1994. Les méthodes statistiques des essais de sélection, stratégies d'amélioration des plantes pérennes. In: *Biométrie et génétique quantitative*. CIRAD, Montpellier (France). pp. 243-257.
- Perrier-Robert A., 2002. Le chocolat: les carnets gourmands Paris: *Du Chêne*, 126p
- Piel J., 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22) : 14002-14007.
- Pontillon J., 1998. Cacao et chocolat: production, utilisation, caractéristiques Paris: Lavoisier *Tec et Doc*, 656p.
- Posnette A. F., 1950. The pollination of cacao in the gold coast. *Journal of Horticultural Science* 25: 155-163.
- Pound F.J., 1938. Cacao and Witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. Yuille's Printerie, Port of Spain, Trinidad and Tobago, 9-49. (Reprinted 1982), *Archives of Cocoa Research*, 1: 21-64.
- Pound F.J., 1945. A note about the cacao populations of South America. Report and Proceedings Cocoa Research Conference, London. *Colonial* 192: 95-7. (Reprinted 1982), *Archives of Cocoa Research*, 1: 93-97.
- Puziah H. S., Jinap K.S.M., Sharifah & Asbi A., 1998. Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78: 543-550.
- Quesnel V.C., 1968. Fractionation and properties of the polymeric of the polymeric leucocyanidin of the seeds of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry*, 7: 1583-1592.
- Raven H., Evert R. F. & Eichhorn S. E., 2000. *Biologie végétale*. 6e édition. Traduit par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrard. De Boeck Université - Paris, 944p.
- Raven P., Evert R. & Eichhorn S., 1986. *Biology of Plants*, Sixth Edition, W.H. Freeman and Company/Worth Publishers,
- Reineccius G. A., Andersen D. A., Kavanagh T. E., & Keeney P. G., 1972. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2): 199-202.

- Roche G., Cuello J., Hiciano V., Cardenas F., Mendez L.A. & Dominguez P., 1987. Amélioration de la qualité du cacao en République Dominicaine. In : Proceedings 10^e Conférence internationale sur la recherche cacaoyère. Cocoa Producers Alliance, Lagos, Nigeria pp 801-805.
- Roelofsen P. A., 1958. Fermentation, drying and storage of cocoa beans. *Advances in Food Research*, 8: 225-296.
- Rohan T. A., & Stewart T., 1967. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. *Journal of Food Science*, 32(4): 399-402.
- Rohsius C., 2007. Die Heterogenität der biologischen Ressource Rohkakao (*Theobroma cacao* L.) PhD thesis, University of Hamburg, Germany, 241p.
- Rohsius C., Matissek R. & Lieberei R., 2006. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *European Food Research and Technology*, 222: 432-438.
- Romanens E., Näf R., Lobmaier T., Pedan V., Leischtfeld S.F., Meile L. & Schwenninger S.M., 2018. A lab-scale model system for cocoa bean fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 3349-3362.
- Royaert S., Phillips-Mora W., Leal A. M. A., Cariaga K., Brown J. S., Kuhn D. N., Schnell R. J. & Motamayor J. C., 2011. Identification of marker-trait associations for selfcompatibility in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L.. *Tree Genetics and Genomes*, 7 (6): 1159-1168.
- Ruf F., 1995. Booms et crises du cacao. Les vertiges de l'or brun. CIRAD-SAR, KARTHALA, 450 p.
- 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: 167-187.
- Samuels G.J., Ismaiel A., Rosmana A., Junaid M., Guest D., McMahon P. & Keane P., 2012. Vascular Streak Dieback of cacao in Southeast Asia and Melanesia: In planta detection of the pathogen and a new taxonomy. *Fungal Biology*, 116 (1): 11-23.
- Santos R.C., Pires J.L. & Correa R.X., 2012. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genetic Resources Crop Evolution*, 59 (3): 327-345.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. & Jimenez L., 2005. Dietary poly phenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287-306.
- Schwan R. & Wheals A., 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critic. Review Food Science. Nutrition*, 44: 205-221.

- Schwan R.F., Rose A.H. & Board R.G., 1995. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 96S–107S.
- Shamsuddin S.B. & Dimick P.S., 1986. Qualitative and quantitative measurements of cocoa bean fermentation. In P.S. Dimick ed, proceedings of cocoa biotechnology. Department of food science, Penn state university, university park, PA pp: 55-78.
- Shelp B.J., Bown A.W. & McLean M.D., 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science*, 4(11): 446-452.
- Shimajiri Y., Oonishi T., Ozaki K., Kainou K., & Akama K., 2013. Genetic manipulation of the γ -aminobutyric acid (GABA) shunt in rice: overexpression of truncated glutamate decarboxylase (GAD 2) and knockdown of γ -aminobutyric acid transaminase (GABA-T) lead to sustained and high levels of GABA accumulation in rice kernels. *Plant biotechnology journal*, 11(5): 594-604.
- Silva C.S. & Figueira A., 2005. Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 250 (1-2): 93-104.
- Sonwa D. J., Weise S. F., Tchataat M., Nkongmeneck. B. A., Adesina A. A. Ndoye O., & Gockowski J., 2000. Les Agroforêts cacao: Espaces intégrant développement de la culture du cacao, gestion et conservation des ressources forestières au Sud Cameroun. UICN, 13 p.
- Stalikas C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *Journal of Separation Science*, 30: 3268–3295.
- Stewart G.R. & Lahrer F., 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In : Stumpf P.K. et Conn E.E., eds. The biochemistry of plants. New York, Academic Press, 4: 609-635.
- Stoll L., Niemenak N., Bisping B. & Lieberei R., 2017. German cacao of Cameroon – new facts on a traditional variety fallen into oblivion. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 90: 274–279.
- Swanson J.-D., Carlson J.E. & Gultinan M.J., 2008. Comparative flower development in *Theobroma cacao* based on temporal morphological indicators. *International Journal of Plant Sciences*, 169 (9): 1187-1199.
- Takayama M. & Ezur, H., 2015. How and why does tomato accumulate a large amount of GABA in the fruit?. *Frontiers in plant science*, 6: 612.
- Tchouatcheu G. A. N., Noah A. M., Lieberei R. & Niemenak N., 2019. Effect of cacao bean quality grade on cacao quality evaluation by cut test and correlations with free amino acids and polyphenols profiles. *Journal of Food Science and Technology*, 56 (5):2621-2627.

- Thevenin J-M., Rossi V., Ducamp M., Doare F., Condina V. & Lachenaud P., 2012. Numerous clones resistant to *Phytophthora palmivora* in the "Guiana" genetic group of *Theobroma cacao* L.. *Plos One*, 7 (7).
- Thompson S. S., Miller K. B., Lopez A. S. & Camu N., 2013. Cocoa and coffee. In *Food microbiology*, pp. 881-899.
- Tixier C., 2013. "De l'arbre à cacao au chocolat : voyage à la source des arômes et des saveurs." *Phytothérapie*, 11: 79-84.
- Töppner K., Hansen D. & Herbig E., 2013. Eau ultrapure pour analyses HPLC-SEC.
- Torres M.R. & Momsen H.J., 2011. Tourism and agriculture: New geographies of consumption, production and rural restructuring. *Routledge Publishers*, New York, NY 10016.
- Totlani V.M. & Peterson D.G., 2005. Reactivity of epicatechin in aqueous glycine and glucose Maillard reaction models: quenching of C₂, C₃, and C₄ sugar fragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4130-4135.
- Touitou, P. Y., 2005. Biochimie: structure des glucides et lipides. Université de Pierre et Marie Curie. *Faculté de médecine*. 1-48 p.
- Vera B.J., 1987. Antecedentes históricos. Manual del cultivo de cacao. INIAP, EETPichilingue. Quevedo, Ecuador, pp 6-9.
- Vinogradova I.S. & Falaleev O.V., 2012. Formation of the vascular system of developing bean (*Phaseolus limensis* L.) seeds according to nuclear magnetic resonance microtomography. *Russian Journal of Developmental Biology*, 43 (1): 25-34.
- Voigt J., Biehl B. & Wazir S. K. S., 1993. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry*. 47: 145-151.
- Voigt J., Heinrichs H., Wrann D. & Biehl B., 1994. *In vitro* studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: the significance of endoprotease specificity. *Food Chemistry*, 51: 7-14.
- Wessel M. & Quist-Wessel P.M.F., 2015. Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 74: 1-7.
- Whitlock B.A., Bayer C. & Baum D.A., 2001. Phylogenetic relationships and floral evolution of the *Byttnerioideae* ("*Sterculiaceae*" or *Malvaceae* s.l.) based on sequences of the chloroplast gene, *ndhF*. *Systematic Botany*, 26 (2): 420-437.
- Wielgoss A., Clough Y., Fiala B., Rumedé A. & Tschardtke, T., 2012. A minor pest reduces yield losses by a major pest: Plant-mediated herbivore interactions in Indonesian cacao. *Journal of Applied Ecology*, 49 (2): 465-473.

- Wollgast J. & Anklam E., 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33: 423-447.
- Wood G.A.R. & Lass R.A., 2001. *Cacao*. Blackwell: Oxford, United Kingdom, 4th edition p.620.
- Wu G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Literature Review*, 37(1):1-17.
- Yao L.H., Jiang Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R. & Chen S.S. 2004. Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59 : 113-122.
- Young A.M. 1985. Research on the natural pollination of cocoa in Central America: overview of current directions. *In: Proc. 9 Int. cocoa Res. Conf. Lome, Togo*. Stephen Austin 1 Sons Ltd.
- Yvon M., Berthelot S. & Gripon J. C, 1998. Adding a-Ketoglutarate to Semi-hard Cheese Curd Highly Enhances the Conversion of Amino acids to Aroma Compounds, *International Dairy Journal*, 8: 889-898.
- Zhang D. & Raichle M. E., 2010. Disease and the brain's dark energy. *Nature Reviews Neurology*, 6(1) : 15.

ANNEXES

Annexe 1. Volume des acides aminés libres en mg/g ffdm et valeurs moyennes des acides aminés des fèves non incubées séchées des différents géotypes

Treatment 0 (unfermented and dried)														
Clones/ Ami	SNK10	SNK15	SNK16	SNK377	SNK450	SNK48	SNK620	SNK624	SNK64	T60/887	TIKO31	TIKO32	IMC67	Mean
Acidic	5334.57	5542.18	7920.82	5988.62	11140.69	8342.65	8414.97	5966.44	6123.18	5852.42	9209.62	6142.46	7171.03	7165.36
Asp	445.98	591.99	576.62	184.34	567.76	398.93	296.93	346.05	497.81	286.54	564.10	263.36	370.97	414.72
Glu	2868.77	3503.27	3310.02	2180.41	4264.61	4726.40	4191.16	3386.85	3579.78	2575.23	2967.28	3272.04	4181.45	3462.10
Asn	1344.29	1446.92	3353.34	2337.79	6308.32	2544.72	3059.58	1567.66	1760.30	2283.54	4883.31	2009.07	1982.98	2683.22
His	675.53		680.83	1286.07		672.61	867.31	665.88	285.28	707.11	794.93	597.99	635.63	715.38
Hydrophobi	2668.66	2904.29	3661.34	6103.05	4990.38	3600.09	3914.52	3180.31	3435.50	3805.59	3302.42	3170.49	3301.96	3695.28
Leu	228.84	274.96	365.72	673.84	471.25	329.84	285.60	305.72	434.03	354.49	257.36	291.55	429.86	361.77
Ala	694.45	810.95	928.96	1554.19	2410.82	970.23	1454.59	652.45	760.86	1085.43	962.80	1233.47	612.59	1087.06
Phe	445.93	389.67	612.18	1075.99	331.78	646.52	760.79	510.03	416.45	578.16	459.62	436.46	493.31	550.53
Tyr	680.68	631.86	917.18	1371.81	562.07	837.25	589.93	702.43	554.00	838.31	1043.27	641.31	556.14	763.56
Val	252.74	402.18	457.98	722.93	637.27	406.78	424.29	531.20	659.23	496.89	291.52	285.89	636.20	477.31
Ile	366.03	394.67	379.32	704.28	577.19	409.47	399.33	478.48	610.94	452.31	287.85	281.82	573.86	455.04
Other	1586.27	431.39	887.96	3142.45	1676.72	1155.43	732.96	1357.29	861.39	1072.76	1956.13	727.97	637.48	1248.17
Trp	713.77			1064.40							668.60			815.59
Lys				407.42	334.56	260.82		171.41	125.57	321.60	330.65			278.86
Ser	116.86		224.62	258.89	270.87	205.39	205.58	215.18	224.53	204.98	216.82	188.06	188.31	210.01
Gly	294.60	206.05	242.78	282.86	339.78	250.72	207.24	381.83	235.92	261.07	221.40	241.14	205.96	259.33
Arg	461.04	225.34	420.56	816.53	480.23	351.69	320.13	460.78	275.38	285.11	518.66	298.78	243.22	396.73
Thr				312.35	251.28	86.82		128.08						194.63
Total faa m	13844.44	12213.54	17019.41	24479.62	24474.89	17853.70	17709.94	15041.63	14716.96	15609.13	19726.72	13939.37	15049.90	17052.25
SD	839.37	1062.95	1216.93	1432.32	1938.64	1317.62	1372.43	980.22	1080.24	1030.25	1342.23	1047.10	1199.75	1220.00

Annexe 2. Volume des acides aminés libres en mg/g ffdm et valeurs moyennes des acides aminés des fèves incubées dans le traitement « acide acétique » des différents génotypes

Table. 2 Relative amounts of free amino acids in mg/g ffdm and mean values of free amino acid in fermentation like-incubation cocoa beans of different clones														
Treatment 1 (Acetic acid)														
Clones/ Ami	SNK10	SNK15	SNK16	SNK377	SNK450	SNK48	SNK620	SNK624	SNK64	T60/887	TIKO31	TIKO32	IMC67	Mean
Acidic	1904.11	4071.72	3403.01	4195.75	4235.44	5767.84	3775.08	4613.13	6019.12	5704.20	6777.98	5557.76	5890.62	4762.75
Asp	195.35	355.36	313.21	383.98	435.26	514.31	342.56	364.00	506.61	523.14	542.67	463.03	518.44	419.84
Glu	1099.27	1626.56	1312.07	1582.33	1754.28	2257.47	1998.01	1794.55	1892.06	2040.20	2216.65	1918.81	2161.73	1819.54
Asn	609.49	1250.37	922.07	1316.20	1289.47	2142.19	1434.51	1634.31	2462.76	1756.74	2392.97	1971.51	1801.72	1614.18
Gln		839.43	547.75	913.24	756.43	853.87		820.27	1157.68	1384.12	1393.93	1204.41	1408.72	1025.44
His			307.92								231.761778			269.84
Hydrophobi	4404.80	8693.95	7034.21	9514.79	8343.30	11431.54	5745.13	9581.50	13527.80	13739.66	14535.62	12502.40	13809.25	10220.30
Leu	1407.84	2776.32	2136.07	2949.54	2478.82	3556.00	1569.30	2764.04	4175.02	4372.14	4556.07	4032.40	4330.62	3161.86
Ala	567.21	963.99	636.46	965.60	1030.00	1339.28	629.01	954.00	1514.42	1551.77	1833.72	1565.45	1293.03	1141.84
Phe	871.61	1999.06	1698.49	2329.63	1906.15	2671.03	1329.87	2232.63	3382.85	3286.31	3468.48	2956.96	3416.05	2426.86
Tyr	679.98	1393.67	1189.57	1616.80	1290.82	1712.12	1008.45	1577.43	2008.29	2036.49	2059.34	1798.16	2137.76	1577.61
Val	539.30	939.30	801.61	990.03	968.67	1273.15	714.54	1204.51	1440.00	1472.85	1570.11	1280.72	1547.26	1134.00
Ile	338.86	621.61	572.01	663.20	668.84	879.95	493.96	848.89	1007.23	1020.10	1047.88	868.71	1084.51	778.13
Other	5002.48	7882.95	5379.57	8763.72	6721.66	8961.83	4354.33	10695.90	10698.54	12123.57	10780.51	9859.56	11958.59	8706.40
Trp	580.53	819.35	1119.55	1464.82	1261.89	1448.90	1164.84	1947.19	1617.44	1748.75	1586.57	1483.39	1949.00	1399.40
Lys	1597.28	1401.39	1457.82	2581.58	1887.95	2609.32	986.39	3047.99	3181.56	3924.18	3614.99	3037.35	3562.77	2530.04
Ser	390.44	473.17	332.33	472.70	461.10	555.78	271.32	717.02	709.99	898.68	437.21	744.27	800.35	558.80
Gly	305.21	1369.89	248.28	318.92	272.85	395.03	223.50	457.89	398.49	432.70	461.25	420.86	404.07	439.15
Arg	1774.16	2744.60	1701.76	3190.80	2282.49	2841.67	1252.48	3641.78	3727.29	4167.76	3635.69	3236.07	4274.50	2959.31
Thr	354.86	858.88	307.56	479.22	413.82	601.19	290.41	706.84	660.25	733.30	745.56	659.70	726.51	579.85
Met		215.66	212.26	255.69	141.56	509.93	165.39	177.19	403.54	218.20	299.24	277.92	241.41	259.83
Total faa m	11311.39	20648.61	15816.79	22474.26	19300.40	26161.20	13874.54	26997.71	30245.46	31567.44	32531.32	27919.72	31658.45	23885.18
SD	494.77	744.02	593.61	942.44	721.34	980.71	557.85	1001.46	1214.83	1320.71	1317.64	1106.92	1313.52	925.41

Annexe 3. Volume des acides aminés libres en mg/g ffdm et valeurs moyennes des acides aminés des fèves incubées dans le traitement « acide lactique + acide acétique » des différents génotypes

Table. 3 Relative amounts of free amino acids in mg/g ffdm and mean values of free amino acid in fermentation like-incubation cocoa beans of different clones														
Treatment 3 (Lactic acid, Acetic acid)														
Clones/ Ami	SNK10	SNK15	SNK16	SNK377	SNK450	SNK48	SNK620	SNK624	SNK64	T60/887	TIKO31	TIKO32	IMC67	Mean
Acidic	3853.35	2151.06	2239.00	2549.06	3929.74	4667.20	3345.47	2646.45	3510.57	3762.40	4147.14	5693.90	2964.79	3496.93
Asp	398.94	180.69	158.68	227.90	315.02	413.57	282.69	122.84	245.49	303.53	302.19	304.25	221.80	267.51
Glu	1578.96	1323.69	1384.86	1438.74	1610.10	1957.25	1920.97	1846.70	1696.19	1396.01	2013.50	2655.85	1454.59	1713.65
Asn	1081.51	646.67	695.47	882.42	1325.20	1614.21	1141.81	676.91	1327.07	1270.19	1254.84	2168.24	1288.40	1182.53
Gln	793.94				679.42	682.17			241.82	792.67	576.60	565.56		618.88
Hydrophobi	8535.57	4232.37	3201.84	5302.26	7319.69	9054.58	5508.10	2861.18	5984.06	7796.12	6648.55	6602.89	5655.00	6054.02
Leu	2652.83	1252.10	849.81	1510.43	2175.06	2772.81	1462.25	547.23	1750.37	2345.33	1980.59	1835.26	1655.99	1753.08
Ala	802.28	627.33	438.95	780.33	984.36	1108.42	623.09	524.29	1016.77	933.71	1044.00	1224.10	859.52	843.63
Phe	2085.71	853.22	583.96	1143.89	1692.60	2098.20	1291.90	482.97	1180.94	1854.04	1335.18	1287.80	1176.20	1312.82
Tyr	1477.93	683.02	616.21	844.44	1151.17	1427.23	957.19	578.46	837.45	1264.09	1002.39	1024.99	805.28	974.60
Val	907.68	502.91	396.10	634.10	781.16	953.37	688.85	384.11	716.39	853.32	787.10	759.78	717.52	698.65
Ile	609.14	313.79	316.80	389.06	535.34	694.55	484.82	344.11	482.13	545.64	499.29	470.96	440.49	471.24
Other	7838.46	2164.91	1210.59	3610.63	5932.07	7037.60	4081.03	4470.56	3597.51	6885.52	4972.02	3951.33	3207.57	4535.37
Trp	673.11			802.46	1094.79	1224.00	1216.46	1223.27	787.10	1033.29	828.60	824.75	345.06	913.90
Lys	2582.65	821.38	453.88	976.40	1680.70	1992.05	896.07	1188.31	983.43	2185.00	1643.27	1098.34	1079.55	1352.39
Ser	547.53	89.57	81.25	208.09	338.77	405.19	262.09	169.60	259.73	444.85	392.48	338.79	275.77	293.36
Gly	370.14	179.35	159.72	224.04	296.26	342.93	250.62	314.00	242.59	325.78	301.61	269.09	213.29	268.42
Arg	2987.39	890.43	515.74	1160.22	2027.55	2239.75	1172.35	1398.31	1057.53	2433.46	1474.46	1136.23	1069.11	1504.81
Thr	420.85	184.17		239.42	355.34	459.76	283.44	177.08	267.14	395.97	331.60	284.13	224.79	301.97
Met	256.80				138.66	373.92				67.16				209.14
Total faa m	36601.42	8548.34	6651.43	11461.94	17181.51	36851.54	22523.73	17309.94	22673.70	33125.68	27388.28	26802.33	20689.94	22139.21
SD	884.69	427.46	344.05	439.30	652.57	774.05	496.87	512.46	508.99	758.31	583.02	706.51	487.02	531.85

Annexe 4. Protocole de delipidation

La délipidation de la poudre de cacao est faite selon la méthode décrite par Hansen *et al.* (1998) et modifiée par Niemenak *et al.* (2014).

4g de poudre de cacao sont pesés puis mélangés à 40 mL d'hexane ; le mélange est homogénéisé dans un mortier à l'aide d'un pilon puis filtré sous vide. La poudre restant sur le papier filtre correspond à la poudre de cacao délipidée. L'étape suivante consiste à laisser sécher cette poudre à température ambiante pendant 2 à 3 heures ; la poudre sèche est introduite dans des boites noires puis conservée à 20°C.

LISTE DE PUBLICATION ISSUE DE LA THESE

Effect of cacao bean quality grade on cacao quality evaluation by cut test and correlations with free amino acids and polyphenols profiles

Germaine Audrey Ngouambe Tchouatcheu, Alexandre Mboene Noah, Reinhard Lieberei & Nicolas Niemenak

Journal of Food Science and Technology

ISSN 0022-1155

J Food Sci Technol
DOI 10.1007/s13197-019-03749-y



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Association of Food Scientists & Technologists (India). This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Effect of cacao bean quality grade on cacao quality evaluation by cut test and correlations with free amino acids and polyphenols profiles

Germaine Audrey Nguouambe Tchouatcheu¹ · Alexandre Mboene Noah² · Reinhard Lieberei³ · Nicolas Niemenak¹

Revised: 18 March 2019 / Accepted: 26 March 2019
© Association of Food Scientists & Technologists (India) 2019

Abstract Cacao fermentation induces biochemical changes in the beans that lead to different cacao grades such as slaty (unfermented), violet (under fermented) and brown (fully fermented) beans. This grade heterogeneity in a sample set can impact the quality of the end-products. In the present study, amino acids and polyphenol contents of slaty, violet and brown beans were evaluated. Free amino acids were derivatized from *o*-phthalaldehyde and detected with a fluorescence spectrophotometer coupled with a reverse phase HPLC system. Polyphenols were analysed at 280 nm by HPLC using a Photodiode Array Detector. Amino acids content in the violet beans were significantly higher ($11,165 \pm 4281 \text{ mg kg}^{-1}$ fat free dry material, ffdm) than that of the slaty beans ($4304.5 \pm 1927.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ffdm), meanwhile there was no significant difference between violet and brown beans. Epicatechin, catechin, cyanidin-3-arabinoside and cyanidin-3-galactoside contents were significantly lower in violet and brown beans when compared to slaty beans. Our results have shown that a mixture of violet and brown

beans is suitable to obtain polyphenols and amino acids in the development of cacao products.

Keywords Cacao quality · Cut-test · Fermentation processes · Free amino acids · Polyphenols

Introduction

The quality of raw cacao beans depends essentially on the degree of fermentation due to the generation of aroma precursors during the process. Besides fermentation, other factors such as climatic conditions, soil type and maturity at harvest, as well as genotype, drying and roasting conditions are important. The quality assessment of dried seeds is closely related to their cotyledon appearance. Cotyledon color is modified in the course of acidification of seeds during fermentation which provides the conditions for biochemical changes, inducing activation of a set of specific enzymes. At the early fermentation stage (anaerobic stage), yeast activities on the cacao pulp produce ethanol which is subsequently oxidised by bacteria to lactic acid and acetic acid in the aerobic stage (De Roos and De Vuyst 2018; Romanens et al. 2018). The oxidation process generates heat that causes seeds death and concomitantly the acetic acid penetrates slowly into the cotyledons. Low pH (< 5) jeopardizes cotyledon cell integrity and allows several enzymes to interact with their substrates (da Veiga Moreira et al. 2013). Thus, storage proteins are hydrolysed by aspartic proteinase and carboxypeptidase (Voigt et al. 1994; Biehl et al. 1993) and generate free amino acids and peptides while invertase cleaves sucrose into fructose and glucose (Lopez et al. 1978). Under aerobic conditions and high pH values, polyphenoloxidase catalyses the oxidation of various phenolic metabolites to quinones. The quinones

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03749-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nicolas Niemenak
niemenak@yahoo.com

¹ Department of Biological Science, Higher Teacher Training College, University of Yaounde I, P.O. Box 47, Yaounde, Cameroon

² Faculty of Science, Department of Biochemistry, University of Douala, P.O. Box 24157, Douala, Cameroon

³ Department of Biology, Biocenter Klein Flottbek and Botanical Garden, University of Hamburg, Ohnhorststrasse 18, 22609 Hamburg, Germany

react with each other as well as with other electron donors in the altered tissue, to form brown insoluble polymers. At the same time, anthocyanins are hydrolysed by β -glycosidases to produce anthocyanidins, galactose and arabinose. Furthermore, dimerisation of leucocyanidins and exudation of flavonoids from the seeds occurs. Subsequently, during drying, the amount of polyphenols is substantially reduced by enzymatic browning (Wollgast and Anklam 2000). While enzymatic oxidation removes the astringent and bitter taste of fresh seeds, brown color is one of the indicators of well fermented dried cacao.

Depending on the duration of fermentation, the homogeneity of seeds size and the position in the heap/box, the frequency of mixing and the temperature, the biochemical state of the cacao seeds vary. This variability can be characterized visually by using the cut test, which enables the distinction between well fermented seeds displaying brown color; under-fermented seeds appear violet to violet–brown and non-fermented seeds are slaty. These three groups are often found in traded cacao (Lieberei and Rohsius 2003).

Cacao manufacturers blend beans from various origins that have been processed differently with the aim of having uniform and constant raw materials to produce chocolate. The processing parameters to produce chocolate are then adjusted on the expected characteristic of the blend of beans, quite often only based on simple indicators such as the origins of the cacao (Saltini et al. 2013). Several studies dealing with the biochemical changes occurring during fermentation, drying and roasting of cacao from different origins and genotypes have been conducted in cacao bulk as a whole not accounting for the composition of the lot (Lieberei et al. 2013; Niemenak et al. 2006; Rohsius et al. 2006; Kirchhoff et al. 1989). Moreover, many studies focus on how some specific cacao farming practices or different conditions influence specific parameters of the cacao beans. However, such information rarely reaches the chocolate manufacturers. One of the challenges arising from the existence of different amounts of fermented beans within a lot is how this can affect the chocolate end-product. It is therefore important to obtain information on the composition of slaty, violet and brown beans found in traded cacao for the purpose of adjusting the flavour and colour. In this study, we collected raw cacao samples from different farmers, and evaluated their physical quality via cut test score. Phenolic compounds and amino acids contents of each slaty, violet and brown bean were characterized in order to measure the impact, in terms of biochemical determinants and distribution in a cacao sample set. Correlation between the physical and biochemical attributes of cacao quality was established. Such biochemical variables could help chocolate manufacturers optimize their processes based on the characteristics of the raw materials.

Materials and methods

The materials used consisted of fermented and dried cacao beans. Samples were collected during the 2009–2010 cacao campaign in the South (latitude 2°55'; longitude 11°07'), Center (latitude 4°34'; longitude 11°28') and Littoral (latitude 9°33'; longitude 4°29') regions of Cameroon. From each region, 30 samples were collected from 30 different farmers. Samples of about 1–2 kg per farmer were collected from each site, sealed in plastic bags and transported to Germany. One hundred seeds per sample were cut lengthwise with a cacao Guillotine (Type MAGRA, Swiss company TESERBA). The appearance of the beans was evaluated according to the category i.e. slaty, violet, brown and white beans (data not shown). Beans of different colors from each region were combined and the shells and radicles were removed. Fifty grams were coarsely crushed with a blender and the particles were stored at -20°C . Sampling was done in triplicates for each region.

Free amino acids and phenolic compounds analysis

Free amino acid contents were analyzed according to Rohsius et al. (2006). Two grams of crushed cotyledon from each class of beans (slaty, violet and brown) were milled with 10 ml hexane. Fat was removed by spraying the powder with 100 ml petrol ether of 40–60° using a funnel vacuum. The powder was dried under vacuum at room temperature for 30 min. and stored at -20°C for further analysis (for more details, see Supplementary 1). The determination of catechin, epicatechin, cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside were performed according to Stoll et al. (2017) (for more details, see Supplementary 2).

Statistical analysis

All data were analyzed using R-studio version 0.96.122. Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA) and results presented as Box-plot. The least significant difference (LSD) was used to separate and compare the means and significance was accepted at 5% level ($P < 0.05$). R-studio was also used for principal component analysis (PCA).

Results and discussion

Cacao quality assessment is generally quickly determined via cut test score. From the results, the samples were classified into three principally distinguishable grades; slaty, violet and brown, and their transitional stages

(Fig. S3). The slaty corresponds to unfermented, the violet to under-fermented and the brown to well fermented beans. This classification excluded premium cacao from the Criollo group which lack anthocyanin and their seeds are white (Rohsius 2007; Lieberei and Rohsius 2003). Brown beans are generally recognized as high quality because of the reduction in bitterness, astringency and acidity and the formation of aroma precursors during fermentation and drying. However, depending on the use, slaty or violet beans may be desired according to their biochemical features.

The protein amino acids were presented according to the classification of Kirchhoff (1993), which encompassed hydrophobic amino acid (Ala, Leu, Phe, Tyr, Val, Ile), acidic amino acid (Asn, Asp, Glu, Gln, His) and others (Tryp, Lys, Ser, Gly, Arg, Threo). In addition to the protein amino acids, the levels of the non-protein amino acid; γ -aminobutyric acid (GABA), were recorded. The individual and total free amino acid (Table 1) levels increased from slaty to brown and white beans ($P < 0.05$). There was no significant difference in the amount of individual free amino acids between slaty and slaty-violet beans, and

between violet and brown beans. However, the content of free amino acid was higher in violet, brown and white beans than in their slaty counterparts. Total hydrophobic amino acids content ranged from 2242 mg kg⁻¹ to 7812.17 mg kg⁻¹ and was significantly lower in slaty beans than in the other classes of beans. In the violet, brown and white beans, Leu and Phe were the dominant amino acids of the hydrophobic group accounting for 50%. Total acidic amino acid content was in the range of 1616.94 to 4259.69 mg kg⁻¹. Glu and Asn were the dominant amino acids in this group, representing more than 60%. There was a significant difference on the acidic amino acid concentration values of slaty, brown and violet beans when compared, which increased by 50%. When the violet, brown and white beans were compared, there was no significant difference in the acidic amino acid concentration. The other amino acids were observed to be 2- to 2.5-fold higher in violet and brown beans than in the slaty beans. Chocolate flavour precursors, for instance, have been shown to be composed of small peptides, free amino acids and reducing sugars (Kadow et al. 2015). This examination showed that free amino acids content varies

Table 1 Profile of individual, hydrophobic, acidic and total free amino acids in different cacao beans fermentation stages: slaty, slaty-violet, violet, brown and white cacao beans

	Cacao beans fermentation stages				
	Slaty	Slaty-Violet	Violet	Brown	White
Val	280.13 ± 152.732 ^a	433.14 ± 139.796 ^a	856.39 ± 310.524 ^b	868.62 ± 317.383 ^b	1555.26 ± 616.251 ^c
Leu	341.10 ± 171.334 ^a	667.67 ± 359.275 ^a	1716.24 ± 753.896 ^b	1546.29 ± 390.177 ^b	2192.63 ± 286.233 ^b
Ile	297.13 ± 111.123 ^a	405.29 ± 112.373 ^a	708.77 ± 294.718 ^b	674.69 ± 189.113 ^b	852.10 ± 261.295 ^b
Ala	502.50 ± 165.136 ^a	754.10 ± 340.879 ^{ab}	1176.16 ± 298.435 ^{cd}	1051.93 ± 230.776 ^c	1394.19 ± 360.175 ^d
Tyr	441.00 ± 148.176 ^a	–	747.70 ± 367.252 ^b	844.12 ± 132.525 ^b	–
Phe	380.31 ± 201.157 ^a	589.51 ± 400.739 ^a	1686.88 ± 669.102 ^b	1426.26 ± 419.088 ^b	1817.99 ± 695.903 ^b
Total of hydrophobic	2242.17 ± 949.658 ^a	2849.71 ± 1353.062 ^a	6892.14 ± 2693.927 ^b	6411.91 ± 1679.062 ^b	7812.17 ± 2219.857 ^b
Asp	118.56 ± 52.854 ^a	173.15 ± 79.325 ^{ab}	251.94 ± 85.912 ^b	259.82 ± 57.519 ^b	393.33 ± 155.740 ^c
Glu	595.28 ± 256.579 ^a	680.49 ± 314.955 ^a	1149.78 ± 333.126 ^b	1075.82 ± 184.320 ^b	1344.13 ± 447.553 ^b
Asn	527.05 ± 255.145 ^a	810.41 ± 567.521 ^a	926.08 ± 370.028 ^{ab}	905.94 ± 318.249 ^{ab}	1299.00 ± 578.311 ^b
Gln	219.43 ± 89.713 ^a	172.49 ± 68.260 ^a	247.95 ± 76.751 ^a	212.41 ± 74.815 ^a	291.92 ± 190.878 ^a
His	155.62 ± 128.203 ^a	282.84 ± 223.993 ^{ab}	619.48 ± 354.368 ^{bc}	733.61 ± 214.562 ^c	931.31 ± 386.053 ^c
Total of acidic	1615.94 ± 782.494 ^a	2119.38 ± 1254.054 ^{ab}	3195.23 ± 1220.185 ^{bc}	3187.6 ± 849.465 ^c	4259.69 ± 1758.535 ^c
Thr	152.70 ± 62.560 ^a	203.14 ± 82.897 ^a	359.38 ± 123.703 ^b	315.20 ± 60.144 ^b	504.06 ± 118.922 ^c
Gly	124.75 ± 35.544 ^a	154.09 ± 35.336 ^{ab}	260.33 ± 86.364 ^c	219.48 ± 46.874 ^{bc}	343.81 ± 81.972 ^d
Ser	168.91 ± 91.320 ^a	241.42 ± 107.942 ^a	457.77 ± 156.893 ^b	429.08 ± 69.617 ^b	645.88 ± 223.507 ^c
Total of others	446.36 ± 189.424 ^a	598.65 ± 226.175 ^a	1077.48 ± 366.96 ^b	963.76 ± 176.635 ^b	1493.75 ± 424.40 ^d
Total of free AA	4304.47 ± 1921.576 ^a	5567.74 ± 2833.291 ^a	11,164.85 ± 4281.072 ^b	10,563.27 ± 2705.162 ^b	13,565.61 ± 4402.793 ^b

Values with different letters based on the cacao beans stages are significantly different (estimated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's 'honest significant difference' test, $P < 0.05$). Values are expressed as mg kg⁻¹ fat free dry material (ffdm) and are means of n = 18 (nine biological replicates and two technical replicates)

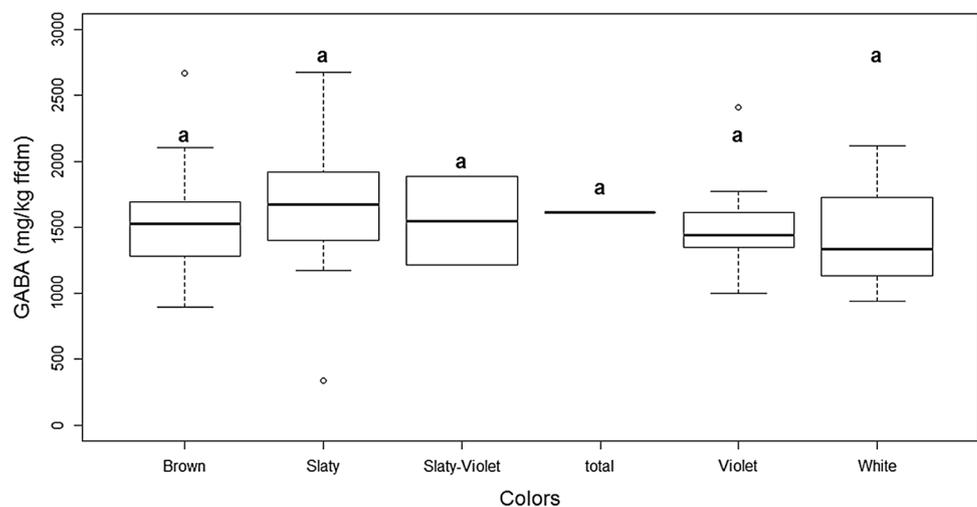
greatly between slaty and the violet and brown beans. It is known that well fermented cacao (brown) contains about 8000 to 14,000 mg kg⁻¹ ffdm and unfermented cacao (slaty) contains as low as 2000 to 4000 mg kg⁻¹ ffdm of free amino acid (Rohsius et al. 2006). Our study displayed that violet beans (under-fermented) have relatively the same amount of free amino acid as brown beans. Caligiani et al. (2014, 2016) found that hydrophobic amino acids were higher in violet beans than in brown beans while similar contents of peptides were measured in violet and brown beans, with a slightly higher amount of peptides in violet beans. In fact, during fermentation, significant amounts of soluble components from the seeds leak into the surrounding pulp. Up to 33% of the total nitrogen of the seeds is lost during fermentation (Kirchhoff et al. 1989). Especially after the death of the seeds due to increase of temperature and the penetration of acetic acid which jeopardizes cells integrity, free amino acids can be released in the surrounding environment (Biehl and Passern 1982).

Gamma-aminobutyric acid (GABA), a non-protein amino acid, content ranging from 336 to 2673 mg kg⁻¹ ffdm with an average of 1667 mg kg⁻¹ (Fig. 1). There was no significant difference between the fermentation stages based on the GABA content. Mean value and median are almost equal in all cases. The amount of 2673 mg kg⁻¹ of GABA found in slaty beans makes raw cacao one of the highest sources of this metabolite in the plant kingdom. Germinated brown rice is known to be a rich source of GABA with its highest content of 445.3 mg kg⁻¹ (Diana et al. 2014; Banchuen et al. 2010). GABA has been widely studied because of its numerous physiological functions and positive effects on many metabolic disorders. One of the most important of these is the hypotensive effect that has been demonstrated in animals and in human intervention trials. Various studies have reported GABA producing ability by lactic acid bacteria (LAB) species/subspecies.

Vast concentrations of GABA production by LAB have also been reported (Diana et al. 2014). Based on this observation, the question on the importance of the microorganisms acting during fermentation on cacao is still debated. Is the GABA accumulation in cacao beans the result of seed acidification, oxygen deficiency and/or the product of LAB? Indeed, a reduction in the pH in the cytosol, as it is found during cacao fermentation, leads to a Ca²⁺ increase. The resulting Ca²⁺/calmodulin complex in the cytosol activates the glutamic acid decarboxylase (GA) to form γ -aminobutyric acid. Obviously, there is a correlation between oxygen depletion and the formation of γ -aminobutyric acid (Bown and Shelp 1997). In the absence of oxygen, the Ca²⁺ level in the cytosol increases, that leads to the activation of glutamate carboxylase. The first phase of the fermentation proceeds under anaerobic conditions, by which the formation of γ -aminobutyric acid can be induced. Attempt to produce GABA enriched food have been proposed base on LAB producing ability. The highest GABA content ever found was in Bathura sourdough bread (2262 mg kg⁻¹) (Bhanwar et al. 2013), followed by GABA-enriched bread (115 ppm) made with exogenous supplementation of recombinant produced GAD from *Yersiniaintermedia*as starter culture (Lamberts et al. 2012).

Polyphenol analysis revealed that 1 kg of defatted dried cacao beans provide an average of 30,000 mg, 15,000 mg, 10,000 mg and 8000 mg of epicatechin for slaty, violet, white and brown beans respectively. For 1 kg of defatted dried beans, the average catechin content is as follow: 700 mg (slaty beans), 450 mg (violet beans), 200 mg (white beans) and 300 mg (brown beans). The epicatechin and catechin contents were significantly higher in slaty beans than the other beans classes (Fig. 2). The evaluation of the cyanidin-3-arabioside and cyanidin-3-galactoside distribution in cacao beans revealed a consistently high preponderance in slaty samples with an amount of

Fig. 1 Variation of γ -aminobutyric acid (GABA) contents in different cacao beans fermentation stages: slaty, slaty-violet (S-V), violet, brown, white and mixed (total) cacao beans. Mixed beans are taken in the lot without sorted according to cotyledon color. Mean values (n = 18) with different letters differed significantly at $P < 0.05$, Post hoc Test: Fisher LSD, $P < 0.05$



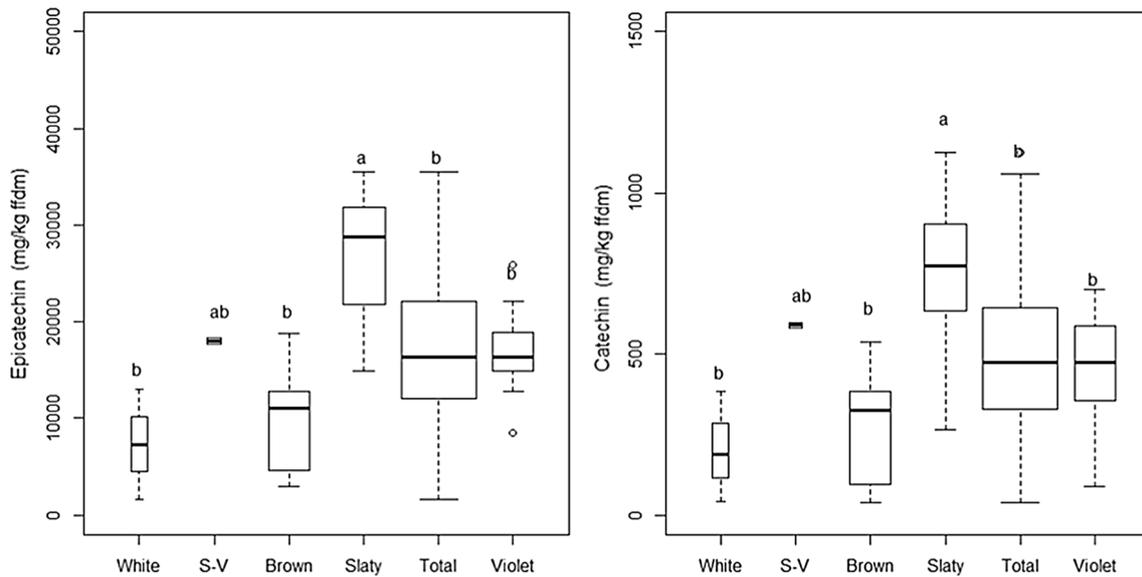


Fig. 2 Variation of epicatechin and catechin contents in different cacao beans fermentation stages: slaty, slaty–violet (S–V), violet, brown, white and mixed (total) cacao beans. Milled defatted cacao seeds were extracted in methanol and polyphenol analysis by HPLC. Otherwise as in Fig. 1

2840 mg kg⁻¹ ffdm and 4789 mg kg⁻¹ ffdm respectively (Fig. 3). With respect to the anthocyanins composition, no difference was found between violet, brown and white beans. But the content of anthocyanins was significantly higher in slaty beans when compared to the other beans colors. The amount of cyanidin-3-arabinoside was 2–3 times higher than the amount of cyanidin-3-galactoside. Polyphenols content are important discriminant determinants in many classes of food and food products. Their dynamic is often affected during food processing and depend on food matrix. As an example, hard-to-cook

kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) showed a decrease in phenolic leaching during soaking as compared to easy-to-cook grains. Smaller intercellular spaces in the cell wall of hard-to-cook beans explain this behavior. Hard-to-cook beans have also more dark color due to phenolic compounds polymerization (Parmar et al. 2017). Likewise, highest values of phenolic compounds were observed in purple corn grains than their corresponding white grains due to their high amount of anthocyanins. Consequently, dark colored flours derived from purple grains had higher

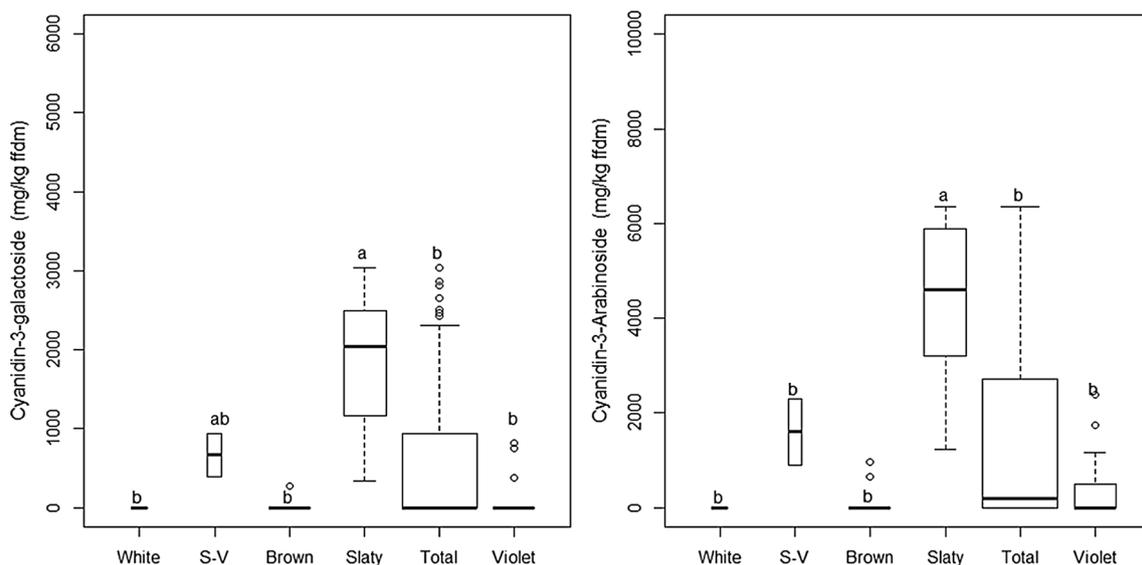


Fig. 3 Variation of cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside contents in different cacao beans fermentation stages: slaty, slaty–violet (S–V), violet, brown, white and mixed (total) cacao beans. Otherwise as in Fig. 1

content of phenolic compounds as compared to the lighter ones (Trehan et al. 2018; Singh et al. 2014).

Principal component (PC) analysis revealed that the cacao beans colors are well separated from each other according to the biochemical constituents. The 2D graphical representation showed a total variance of 87.84% (Fig. S4), the first PC representing 75.92% of the total variability (eigenvalue, 15.94) and the second PC representing 11.93% of the total variability (eigenvalue, 2.5). The variability of the data was generated mostly by the content of amino acids, epicatechin, catechin and cyanidin-3-galactoside. Brown, white and violet beans were strongly correlated with a high level of amino acids and low level of epicatechin and catechin, while slaty samples revealed high level of cyanidin-3-galactoside, epicatechin and catechin. The typical astringency of cacao is mainly due to phenolic compounds. Raw cacao with a low degree of fermentation is characterized by strong unpleasant astringency (Kadow et al. 2015). Moreover, phenolic compounds apparently inhibit the Maillard reaction and thus chocolate flavour formation during roasting by reacting with sugars (Totlani and Peterson 2005). However, due to the antioxidant properties of polyphenols, when it comes to producing health-promoting chocolate, the quality requirement must be oriented towards phenolic ingredients. Therefore, a genuine amount of slaty or slaty-violet beans could be added to the cacao masse derived from well fermented brown beans. As an illustration, a certain amount of purple beans are found and even, wanted in Arriba cacao for their polyphenols richness (Rohsius 2007). In this regard, Rawel et al. (2019) stressed that utilization of partially processed cacao beans (e.g., fermented, conciliatory thermal treatment) may provide a large collection of bioactive potentials that could be included in the designing of functional foods, illuminating an alternative use of cacao especially in the cacao-producing countries to bolster the diets with corresponding positive impact on the health status of the local populations.

The white beans found in our samples are derived certainly from Criollo group, which have been reported in some farm accessions (FA) in Cameroon. Indeed, Efombagn et al. (2008) using microsatellite markers, showed the existence of a high level of a mixture in cacao farm accessions with Criollo displaying a proportion of 7%. PC2 separated white beans from violet and brown beans. The discriminating attributes being high levels of amino acid. The Criollo beans which are the source of white beans are well known for their fine or flavour characteristics. Caligiani et al. (2014) showed that Criollo variety is characterized by high levels of amino acids.

Conclusion

This work reveals the amino acid composition and polyphenolic profile of cacao beans from different grades. The cacao bean samples investigated, based on their grade, showed that violet and brown beans have the same biochemical characteristics (free amino acids contents of $11,165 \pm 4281 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ffdm}$ and $10,563 \pm 2705 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ffdm}$ respectively; epicatechin content as dominant polyphenol of $16,764 \pm 3872 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ffdm}$ and $9791 \pm 4776 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ffdm}$ respectively). For this reason, industries that use this raw material for the production of cacao foods should consider this fact. The application of biochemical criteria, in addition to traditional assessment methods, which is often based on geographic origin of the beans, will improve the industry's approach to differentiation of raw materials. This will enable new product development on the basis of pre-selected cacao beans in cooperation with producing countries as well as a better influence on the post-harvest processes in the sense of quality certification. When interested in the human's health beneficial attributes related to cacao polyphenols, manufacturers should consider slaty-violet and violet beans while potential flavored products will need well fermented brown beans.

Acknowledgements N. Niemenak acknowledges financial support from Humboldt foundation (www.humboldt-foundation.de).

References

- Banchuen J, Thammarutwasik P, Ooraikul B, Wuttijumnong P, Sirivongpaisal P (2010) Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of Southern Thai brown rice. *Songklanakarin J Sci Technol* 32(3):219–230
- Bhanwar S, Bamnia M, Ghosh M, Ganguli A (2013) Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with γ -aminobutyric acid. *Int J Food Sci Nutr* 64:77–81
- Biehl B, Passern D (1982) Proteolysis during fermentation like incubation of cocoa seeds. *J Sci Food Agric* 33:1280–1290
- Biehl B, Heinrichs H, Ziegler-Berghausen H, Srivastava S, Xiong Q, Passern D, Senyuk VI, Hammor M (1993) The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *J Appl Bot* 67:59–65
- Bown AW, Shelp BJ (1997) The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol* 115:1–5
- Caligiani A, Palla L, Acquotti D, Marseglia A, Palla G (2014) Application of ^1H NMR for the characterization of cocoa beans of different geographical origins and fermentation levels. *Food Chem* 157:94–99
- Caligiani A, Marseglia A, Prandi B, Palla G, Sforza S (2016) Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean. *Food Chem* 211:431–439
- da Veiga Moreira IM, Miguel MGDCP, 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 Res Int* 54:9–17

- De Roos J, De Vuyst L (2018) Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr Opin Biotechnol* 49:115–119
- Diana M, Quílez J, Rafecas M (2014) Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *J Funct Foods* 10:407–420
- Efombagn MIB, Motamayor JC, Sounigo O, Eskes AB, Nyassé S, Cilas C, Schnell R, Manzanares-Dauleux MJ, Kolesnikova-Allen M (2008) Genetic diversity and structure of farm and genebank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. *Tree Genet Genome* 4:821–831
- Kadow D, Niemenak N, Rohn S, Lieberei R (2015) Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.). Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT Food Sci Technol* 62:357–361
- Kirchhoff PM (1993) Untersuchungen zur Bildung aromawirksamer Aminosäuren und Peptide aus vakuolären Proteinen durch proteolyse in Kakaosamen während der Fermentation. Dissertationsschrift, TU-Braunschweig, pp 1–218
- Kirchhoff PM, Biehl B, Crone G (1989) Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chem* 31:295–311
- Lamberts L, Joye IJ, Beliën T, Delcour JA (2012) Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making. *Food Chem* 130:896–901
- Lieberei R, Rohsius C (2003) Cocoa atlas 2002 (deutsch: Cacao Atlas 2002). Stiftung der deutschen Kakao- und Schokoladen-Wirtschaft (ed), 1st edn. dresenfunkepr/kommunikationproduction GmbH, Leverkusen CD-Rom 3-9808866-0-3
- Lieberei R, Kadow D, Zeigler D (2013) Cocoa cultivation, directed breeding and polyphenolics. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds) *Natural products*. Springer, Berlin, pp 1599–1616. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_51
- Lopez A, Lehrian DW, Lehrian LV (1978) Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of *Theobroma cacao* L. *Rev Theobroma (Brazil)* 8:105–112
- Niemenak N, Rohsius C, Elwers S, Omokolo Ndoumou D, Lieberei R (2006) Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J Food Compos Anal* 19:612–619
- Parmar N, Singh N, Kaur A, Thakur S (2017) Comparison of color, anti-nutritional factors, minerals, phenolic profile and protein digestibility between hard-to-cook and easy-to-cook grains from different kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions. *J Food Sci Technol* 54(4):1023–1034
- Rawel HM, Huschek G, Sagu ST, Homann T (2019) Cocoa bean proteins—characterization, changes and modifications due to ripening and post-harvest processing. *Nutrients* 11:428. <https://doi.org/10.3390/nu11020428>
- Rohsius C (2007) Die Heterogenität der biologischen Ressource Rohkakao (*Theobroma cacao* L.). PhD thesis, University of Hamburg, Germany
- Rohsius C, Matissek R, Lieberei R (2006) Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *Eur Food Res Technol* 222:432–438
- Romanens E, Näf R, Lobmaier T, Pedan V, Leischfeld SF, Meile L, Schwenninger SM (2018) A lab-scale model system for cocoa bean fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:3349–3362
- 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* 29:167–187
- Singh N, Kaur A, Shevkani K (2014) Maize: grain structure, composition, milling, and starch characteristics. In: Chaudhry DP (ed) *Maize: nutrition dynamics and novel uses India*. Springer, New Delhi, pp 65–76
- Stoll L, Niemenak N, Bisping B, Lieberei R (2017) German cacao of Cameroon—new facts on a traditional variety fallen into oblivion. *J Appl Bot Food Qual* 90:274–279
- Totlani VM, Peterson DG (2005) Reactivity of epicatechin in aqueous glycine and glucose Maillard reaction models: quenching of C₂, C₃, and C₄ sugar fragments. *J Agric Food Chem* 53:4130–4135
- Trehan S, Singh N, Kaur A (2018) Characteristics of white, yellow, purple corn accessions: phenolic profile, textural, rheological properties and muffin making potential. *J Food Sci Technol* 55(6):2334–2343
- Voigt J, Heinrichs H, Wrann D, Biehl B (1994) *In vitro* studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: the significance of endoprotease specificity. *Food Chem* 51:7–14
- Wollgast J, Anklam E (2000) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int* 33:423–447

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.