

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

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

***Section CNU : Sciences Biologiques
Formation doctorale : Sciences des Aliments
Ecole doctorale : Sciences des procédés biologiques et industriels***

présentée et soutenue publiquement

par
Tagro Simplicie GUEHI

le 17 décembre 2003

Titre :

**ETUDE DE L'ORIGINE ET DES CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT
DE L'ACTIVITE LIPASIQUE IMPLIQUEE DANS LA FORMATION DES ACIDES
GRAS LIBRES DU CACAO MARCHAND**

JURY

M. Guy MOULIN,	Professeur ENSA Montpellier	Directeur de thèse
M. Joseph GUIRAUD,	Professeur UMII	Président du Jury
Mme. Regina LAGO,	Senior Researcher CIRAD	Rapporteur
M. Charles CATHERIN,	Directeur de Recherche Masterfood	Rapporteur
M. Emile CROS,	Chargé de Recherche	Examineur
M. Michael DINGKUHN,	Chargé de Recherche	Examineur

Remerciements

Avant de dire un seul mot de cette prose, qu'il me soit permis de témoigner de ma profonde gratitude à toutes les personnes qui de loin ou de près ont contribué à la réalisation de cette thèse. Je ne prétends pas de les nommer tous tant ils sont nombreux et importants les uns aussi bien que les autres. Je voudrais donc très sincèrement :

- exprimer ma gratitude au **Gouvernement de Côte D'Ivoire** pour m'avoir attribué une bourse d'études en France,

- dire ma vive reconnaissance aux responsables du **Cirad** (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) qui m'ont fait confiance en m'accueillant au sein de leur institut. Au delà de cette confiance, le Cirad m'a assisté de tous points de vue : scientifique, technique, humain, financier dans la réalisation de mon projet de thèse. Je voudrais solennellement les en remercier et rassurer mes anciens responsables que pour ma part le contact né entre nous sera maintenu dans l'avenir.

Au Cirad, mes vifs remerciements vont à l'endroit de **MM. Michel BAREL, chef du programme cacao** au moment des différentes démarches ayant aboutit à cette thèse et **Emile CROS, Directeur Scientifique du projet "AGL"** pour la confiance qu'ils ont placée en moi avec spontanéité. J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Je voudrais en profiter pour témoigner de ma réelle gratitude à **M. Philippe PETITHUGUENIN, actuel chef du programme cacao**, pour son grand sens de responsabilité, de communication et d'altruisme. Mes remerciements vont aussi à l'endroit de **Gérard FOURNÏ, chercheur au programme cacao** qui m'a été d'une aide hautement précieuse dans la collecte et la préparation des échantillons de cacao en Côte d'Ivoire.

Des mots ici ne sauraient exprimer ma reconnaissance à **Céline, Sophie, Jean Claude, Noël, Renaud, Fabrice**. Vous avez tous mis la main à la pâte à un moment à un autre. Je reconnais vous avoir trop sollicités. Mais souffrez que cela soit ainsi car sans vous, je ne serais pas parvenu à rédiger une seule page de ce document.

Au programme Agronomie du Cirad-Amis, mes premières pensées vont à **Mme Anne Clément VIDAL, Ingénieur de recherche à ECOTROP. OH!**, Anne quels mots trouverais-je pour vous exprimer ce que je ressens sincèrement pour vous. N'est ce pas que les grandes émotions sont muettes ? Vous qui m'avez vu et assisté dans mes moments de désespoir, de déception, de peines et de joies, je demeure sensible à tout ce que vous avez fait pour moi. C'est un immense et beau souvenir que je garderai de ces moments inoubliables que nous avons passés ensemble. Je me demande d'où vous puisiez toute cette énergie de résistance. Ce travail est votre œuvre. Merci est un faible et ridicule mot ! .

Je demeure également sensible à la disponibilité de **M Florent MARRAUX, chef du programme Agronomie du Cirad Amis**

A **M. Jean Louis JACOB, Responsable de l'équipe Ecotrop** au moment de mon arrivée dans cette équipe, votre affection paternelle et votre soutien moral ont été pour moi une source inestimable de motivations.

A **M. Michael DINGKUN, actuel Responsable de l'équipe Ecotrop**: votre simplicité, votre rigueur et votre disponibilité m'ont hautement séduit. Veuillez trouver ici le témoignage de mon infinie gratitude.

Mes vifs remerciements vont aussi à l'endroit de **M Denis FABRE, technicien d'écophysiologie** au sein d'ECOTROP, pour son assistance dès le début de mes travaux de thèse.

A **Michaela GOETZE, assistante de direction au Cirad -Amis**, veuillez croire en l'assurance de mon entière considération.

A **M. le professeur Guy MOULLIN, Directeur de la Chaire de Génie Microbiologique et Enzymatique à l'ENSA de Montpellier**, j'ai eu le privilège de bénéficier de vos conseils, de votre encadrement et de votre enseignement. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance pour le grand honneur que vous m'a fait en acceptant d'être Directeur de ma thèse alors que vous me connaissiez à peine.

Ma gratitude va à l'endroit de M Robert RATOMAHENINA, Ingénieur de recherche à la Chaire de Génie Microbiologique et Enzymatique, cher Robert, si vous me le permettez, une grande partie de ce travail est le vôtre. Votre gentillesse et votre disponibilité font de vous un homme de confiance. Notre collaboration m'a permis d'approfondir les astuces en microbiologie.

Mes remerciements aussi M Eric DUBREUIL, Maître de conférence à l'ENSAM pour ses conseils et sa grande gentillesse.

A l'ensemble des chercheurs, techniciens et étudiants stagiaires à la Chaire de Génie Microbiologique et Enzymatique, j'adresse mes remerciements les plus amicaux pour votre soutien moral.

A l'ensemble des responsables et du personnel des industries exportatrices du cacao installées en Côte d'Ivoire telles que ADM Sifca Cocoa, SACO, Touton Côte d'Ivoire, je m'incline pour vous dire tous mes vifs remerciements pour votre précieuse aide dans la collecte d'échantillons, votre assistance technique et logistique constante dans la réalisation de cette thèse. Que Madame Dorine KOUBAKA, Responsable qualité et M Coulibaly, Directeur industriel à ADM Sifca Cocoa en particulier trouvent ici l'expression de toute ma sincère reconnaissance.

A notre maître et juge, M. le professeur Joseph Guiraud, je demeure très sensible au grand honneur que vous me faites en acceptant de présider mon jury de thèse. Votre rigueur scientifique et vos grands talents de pédagogue m'avaient déjà séduit depuis que j'ai bénéficié de vos enseignements sur la réaction biologique en DEA. Veuillez trouver ici, cher maître, le gage de mon infinie reconnaissance.

A notre maître et juge, M. Charles CATHERIN, Directeur des Nouvelles Technologies à Masterfood Europe, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail m'a profondément ému. Je ne vous en serai jamais assez infiniment reconnaissant.

A notre maître et juge, Mme Regina LAGO, Senior Researcher à Embrapa Labex France, en acceptant spontanément d'être juge de ce travail, vous ne faites que confirmer vos qualités d'expert des corps gras. Que votre gentillesse et votre simplicité soient pour moi des exemples à suivre !

A tous mes amis et compatriotes de Montpellier, ce travail est aussi le fruit de votre soutien, vos conseils, et votre amitié sans faille qui ont été pour moi de véritables forces motrices, des ressources d'énergie inépuisables.

A tous mes amis de la faculté des Sciences de la Nature de l'Université d'Abobo-Adjamé et de l'Université Montpellier 2, en souvenir de notre parcours commun, n'oubliez pas que "l'essentiel n'est pas de ne jamais tomber mais c'est de se relever à chaque fois qu'on tombe".

A tous ceux que je n'ai pu nommer, je sollicite leur indulgence. Ce travail est le fruit de nos efforts concertés, de votre disponibilité sans relâche et de votre solide amitié.

Merci à tout le monde et que Dieu nous bénisse !!!!

Sincèrement votre TAGRO

Dédicace :

A ma mère,

Je te dédie cette thèse, toi qui as été trop tôt arrachée à mon affection. Je voudrais honorer ta mémoire et te dire si cela était encore nécessaire de reposer en paix avec le sentiment de n'avoir pas vécu inutilement. A chaque moment angulaire de ma vie j'aurai toujours une pensée pour toi, maman.

A ma fille Skeuly Aude Madou,

Ta venue au monde m'a permis de me rendre compte de mes responsabilités. Trouve à travers les lignes de cette thèse la force de vivre et l'espoir d'un avenir plein de valeur, immense et profondément beau. Sache que je t'aime très fort, ma chérie.

TABLE DES MATIERES

<i>TABLE DES ILLUSTRATIONS</i>	1
--------------------------------------	---

<i>TABLE DES ABRÉVIATIONS</i>	3
-------------------------------------	---

<i>INTRODUCTION</i>	4
---------------------------	---

<i>I.- QUELQUES GENERALITES SUR LE CACAOYER ET SUR LES FEVES DE CACAO</i>	9
<i>I.1.- Le cacaoyer</i>	9
<i>I.2.- Le fruit du cacaoyer</i>	10
<i>I.3.- La graine</i>	13
<i>I.4.- Technologie post-récolte du cacao</i>	14
<i>II.- LA PRODUCTION, LE BROYAGE ET LA COMMERCIALISATION DU CACAO EN COTE D'IVOIRE</i> ...22	
<i>II.1.- La production</i>	23
<i>II.2.- Le broyage</i>	23
<i>II.3.- La commercialisation</i>	25
<i>III.- EXAMEN DE LA QUALITE DES FEVES DE CACAO</i>	25
<i>III.1.- Evaluation du taux de matières étrangères</i>	27
<i>III.2.- Evaluation du taux de brisures</i>	27
<i>III.3.- Evaluation des défauts de qualité</i>	27
<i>III.4.- Détermination de la teneur en AGL du beurre de cacao à l'usine</i>	28
<i>III.5.- Cacao affecté par une teneur en AGL supérieure à la norme en Côte d'Ivoire</i>	28
<i>IV.- LES MOISSURES DU CACAO MARCHAND</i>	31
<i>IV.1.- Etat des cabosses</i>	31
<i>IV.2.- Traitements post-récolte du cacao</i>	33
<i>IV.3.- Intégrité physique des fèves, présence d'impuretés et des insectes</i>	34
<i>IV.4.- Conditions de stockage et de transport</i>	34
<i>V.- ACTION DES MOISSURES</i>	35
<i>VI.- LE BEURRE DE CACAO</i>	36
<i>VI.1.- Définitions</i>	36
<i>VI.2.- Les propriétés physico-chimiques</i>	36
<i>VI.3.- Acidité du beurre de cacao : aspects réglementaires</i>	40
<i>VI.4.- Différentes qualités de beurre de cacao</i>	41
<i>VI.5.- Les traitements d'amélioration de la qualité du beurre de cacao</i>	42
<i>VII.- LES LIPASES : CINETIQUES ET SPECIFICITES</i>	42
<i>VII.1.- Introduction et définitions</i>	42
<i>VII.2.- Les lipases</i>	43
<i>VII.3.- Les méthodes de dosage de l'activité des lipases</i>	44
<i>VII.4.- Les lipases végétales</i>	45
<i>VII.5.- Les lipases de moisissures</i>	47

<i>MATERIELS ET METHODES</i>	49
------------------------------------	----

<i>I.- MATERIEL VEGETAL</i>	50
<i>I.1.- La mise évidence et la détermination des conditions de fonctionnement de l'activité lipasique à partir du cacao</i>	50
<i>I.2.- La recherche d'activité lipasique à partir des fèves fraîches</i>	50
<i>I.3.- L'étude de l'influence des traitements post-récolte sur l'activité lipasique et la teneur en AGL du cacao</i>	50

1.4.- Influence de la méthode d'échantillonnage sur la mesure de la teneur en AGL du cacao	52
1.5.- Influence des conditions de stockage sur la formation des AGL des brisures de cacao	53
1.6. - Influence de la formation artificielle de brisures de fèves sur la formation des AGL du cacao.- Etude quantitative et qualitative de la microflore du cacao.	53
II.- METHODES ANALYTIQUES.....	53
II.1.- Mesure de l'activité lipasique du cacao	53
II.2.- Etude des conditions de fonctionnement de l'activité lipasique à partir du cacao.....	56
II.3.- Mesure de la teneur en AGL de la matière grasse par la méthode acido-basique	58
II.4.- Analyse des AGL de la matière grasse par la chromatographie en phase gazeuse.....	58
II.5.- Préparation des milieux de culture et des solutions pour l'isolement de la flore microbienne.	60
II.6.- Méthode d'étude de la biosynthèse de la lipase du <i>Rhizopus oryzae</i>	62
II.7.- Décontamination des brisures de cacao	64
II.8.- Dosage des protéines.	65
II.9.- Analyses statistiques	65

CHAPITRE I.

ETUDE DES CONDITIONS OPTIMALES DE FONCTIONNEMENT DE L'ACTIVITE LIPASIQUE MESUREE A PARTIR DU CACAO MARCHAND.....66

1.1.- INFLUENCE DE LA DELIPIDATION DE LA POUDRE DE CACAO.....	67
1.2.- INFLUENCE DU PH	69
1.3.- INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT.....	71
1.4.- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT DU MILIEU REACTIONNEL	72
1.5.- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION ENZYMATIQUE DU MELANGE REACTIONNEL.	73
1.5.1.- Essais réalisés à partir de la poudre de cacao acétonique.....	73
1.5.2.- Essais réalisés à partir de l'extrait enzymatique de cacao -Influence de l'ajout de sels et de détergents.....	74
1.6.- INFLUENCE DU TEMPS DE REACTION.....	75
1.7.- LOCALISATION DE L'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LA FEVE SECHE.....	76
1.8.- RECHERCHE D'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LES FEVES FRAICHES NON FERMENTEES.....	77

CONCLUSION.....78

CHAPITRE II.

INFLUENCE DU GENOTYPE ET DES TRAITEMENTS POST RECOLTE SUR L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE LIPASIQUE ET DE LA TENEUR EN AGL DU CACAO 79

II.1.- CACAO RECOLTE EN DEBUT DE CAMPAGNE.....	80
II.1.1.- Influence du "génotype" du cacao	80
II.1.2.- Influence du niveau de maturité des cabosses	82
II.1.3.- Influence du délai d'écabossage des fèves.....	84
II.1.4.- Influence de la durée de fermentation des fèves	86

II.2.- INFLUENCE DES TRAITEMENTS POST RECOLTE SUR LA FORMATION DES AGL DU CACAO RECOLTE EN FIN DE CAMPAGNE.....	88
CONCLUSION.....	90

CHAPITRE III.

LES FACTEURS FAVORABLES A LA FORMATION DES AGL DU CACAO.....91

III.1.- INFLUENCE DE LA METHODE D'ECHANTILLONNAGE SUR LA MESURE DE LA TENEUR EN AGL DU CACAO.....	92
III.2.- INFLUENCE DE LA QUALITE, DE L'INTEGRITE PHYSIQUE DES FEVES ET DE LA DECONTAMINATION DES FEVES.....	93
III.3.- INFLUENCE DU MODE DE STOCKAGE.....	98
III.3.1.- Mesure de la teneur en AGL par la méthode acido-basique	105
III.3.2.- Caractérisation des AGL majeurs du beurre de cacao et évaluation de la teneur en AGL par chromatographie en phase gazeuse	106

CONCLUSION.....103

CHAPITRE IV.

ETUDE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE LA MICROFLORE DES FEVES MARCHANDES ET DES CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT DE L'ACTIVITE LIPASIQUE DU RHIZOPUS ORYZAE.....104

IV.1.- EVOLUTION DE LA FLORE MICROBIENNE EN FONCTION DE LA QUALITE DES FEVES.....	105
IV.1.1.- Evolution du nombre de bactéries.....	105
IV.1.2.- Evolution du nombre de moisissures.....	107
IV.1.3.- Evolution du nombre de levures.....	109
IV.2.- DETERMINATION DE LA NATURE DES MICROORGANISMES LIPOLYTIQUES.....	111
IV.3.- FREQUENCE ET ABONDANCE DES DIVERSES ESPECES DE MICROORGANISMES LIPOLYTIQUES ISOLEES DU CACAO.....	113
IV.4.- RELATION ENTRE LA VARIATION DE LA TENEUR EN AGL ET LE DEVELOPPEMENT DES MICROORGANISMES DANS LES FEVES DE CACAO.....	114
IV.5.- ETUDE DE LA CROISSANCE DES MOISSURES EN PRESENCE DU BEURRE DE CACAO ET BIOSYNTHESE DE LA LIPASE DU RHIZOPUS ORYZAE.....	115
IV.5.1.- Croissance des moisissures en présence de différents substrats lipidiques.....	115
IV.5.2.- Biosynthèse de la lipase pendant la croissance de la biomasse de R. oryzae.....	118
IV.6.- DETERMINATION DES CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT DE L'ACTIVITE LIPASIQUE DU RHIZOPUS ORYZAE.....	119
IV.6.1.- Influence du pH.....	119
IV.6.2.- Influence de la concentration en extrait enzymatique.....	120
IV.6.3.- Influence de la nature du substrat.....	121
IV.6.4.- Influence de la température de réaction.....	122

CONCLUSION.....123

DISCUSSION GÉNÉRALE.....124

*CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET
PERSPECTIVES.....130*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....134

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1. Des cabosses immatures et matures. Source : http://www.nybg.or./bsci/belize/Theobroma_cacao.html</i>	11
<i>Figure 2. Cabosse de cacao violette en maturité. Source : http://www.nybg.or./bsci/belize/Theobroma_cacao.html</i>	11
<i>Figure 3. Coupe longitudinale d'une cabosse de cacao mature. Source : http://www.perso.wanadoo.fr/harry.mongongnon/cacao_feve.html</i>	12
<i>Figure 4. Schéma des coupes longitudinale et transversale de cabosse de cacao. Source : Mossu (1990)</i>	12
<i>Figure 5. Coupe longitudinale d'une graine de cacao (Mossu, 1990)</i>	14
<i>Figure 6. La récolte du cacao par des paysans africains. Source : http://www.perso.wanadoo.fr/rene.oster/chocolat</i>	15
<i>Figure 7. Stockage en tas de cabosses de cacao à la plantation. Source : http://www.membres.lycos.fr/saotome/cacao3.html</i>	16
<i>Figure 8. Ecabossage du cacao par des ouvriers agricoles. Source : http://www.cirad.fr</i>	16
<i>Figure 9. La mise en fermentation en tas des fèves de cacao Source : http://www.gerkenscacao.com</i>	19
<i>Figure 10. Séchage solaire du cacao sur claie. Source : http://www.gerkenscacao.com</i>	20
<i>Figure 11. Productions mondiale et ivoirienne de cacao de 1993 à 2003 (E.D. & F. Man, 2002)</i>	23
<i>Figure 12. Côte d'Ivoire : productions et broyages de cacao de 1993 à 2003 (E.D. & F. Man, 2002)</i>	24
<i>Figures 13. Variation de la teneur en AGL exprimée en pourcentage du cacao de Côte d'Ivoire durant la période 1998-2002. Source : statistiques d'un exportateur privé.</i>	29
<i>Figures 14. Variations annuelles de la teneur en AGL du cacao ivoirien en fonction des périodes d'achat. Source : statistiques exportateurs.</i>	30
<i>Figure 15. Une cabosse de cacao atteinte par les agents de la moniliose sur l'arbre</i>	32
<i>Figure 16. Influence du nombre de délipidations successives par l'hexane sur l'activité lipasique du cacao</i>	68
<i>Figure 17. Influence du solvant de délipidation de la poudre de cacao sur l'activité lipasique du cacao</i>	68
<i>Figure 18. Influence du pH sur l'activité lipasique du cacao</i>	70
<i>Figure 19. Influence de la nature du substrat sur l'activité lipasique du cacao</i>	71
<i>Figure 20. Influence de la concentration en beurre de cacao du milieu réactionnel sur l'activité lipasique du cacao</i>	72
<i>Figure 21. Influence de la concentration du milieu réactionnel en poudre de cacao acétonique sur l'activité lipasique du cacao</i>	73
<i>Figure 22. Influence de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité lipasique du cacao</i>	75
<i>Figure 23. Influence de la variation du temps réaction à 40°C du mélange réactionnel sur l'activité lipasique du cacao</i>	76
<i>Figure 24. Localisation de l'activité lipasique à partir des organes de la fève de cacao</i>	77
<i>Figure 25. Evolution de l'activité lipasique durant le stockage en fonction du "génotype" du cacao récolté en début de campagne</i>	81
<i>Figure 26. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du "génotype" du cacao récolté en début de campagne</i>	81
<i>Figure 27. Evolution de l'activité lipasique du cacao durant le stockage en fonction de la maturité des cabosses récoltées en début de campagne</i>	83
<i>Figure 28. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction de la maturité des cabosses récoltées en début de campagne</i>	83
<i>Figure 29. Evolution de l'activité lipasique du cacao durant le stockage en fonction du délai d'écabossage des fruits récoltés en début de campagne</i>	85
<i>Figure 30. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du délai d'écabossage des fruits récoltés en début de campagne</i>	85
<i>Figure 31. Evolution de l'activité lipasique durant le stockage en fonction de la durée de fermentation du cacao récolté en début de campagne</i>	87
<i>Figure 32. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction de la durée de fermentation du cacao récolté en début de campagne</i>	87
<i>Figure 33. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du "génotype" du cacao récolté en fin de campagne</i>	88
<i>Figure 34. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du degré de maturité des fruits récoltés en fin de campagne</i>	89
<i>Figure 35. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du délai d'écabossage du cacao récolté fin de campagne</i>	89
<i>Figure 36. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du temps de fermentation du cacao récolté en fin de campagne</i>	90

Figure 37. Influence de la formation de brisures artificielles de fèves saines et des brisures naturelles durant le stockage sur la formation des AGL du cacao.....	96
Figure 38. Influence de la formation des brisures artificielles de fèves collées durant le stockage sur la formation des AGL du cacao.....	96
Figure 39. Influence de la formation de brisures artificielles de fèves noires et de leur décontamination durant le stockage sur la formation des AGL.....	97
Figure 40. Régression quadratique (lignes solides) de l'évolution de la formation des AGL des brisures décontaminées et non traitées au cours du temps de stockage, les lignes en pointillés représentent les intervalles de confiance à $P < 0,05$ de chaque fonction de régression.....	97
Figure 41. Influence du mode de stockage sur la formation des AGL des brisures de fèves noires: a) essai 1, b) essai 2.....	99
Figure 42. Chromatogrammes des AGL majeurs du beurre de cacao des brisures de fèves noires stockées 12 semaines a) en atmosphère renouvelée et b) en atmosphère confinée : essai 1.....	101
Figure 43. Chromatogrammes des AGL majeures du beurre de cacao des brisures de fèves noires stockées 12 semaines en atmosphère renouvelée (a) et en atmosphère confinée (b). essai 2.....	102
Figure 44. Evolution du nombre de bactéries et de la teneur en AGL des fèves saines (a), collées (b) et noires (c) durant le stockage.....	106
Figure 45. Evolution du nombre de moisissures et de la teneur en AGL des fèves saines (a), collées (b) et noires (c) pendant le stockage.....	108
Figure 46. Evolution du nombre de levures et de la teneur en AGL des fèves saines (a), collées (b) et noires (c) durant le stockage.....	110
Figure 47. Culture des différentes espèces de moisissures isolées du cacao marchand sur milieu PDA : <i>Absidia corymbifera</i> (a), <i>Rhizopus oryzae</i> (b), <i>Aspergillus tubingensis</i> (c), <i>Aspergillus flavus</i> (d), <i>Aspergillus tamarii</i> (e), <i>Penicillium chrysogenum</i> (f), <i>Monilia sp.</i> (g).....	112
Figure 48. Croissance des moisissures isolées du cacao marchand sur milieu Czapeck en présence de l'huile de colza.....	117
Figure 49. Croissance des moisissures isolées du cacao marchand sur milieu Czapeck en présence du beurre de cacao.....	117
Figure 50. Mesure de l'activité lipasique et de la quantité de biomasse dans un milieu Czapeck-Dox en présence d'huile de colza à 28°C au cours de la croissance de <i>R. oryzae</i> (isolé des fèves de cacao).....	119
Figure 51. Influence du pH sur le fonctionnement de l'activité lipasique du <i>R. oryzae</i> isolé des fèves de cacao.....	120
Figure 52. Influence de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité lipasique du <i>R. oryzae</i> isolé des fèves de cacao.....	120
Figure 53. Influence de la nature du substrat sur l'activité lipasique du <i>R. oryzae</i> isolé des fèves de cacao.....	122
Figure 54. Influence de la température de réaction sur l'activité lipasique du <i>R. oryzae</i> isolé des fèves de cacao.....	123

Table des abréviations

1	MMP	1,2-dimyristopalmitine	10	PPS	1,2-dipalmitostéarine
2	MOO	1,2-dioléomyristine	11	PSL	Palmitostearolinoléine
3	OOA	1,2-dioléoarachidine	12	PSO	Palmitostéarooléine
4	OOO	Trioléine	13	SOA	Oléostéaroarachidine
5	POL	Palmitooléolinoléine	14	SOL	Stéarooléolinoléine
6	POO	1,2-dioléopalmitine	15	SOO	1,2-dioléostéarine
7	PPL	1,2-dipalmitolinoléine	16	SSL	1,2-distéarolinoléine
8	PPO	1,2-dipalmitooléine	17	SSO	Oléodistéarine
9	PPP	Tripalmitine	18	SSP	1,2-distéaropalmitine

19 : FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

20 : OICC : Organisation internationale du cacao

21 : UFC : Unités formant des colonies.

22 : YNB : Yeast Nitrogen Base.

INTRODUCTION

Avec plus de 40% des parts du marché mondial du cacao, la Côte d'Ivoire est depuis une dizaine d'années le premier producteur mondial de fèves de cacao (E.D. & F. Man, 2002). Cependant, le cacao ivoirien n'est pas en première position du point de vue qualitatif. La situation est si préoccupante que tous les acteurs (producteurs, exportateurs, organismes de contrôle qualité) de la filière café-cacao ivoirienne ont décidé de s'engager résolument dans l'amélioration de la qualité du cacao en provenance de la Côte d'Ivoire. Tout récemment, le ministre ivoirien de l'agriculture s'est élevée contre la dégradation continue de la qualité de la production nationale (<http://www.izf.net/izf/AFP>). Le cacao marchand est une matière première dont la transformation industrielle aboutit à 3 produits principaux : la liqueur de cacao, la poudre de cacao (30%) et le beurre de cacao (60%). Le beurre de cacao est le composé le plus précieux et le plus cher (1897 livres sterling/t) des fèves de cacao. Il est 1,5 fois plus cher que la poudre de cacao et 2 fois plus que les fèves elles-mêmes (E.D. & F.Man, 2002). En raison de ses propriétés physico-chimiques et rhéologiques particulières, le beurre de cacao est 5 à 10 fois plus cher que les autres matières grasses végétales. Il reste actuellement la première matière grasse végétale utilisée dans les industries du chocolat et de la confiserie. A tant que matière première, le beurre de cacao contribue à hauteur de 25 à 36% dans la formulation du chocolat (Dimick, 1991). L'appréciation de la qualité du cacao diffère sensiblement selon que l'on est producteur, transporteur, vendeur, utilisateur ou consommateur. Pour les beurriers et les chocolatiers par exemple, un cacao est de bonne qualité lorsque sa teneur en beurre est élevée et lorsque ce beurre est dur, avec une teneur en acides gras libres (AGL) inférieure à 1,75% en équivalents d'acide oléique conformément aux directives de l'Union Européenne (Codex Alimentarius, 1994).

Depuis quelques années, selon les statistiques des données obtenues auprès d'un exportateur de cacao installé en Côte d'Ivoire, en moyenne 15 à 20% du cacao en provenance de ce pays sont considérés de façon récurrente et saisonnière comme ayant des teneurs anormalement élevées en AGL dépassant la norme officielle (1,75%). La présence importante d'AGL dans le beurre de cacao a des conséquences que l'on peut considérer sous trois angles :

D'abord une teneur excessive en AGL du beurre de cacao entraîne une dépréciation considérable de la qualité et en conséquence de la valeur commerciale du cacao. Ainsi, jointe à d'autres défauts de qualité associés au cacao ivoirien, la forte teneur en AGL induit des pertes financières pour les producteurs ainsi que pour l'Etat ivoirien.

Ensuite, une forte présence d'AGL dans le beurre de cacao affecte ses propriétés technologiques fondamentales c'est à dire que les AGL altèrent les courbes de solidification et

ramollissent quelque peu le produit. Ainsi donc une forte teneur en AGL du beurre présente un effet défavorable sur les traitements de cristallisation (tempéage) du chocolat au cours de sa formulation. (Boussard, 1982 ; Pontillon, 1998).

Enfin, il semblerait aussi que la présence importante d'AGL dans le beurre de cacao favorise l'apparition du bloom c'est à dire du blanchiment du chocolat pendant le stockage.

Afin d'éviter tous ces inconvénients technologiques dus à une forte teneur en AGL des surcoûts de raffinage du beurre de cacao sont appliqués par les beurriers avant son utilisation industrielle.

A notre connaissance, à ce jour aucune approche globale et complète n'a étudié les causes d'hydrolyse des triglycérides du beurre de cacao. Bien que jamais réellement démontré, le rôle de lipases a été évoqué pour expliquer la formation des AGL. En effet, au cours de cette étude l'hypothèse d'une réaction chimique a été écartée parce que celle ci conduit à la formation d'AGL à courtes chaînes carbonées alors que l'acidité du beurre de cacao est essentiellement due à la présence d'AGL à longues chaînes carbonées (Richardson, 2001). En définitive, seules les hypothèses d'une action enzymatique souvent évoquée ont été retenues :

- une voie de recherche d'activité lipasique endogène naturellement présente dans la fève de cacao et dont le fonctionnement dépendrait du "génotype" et des différents traitements post-récolte du cacao.

- une autre piste portant sur l'activité lipasique d'origine exogène notamment microbienne. Les microorganismes inféodés aux fèves de cacao pourraient se développer suite à des traitements post-récolte défectueux (provenance des fèves de cabosses initialement pourries, fermentation prolongée, mauvais séchage ou stockage prolongé en conditions humides) et sécréter des lipases dont l'action pourrait catalyser l'apparition des AGL dans le beurre de cacao.

Face à ces hypothèses, l'objectif de ce travail est double :

- d'abord, étudier l'origine et les conditions de fonctionnement de l'activité lipasique et les facteurs impliqués.

- ensuite, formuler des propositions permettant aux opérateurs ivoiriens d'améliorer cette caractéristique de la qualité associée aux fèves de cacao marchand en provenance de la Côte d'Ivoire.

Afin d'y parvenir, l'hypothèse d'une présence naturelle d'activité lipasique dans la fève de cacao a été initialement privilégiée. Après avoir mis en évidence une faible activité lipasique à partir de fèves marchandes, l'influence du "génotype" et des différents traitements

post-récolte sur cette activité ainsi que sur la formation des AGL durant le stockage en conditions de température et d'humidité relative proches de celles rencontrées en zone portuaire en Côte d'Ivoire a été étudiée. Dans une seconde voie de recherche, l'influence de la qualité initiale des fèves de cacao, de la formation artificielle des brisures ainsi que de la décontamination microbienne du cacao sur la formation des AGL a été étudiée. La suite de ce travail propose aussi une approche microbiologique impliquant le criblage des microorganismes capables de sécréter des lipases parmi la microflore inféodée aux fèves et dont l'activité pourrait catalyser l'hydrolyse des triglycérides de la matrice lipidique des fèves. La biosynthèse et l'étude des conditions optimales de fonctionnement de la lipase du *Rhizopus oryzae* isolé du cacao et pris comme moisissure modèle ont été réalisées.

Se fondant sur l'ensemble de résultats obtenus, cette étude s'achève en suggérant une série de recommandations pratiques pour limiter la formation des AGL et pour favoriser une amélioration de ce critère de qualité du cacao ivoirien. Elle propose également des pistes de recherche intéressantes à explorer pour comprendre et résoudre d'autres problèmes de qualité associés au cacao.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Peu d'ouvrages ou d'articles se sont réellement intéressés aux causes de la formation d'AGL à partir des triglycérides du beurre dans les fèves de cacao. Afin de ne pas surprendre le lecteur avec des termes spécifiques au monde du cacao, nous avons jugé utile d'orienter notre étude bibliographique sur les caractéristiques taxonomiques, technologiques, chimiques et industrielles du cacao ainsi que sur l'impact de la teneur élevée en AGL sur la qualité du beurre de cacao. Dans un second volet, nous avons fait une approche générale des lipases : leur origine, leur mode d'action, les méthodes de dosage de leur activité. Cette étude s'est achevée par une approche des lipases végétales et des lipases d'origine fongique.

I.- QUELQUES GENERALITES SUR LE CACAOYER ET SUR LES FEVES DE CACAO

I.1.- Le cacaoyer

I.1.1.- Taxonomie et description

De nombreuses études générales ont été effectuées sur le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) (Braudeau, 1969; Kennedy, 1995; Wright, 1999). Le cacaoyer appartient à la famille des sterculiacées, au genre *Theobroma* et est connu du point de vue botanique sous le nom de *Theobroma cacao* L.

Position systématique

Ordre : *Malvales*

Famille : *Sterculiacées*

Tribu : *Bilterneriées*

Genre : *Theobroma*

Espèce : *cacao* L.

Le genre *Theobroma* a été subdivisé par Cuatrecasas (1964) [cité par Villeneuve (1982)] en six sections regroupant vingt deux espèces. Les fèves de la plupart des espèces peuvent être utilisées en chocolaterie Il s'agit de : *Theobroma cacao*, *T. grandiflora*, *T. bicolor*, *T. speciosa*, *T. microcarpa* et *T. herrania*. Parmi toutes ces espèces, seule *Theobroma cacao* L. est cultivée pour l'industrie chocolatière (Lanaud *et al.*, 1999). A l'heure actuelle, l'industrie du cacao reconnaît traditionnellement trois principaux groupes cultivables. Chaque groupe est lui-même subdivisé en plusieurs cultivars (Kennedy, 1995):

● **Le groupe Criollo** (*T. cacao* subsp.) : Les cacaoyers du groupe Criollo sont peu robustes et résistent moins bien aux maladies du cacaoyer et autres aléas climatiques. Pour ces

raisons, cette variété est actuellement très peu cultivée. Leurs fruits allongés et côtelés sont de couleur orange à maturité. Ils donnent de grosses fèves avec des cotylédons à casse claire. Les Criollo sont originaires du Mexique et de l'Amérique centrale. Ils figurent parmi les variétés réputées pour donner un cacao de bonne qualité. Les industriels le classent parmi les "cacaos fins" car ils sont caractérisés par des arômes de caramel et de noisette, appréciés en chocolaterie (Clément, 2001).

● **Le groupe Forastero** (*T. cacao subsp. Sphaerocarpum*) : Les cacaoyers du groupe Forastero se rencontrent à l'état sauvage en Amazonie et dans le bassin amazonien. Ils forment un groupe très diversifié. L'arbre du Forastero est habituellement vigoureux. A maturité, les fruits des Forasteros sont arrondis, lisses et de couleur jaune. Leurs fèves sont aplaties, les cotylédons violets. Ce cacao est considéré comme de qualité standard. La majeure partie de la production mondiale de cacao provient de cette population.

● **Le groupe Trinitario** : C'est un groupe issu du croisement naturel entre les Criollo et les Forastero. Les Trinitario sont connus uniquement à l'état cultivé. Ils proviennent de l'île de Trinidad et de toute la zone de recouvrement des deux premières variétés. Ils présentent à la fois la robustesse des Forastero et un arôme plus fin des Criollo. La couleur de leurs fèves est variable.

I.1.2.- L'écologie du cacaoyer

Dans son habitat naturel, le cacaoyer est un petit arbre haut de 6 à 9 mètres des forêts tropicales humides de l'Amérique du sud. C'est une plante tropicale s'étendant entre le 20° latitude Nord et Sud. Mais le maximum de culture est souvent situé entre le 10° latitude Nord et Sud. Il exige une pluviométrie régulière et supérieure à 2 mètres, avec un minimum de 10 cm par mois (Bastide, 1987 ; Kennedy, 1995). Le cacaoyer pousse mieux dans les zones ombragées et nécessite des sols bien drainés et aérés de pH 6,5.

I.2.- Le fruit du cacaoyer

Considéré comme une drupe, le fruit du cacaoyer est communément appelé « chérelles » pendant la durée de sa croissance, puis « cabosse » lorsqu'il atteint la maturité après cinq à six mois selon ses origines. Il est indéhiscent et sa taille varie de 10 à 30 cm de longueur. De forme allongée, il possède 5 à 10 sillons longitudinaux plus ou moins marqués et régulièrement espacés longeant la cabosse d'une extrémité à l'autre. La surface du fruit peut être parfaitement lisse ou, au contraire, très verruqueuse. Sa couleur varie de vert à rouge pour

un jeune fruit, passe au jaune (fig. 1), rouge pourpre (fig. 2) pour un fruit mûr (Mossu, 1990). Selon les variétés, 20 à 90% des “chérelles” n’arrivent pas à maturité à cause du dessèchement qui intervient quand la cabosse est âgée de 50 jours (Braudeau, 1969). La cabosse contient 20 à 60 fèves de forme ovoïde de 2 à 4 cm de long alignées sur cinq rangées (fig. 3 et 4).



Figure 1. Des cabosses immatures et mures. Source : http://www.nybg.or./bsci/belize/Theobroma_cacao.html



Figure 2. Cabosse de cacao violette en maturité. Source : http://www.nybg.or./bsci/belize/Theobroma_cacao.html

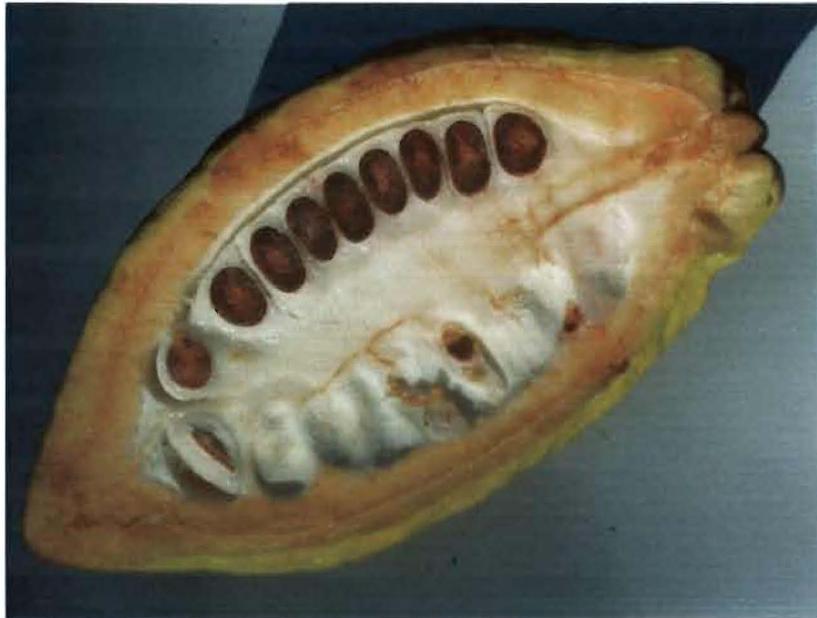


Figure 3. Coupe longitudinale d'une cabosse de cacao mature. Source : http://www.perso.wanadoo.fr/harry.mongongnon/cacao_feve.html.

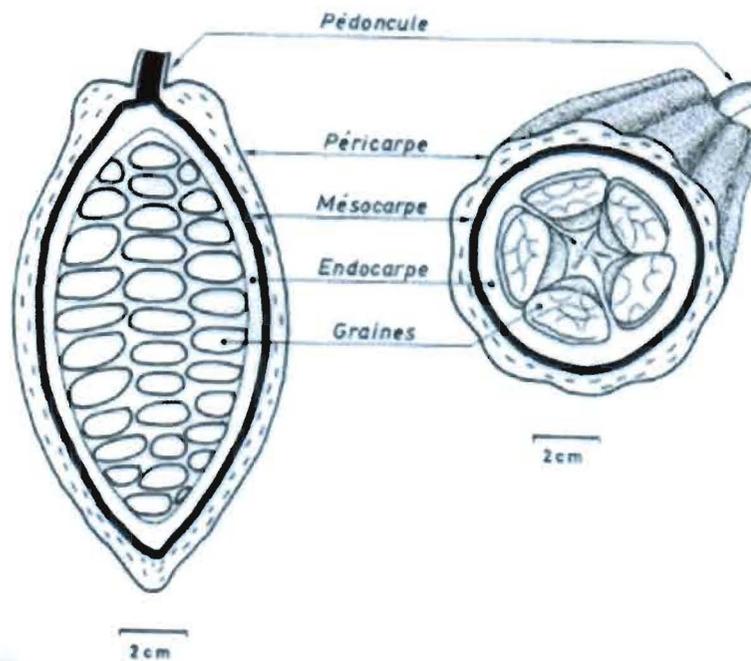


Figure 4. Schéma des coupes longitudinale et transversale de cabosse de cacao. Source : Mossu (1990)

I.3.- La graine

La graine du cacaoyer est communément appelée “fève de cacao”. On réservera cependant l'appellation “fève de cacao” à la désignation de la graine ayant subi les opérations de fermentation et de séchage nécessaires à la préparation du cacao marchand, le terme de “graine” ou de “fève fraîche” seront conservés pour désigner la graine telle qu'elle est extraite du fruit mûr (Mossu, 1990). A maturité, les fèves fraîches représentent jusqu'à 25% massique de fruit. La graine de cacao a la forme comparable à celle d'une amande plus ou moins bombée. Elle est recouverte d'une pulpe mucilagineuse de couleur blanche, de saveur sucrée et acidulée. C'est une graine sans albumen, constituée de l'extérieur vers l'intérieur de :

- **Une coque mince** résistante, rosée, nervurée, issue du développement du tégument de l'ovule,

- **Une fine pellicule**, le tégument « argenté », translucide, brillant,

- **Deux cotylédons de l'embryon** qui occupent, à l'intérieur de ce tégument, tout le volume de la graine. De coloration variant du blanc au violet foncé selon les origines de la graine, les cotylédons sont plissés avec de nombreux lobes imbriqués les uns dans les autres,

- **Un germe** qui est en fait l'ensemble formé par la radicule et la gemmule, situé entre les deux cotylédons (fig. 5).

La composition chimique de la fève non fermentée et séchée est variable en fonction de sa provenance géographique mais nous retiendrons celle de Minifie (1980) (Tab. 1).

Tableau 1. Composition chimique (%) de la graine de cacao séchée.

Constituants	Cotylédons		Coques	
	Moyenne	Gamme	Moyenne	Gamme
Eau ^a	3	2-5	7	4-11
Matière grasse (beurre de cacao et graisse de coque)	54	48-57	3	2-6
Protéines	12,5	11-24	15	13-16
Amidon	6	6-9		
Pectines & cellulose	10	10-25	17	13-19
Cendre	3	2,5-4	7	6-21
Théobromine	1,3	0,8-1,4	0,8	0,2-1,3
Caféine	0,2	0,1-0,7	0,1	0,05-0,3

^a Variable en fonction du degré de séchage ou de torréfaction

Source : Minifie (1980)

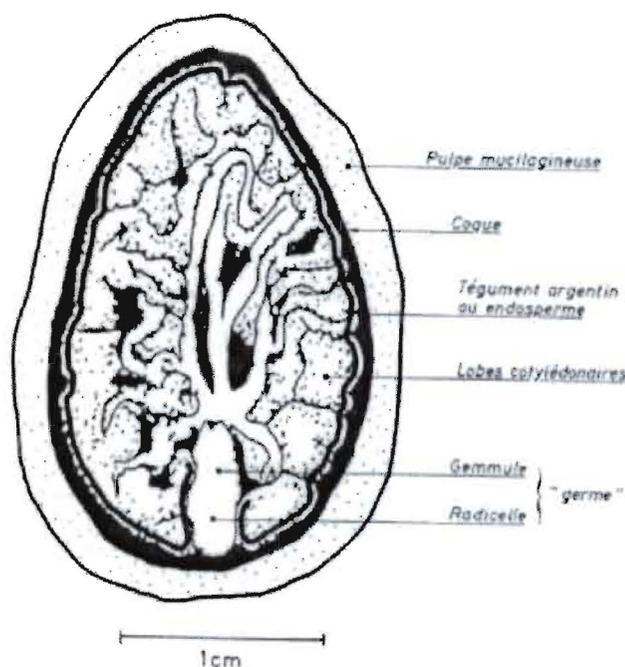


Figure 5. Coupe longitudinale d'une graine de cacao (Mossu, 1990)

I.4.- Technologie post-récolte du cacao

I.4.1.- La récolte des cabosses

La récolte du cacao a lieu à maturité des fruits. Elle est toujours effectuée manuellement à l'aide de sécateurs et d'émondoirs tranchants. La récolte du cacao est une opération délicate car le pédoncule de la cabosse est porté par un coussinet floral qui supporte également des bourgeons, des fleurs et des jeunes fruits qu'il faut préserver pour les récoltes à venir.

Au moment de la récolte, la maturité des cabosses s'apprécie exclusivement par leur couleur (fig. 6). Malgré son manque de précision, cette méthode se révèle suffisante. Avant maturité, certaines biosynthèses ne sont pas achevées. C'est le cas de la matière grasse qui est en quantité nettement plus faible que la normale. Parallèlement la qualité de la pulpe ne garantit pas une fermentation correcte.

Une récolte tardive entraîne des risques de dessèchement de la pulpe conduisant à des fermentations insuffisantes génératrices de fèves violettes. Elle peut entraîner également des risques de germination et de pourrissement des fèves qui provoquent la contamination microbienne par le micropyle et un pourcentage élevé de fèves défectueuses (noires) avec un beurre de mauvaise qualité (Barel, 1995).

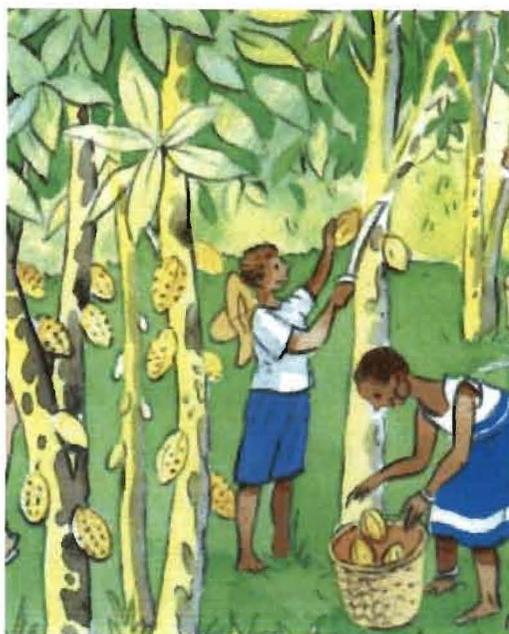


Figure 6. La récolte du cacao par des paysans africains. Source : <http://www.perso.wanadoo.fr/rene.oster/chocolat1>

I.4.2.- L'écabossage

Contrairement aux apparences, l'écabossage n'est pas une opération mineure qui ne consisterait pas qu'à ouvrir les cabosses pour en extraire les graines (Barel, 1995). L'ouverture des cabosses, encore aujourd'hui manuelle, s'effectue avec un couteau ou une machette ou encore en les frappant avec un morceau de bois ou une pierre. Bien que très répandu, l'usage d'outils tranchants est à proscrire afin de ne pas blesser les graines. Il a été conseillé durant longtemps d'écabosser le cacao immédiatement après la récolte. Cependant, différentes études (Barel, 1987 ; Mossu, 1990) ont montré que parfois la pratique d'un écabossage différé est bénéfique pour la diminution de l'acidité des fèves. La durée idéale de ce stockage varie de 5 à 6 jours selon les lieux de production (Barel, 1998). Le planteur ivoirien, par exemple, a l'habitude de stocker ses cabosses de cacao sur la plantation en tas (fig. 7) par manque de main d'œuvre pour l'écabossage (fig. 8) (Guéhi, 2002). Une fois les cabosses ouvertes, il est important de bien séparer les fèves les unes des autres non seulement mais aussi du rachis afin d'éviter l'accolement de fèves qui aboutit à la formation d'agglomérats de fèves ou grabos. En effet, la présence du rachis et les fèves collées qui en découlent empêchent une pénétration correcte de l'air dans la masse. Ceci entraîne d'importants problèmes de fermentation. De plus, ces agglomérats forment des masses compactes qui ne peuvent être séparées qu'en produisant des brisures si les fèves collées sont

très sèches. Selon Oyeniran (1980), à cause de leur insuffisance de séchage, les fèves collées sont également exposées à la contamination par les moisissures qui favoriseraient la formation des AGL.



Figure 7. Stockage en tas de cabosses de cacao à la plantation. Source : <http://www.membres.lycos.fr/saotome/cacao3.html>.



Figure 8. Ecabossage du cacao par des ouvriers agricoles. Source : <http://www.cirad.fr>

I.4.3.- La fermentation

La fermentation du cacao est une opération complexe qui doit être débutée au plus tard 24 h après l'écabossage. Elle a deux objectifs principaux (Vincent, 1996) :

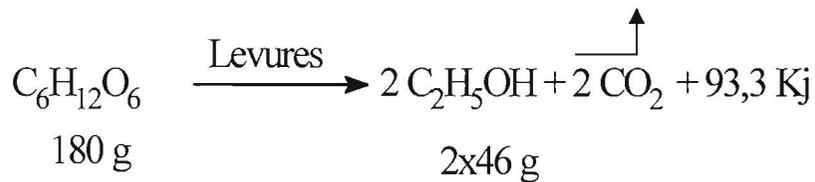
- L'élimination de la pulpe par liquéfaction suite à une dégradation microbienne. Ceci permet un séchage rapide des fèves dans les conditions climatiques tropicales humides.

- Le déclenchement des réactions biochimiques responsables de l'apparition des précurseurs d'arôme du cacao.

La mort de l'embryon qui s'ensuit en supprimant le pouvoir germinatif des fèves est à la fois un objectif et une conséquence des réactions chimiques qui ont lieu au cours de la fermentation.

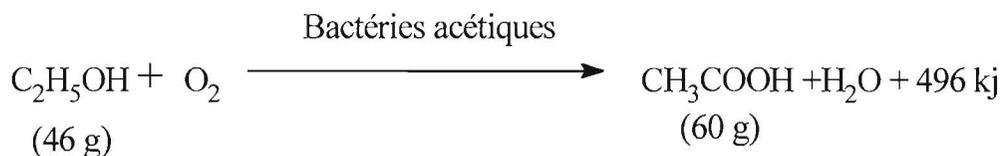
La fermentation est l'étape primordiale du traitement post-récolte du cacao (Barel, 1987, Vincent, 1996). Dans la cabosse, les fèves fraîches et la pulpe qui les entoure sont initialement stériles sur le plan microbiologique (<http://www.fao.org>). Après écabossage, elles sont contaminées par les microorganismes de l'environnement véhiculés par l'air, les insectes (drosophiles, guêpes), les mains des travailleurs, les feuilles de bananiers utilisées pour les couvrir, les outils et le matériel de travail (Stessels, 1994). Des brassages réguliers de toute la masse sont nécessaires toutes les quarante-huit heures pour l'aération de la masse de cacao (Barel, 1998). La durée de fermentation du cacao et les méthodes utilisées sont variables non seulement suivant les pays et les variétés mais aussi suivant le producteur. Trois types de fermentation constituent les méthodes usuelles. Ces méthodes durent généralement 2 à 8 jours. Ce sont **la fermentation en paniers**, **la fermentation en tas** (fig. 9) et **la fermentation en caisses perforées** (Stessels, 1994 ; Barel, 1998). Quelle que soit la méthode employée, c'est une fermentation qui se déroule en trois étapes d'abord **alcoolique**, puis **lactique** et enfin **acétique** :

- 1^{ère} étape : **la fermentation alcoolique** : C'est une fermentation en anaérobie stricte, la pulpe autour de la fève forme une structure collante qui empêche la pénétration de l'air dans la masse de cacao. Celle-ci est contaminée par les levures, dont des pectinolytiques, favorisées par une richesse en sucres et un pH acide de la pulpe. Leur nombre devient très important et passe de $\approx 2 \cdot 10^6$ à $3 \cdot 10^7$ UFC/g de cacao. L'oxygène introduit dans la masse de cacao est rapidement consommé. Les levures liquéfient la pulpe et passent alors à un métabolisme fermentaire en transformant les sucres en alcool éthylique (C_2H_5OH) et en dioxyde de carbone (CO_2) selon la réaction suivante. Cette réaction peu exothermique dure entre 24 et 48 heures (Biehl, 1996). Il s'ensuit une augmentation du pH à cause de la consommation de l'acide citrique.



● 2^{ème} étape : **la fermentation lactique** : La liquéfaction de la pulpe entraînant une micro-aération, la transformation des sucres en alcool et l'augmentation du pH créent de nouvelles conditions favorables au développement des bactéries lactiques qui remplacent progressivement les levures. Ces bactéries, en anaérobiose facultative, transforment les sucres en acide lactique, en éthanol et en dioxyde de carbone (Stessels, 1994). La fermentation lactique n'est pas souhaitable à cause de la très faible volatilité de l'acide lactique qui pénètre dans les cotylédons et qui y reste définitivement.

● 3^{ème} étape : **la fermentation acétique** : Le brassage de la masse de cacao favorise naturellement la colonisation par une population bactérienne majoritairement constituée de bactéries acétiques. L'éthanol issu de l'activité des levures est oxydé en acide acétique et l'eau selon la réaction exothermique ci dessous. Ceci entraîne une élévation brutale de la température supérieure à 50°C en soixante douze heures de fermentation (Barel, 1998) :



La migration d'acide acétique et l'élévation de la température à travers les cotylédons entraînent la mort du germe. L'ensemble des parois cellulaires et cytoplasmiques deviennent perméables, les échanges cellulaires deviennent alors possibles. Il s'établit les contacts entre les diverses enzymes et leurs substrats. Les réactions cotylédonaires portent essentiellement sur la transformation des constituants complexes de réserve de la graine en composés plus simples. Ainsi, les protéines sont hydrolysées en peptides et acides aminés ; et les sucres en monosaccharides. Les polyphénols sont transformés en composés insolubles (tannage, oxydation) (Mossu, 1990 ; Cros et Jeanjean, 1998). La matière grasse ne subit pas de transformation notable (Schwan, 1998).

La fermentation est arrêtée par des critères subjectifs : gonflement des fèves, odeur de la masse, couleur des cotylédons et la chute de la température. Toutes ces observations demandent la pratique et de l'expérience de l'opérateur. Si la fermentation est prolongée, les

bactéries acétiques sont remplacées par des bactéries sporulées ; et les moisissures se développent. Il se forme des acides gras courts (C_3 , C_4 , C_5) et des amines biogènes.



Figure 9. La mise en fermentation en tas des fèves de cacao
Source :<http://www.gerkenscacao.com>

I.4.4.- Le séchage

A la fin de la fermentation, les fèves de cacao présentent une teneur en eau de 55 à 60%. L'objectif du séchage est de ramener cette teneur à moins de 8% de manière à assurer au cacao une bonne conservation durant le stockage et le transport (Pontillon, 1998 ; Fowler, 1999). Le séchage du cacao est une opération très capitale car la qualité finale du beurre et des tourteaux en dépendent intimement. Les méthodes de séchage du cacao peuvent être classées en deux principaux types qui sont le **séchage naturel ou solaire** et le **séchage artificiel**.

Le séchage solaire est le plus utilisé à travers le monde (Mossu, 1990). Malgré sa lenteur, il présente l'avantage de s'effectuer sans dépense d'énergie et de favoriser l'évaporation de l'acide acétique produit au cours de la fermentation (Barel, 1998). Il permet également la poursuite des réactions biochimiques pendant les premiers jours de l'opération. Cependant, il présente des inconvénients de nécessiter d'importantes surfaces pour l'étalage des fèves et de la main d'œuvre pour les brassages réguliers de la masse (fig. 10). De plus, il est très dépendant des variations climatiques du moment.

Le séchage artificiel est très souvent utilisé dans les grandes coopératives ou pendant les périodes particulièrement humides. Il nécessite des tables de séchage en tôles perforées sur lesquelles le cacao est disposé en couches épaisses et l'air chaud est pulsé. Ce type de séchage

présente de nombreux avantages : rapidité, homogénéité, mise en œuvre facile, demande une main d'œuvre moins importante. Cependant, l'inconvénient majeur qu'on lui connaît est la rétention des acides volatils et une consommation élevée d'énergie. Les différences de tension de vapeur et de diffusion entre l'eau et l'acide acétique observées aux températures du séchage artificiel (à partir de 45°C) font que l'eau s'évapore de la fève en premier. Ceci provoque le dépôt de substances dissoutes en périphérie de la fève. Il se crée alors une barrière qui s'oppose au départ de l'acide acétique. De plus, l'air chaud au contact des fèves sèche la pulpe résiduelle et provoque la formation de croûtes interne et externe. Ces croûtes ralentissent le départ des composés volatils. Ceci conduit à une demande énergétique jugée trop importante pour une faible vaporisation.

Quel que soit le mode de séchage utilisé, la teneur en eau des fèves de cacao est déterminante pour la qualité industrielle ultérieure du cacao. En effet, selon Boussard (1982) lorsque la teneur en eau est inférieure à 5%, les coques se brisent facilement et les fentes provoquées dans la coque sont autant de voies de pénétration possibles pour les insectes et les moisissures en cas de réhydratation du cacao. A l'inverse, un cacao trop humide est très rapidement contaminé par les moisissures.

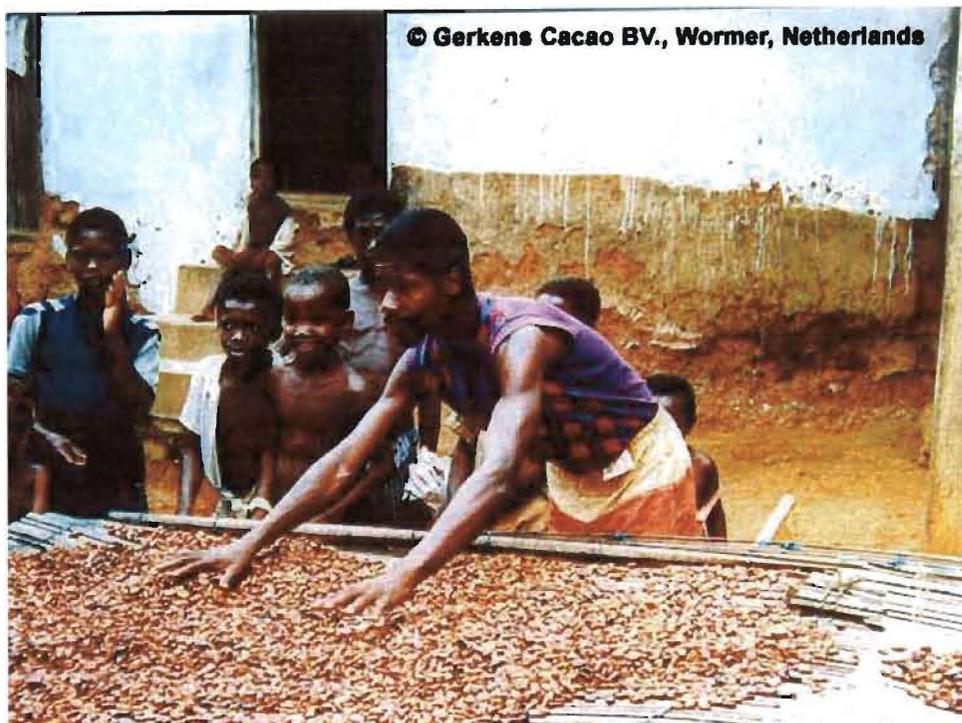


Figure 10. Séchage solaire du cacao sur claie. Source : <http://www.gerkenscacao.com>

I.4.5.- Le stockage et le transport du cacao

I.4.5.1.- Le stockage

Dernière étape avant l'exportation du cacao, le stockage est considéré comme une opération capitale mais délicate en zones de production à cause des variations climatiques (température et humidité défavorables) qui y prévalent. Pour cela, on y assiste trop souvent à une détérioration de la qualité des fèves durant le stockage (Boussard, 1982). Il a lieu à plusieurs niveaux : chez le planteur et chez l'acheteur avant la livraison, au port avant l'expédition et à l'usine avant l'utilisation (Barel, 1995). Les conditions de stockage du cacao ont pour but de garantir un minimum d'évolution de la qualité des fèves c'est à dire :

- ▶ Pas de reprise d'humidité,
- ▶ Pas de développement de moisissures ni d'attaques d'insectes,
- ▶ Pas d'hydrolyse des triglycérides constitutifs de matière grasse,
- ▶ Pas de reprises de goûts ni d'odeurs étrangers

Les normes internationales précisent de nombreuses précautions de stockage du cacao (Mossu, 1990) :

- ▶ Une humidité ambiante ne dépassant pas 70%,
- ▶ Un entreposage des sacs à au moins 7 cm du sol pour permettre la circulation de l'air,
- ▶ Une vérification périodique de la teneur en humidité de chaque lot,
- ▶ Des contrôles réguliers afin d'éviter l'apparition d'odeurs et de saveurs indésirables, des poussières
- ▶ Une désinfection par fumigation (bromure de méthyle)

En général, le cacao est livré par les producteurs avec une teneur en eau trop élevée car ces producteurs sont trop souvent mal outillés pour sa mesure et son contrôle (Guéhi, 2002). En effet, les producteurs de cacao en zone rurale se fondent sur le bruit des fèves au soleil en y passant la main. Or, il est admis que c'est lorsque la marchandise contient plus de 8% d'eau que la conservation est difficile et que les moisissures peuvent s'y développer (Fowler, 1999). Ceci pourrait occasionner une formation plus accrue des AGL durant cette étape à cause de l'action des lipases d'origine fongique (Pontillon, 1998).

Des tentatives d'amélioration du stockage du cacao ont été étudiées. L'utilisation de gaz inertes, d'atmosphères contrôlées et du vide sont des techniques qui bien que satisfaisantes, demandent des investissements jugés trop importants par les filières (Barel, 1998).

I.4.5.2.- Le transport

Le transport du cacao est un véritable problème dans les zones de production à cause des conditions d'humidités qui y sont généralement élevées. L'enquête effectuée auprès de quelques producteurs en Côte d'Ivoire a révélé que les moyens de transport sont très limités (Guéhi, 2002). Ceci entraîne un long temps de séjour et d'attente du produit en stockage dans les plantations. Si les conditions climatiques sont défavorables, les risques de reprise d'humidité deviennent importants. Ceux ci sont également élevés lors du transfert de produit des zones de production vers les zones portuaires. En saison pluvieuse, le cacao peut être accidentellement mouillé. En saison sèche, les risques ne sont pas négligeables puisque le cacao reprend de l'eau pendant la nuit (Renaud, 1954).

II.- LA PRODUCTION, LE BROYAGE ET LA COMMERCIALISATION DU CACAO EN COTE D'IVOIRE

Située en Afrique de l'Ouest sur le Golf de Guinée, entre l'équateur et le tropique du cancer, la Côte d'Ivoire est limitée à l'Est par le Ghana, à l'Ouest par le Libéria et la Guinée, au Nord par le Mali et le Burkina Faso. Seize millions de personnes (recensement de 1998) occupent les 322.462 km² constituant sa superficie. Au lendemain de l'indépendance, plusieurs études ont permis de retenir l'agriculture comme base du développement économique. Le choix de l'agriculture comme moteur de l'économie ivoirienne n'est pas fortuit. En effet, la position géographique en longitude et en latitude confère à ce pays une formidable diversité climatique. Laquelle diversité entraîne toute une variété de sols et de zones de végétations du Nord au Sud et évidemment une diversité de cultures. Les cultures du cacao, du café, du palmier à huile, de l'hévéa, etc. sont essentiellement pratiquées au Sud en raison des conditions climatiques et de la végétation qui y sont favorables. Celles du coton, du karité, des céréales, l'arachide, etc. sont concentrées au Nord. L'autre atout dont dispose la Côte d'Ivoire est le facteur humain. La population ivoirienne est dans sa grande majorité rurale. En 1991, 60% de la population active était dans les campagnes (<http://www.ci.refer.org>).

II.1.- La production

En 2002/2003, la production mondiale de cacao en fèves est estimée à 3.040.000 tonnes (E.D. & F. Man, 2002). Ceci représente une augmentation de 263.000 tonnes (9,5%) par rapport aux 2.807.000 tonnes (OICC, 2002) enregistrées au cours de la campagne 2001/2002. Parmi les régions productrices, la production prévisionnelle de 2002/2003 comparée à celle de l'année cacaoyère précédente a augmenté en Afrique de 179.000 tonnes (9,5%).

La Côte d'Ivoire est le premier producteur mondial du cacao depuis une décennie avec plus de 40% des parts du marché international (fig. 11). La récolte est évaluée à 1.300.000 tonnes, soit une augmentation de 90.000 tonnes (7,4%) par rapport à la saison précédente.

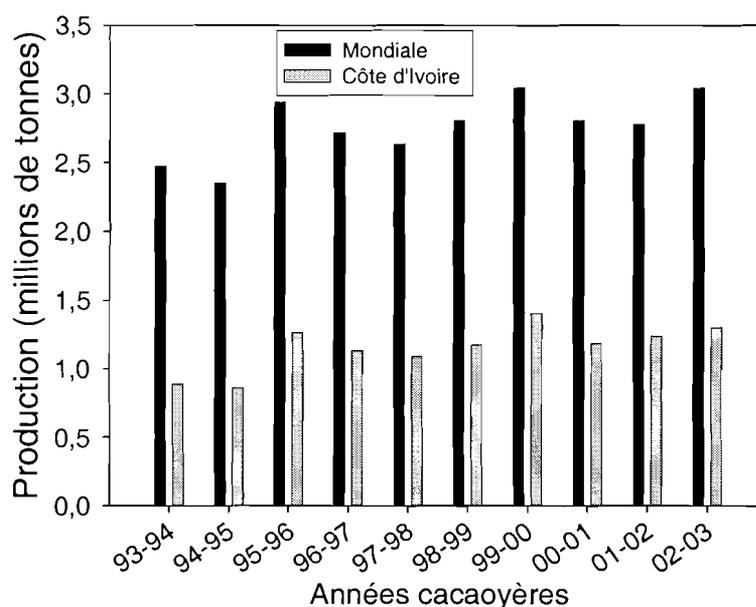


Figure 11. Productions mondiale et ivoirienne de cacao de 1993 à 2003 (E.D. & F. Man, 2002)

II.2.- Le broyage

En 2003, les broyages mondiaux de cacao ont été évalués à 2.995.000 tonnes, soit une augmentation de 5% (136.000 tonnes) par rapport à la saison précédente (E.D. & F. Man, 2002). Les broyages du cacao en provenance des pays producteurs continuent d'être effectués pour l'essentiel dans les pays consommateurs (OICC, 1999/2000). Faute de moyens technologiques adéquats, la part de broyages des pays africains producteurs de cacao est

modeste par rapport à leur production. Elle est restée pratiquement stable au cours de ces trois dernières campagnes (Tab. 2).

En Côte d'Ivoire, les broyages locaux représentent seulement 20% de la production de cacao (E.D. & F.Man, 2002). Ceci explique que chaque année près de 80% de la production ivoirienne du cacao en fèves est destiné à l'exportation (fig. 12).

Tableau 2. Quantités annuelles de fèves de cacao broyées par les principaux pays africains producteurs de cacao (en milliers de tonnes)

	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99	99/00	00/01	01/02*	01/03*
Cote d'Ivoire	110	108	130	145	195	210	230	285	276	260
Ghana	46	64	60	68	67	65	75	80	70	85
Cameroun	12	17	23	26	29	31	32	30	30	30
Nigeria	10	10	16	20	15	20	28	20	15	20
Afrique du Sud	5	6	6	7	6	5	3	6	4	5
Autres pays (Togo, Gabon Sao Tomé Principe)	2	2	1	2	1	5	5	7	9	9
Total	185	207	237	268	313	336	374	427	404	409

*Prévisions

Source : E.D. & F. Man (2002)

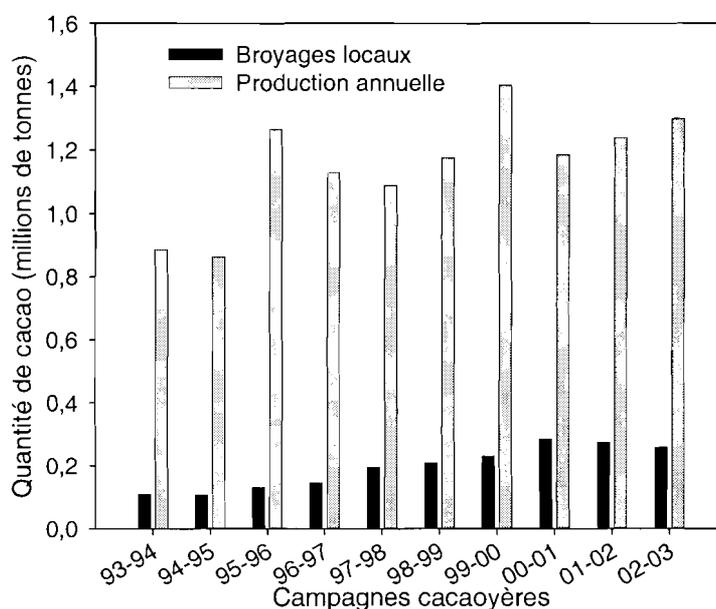


Figure 12. Côte d'Ivoire : productions et broyages de cacao de 1993 à 2003 (E.D. & F. Man, 2002)

II.3.- La commercialisation

La Côte d'Ivoire est le premier pays producteur en Afrique à avoir commencé la libéralisation de la filière cacao en janvier 2000 (OICC, 2000). Les principales actions de cette libéralisation ont été de dissoudre la Caisse de stabilisation (Caistab) et de renforcer le contrôle de qualité et le conditionnement du cacao en zones de production. Ceci, pour accorder aux producteurs eux-mêmes le plein contrôle de la qualité de leur production et pour constituer un moyen de financement garanti du commerce avec des coopératives provinciales. Cette politique a permis de créer plusieurs usines de conditionnement dont une à capacité de 15 tonnes par heure au Sud Ouest du pays et quelques coopératives. Mais sur le terrain, le mouvement coopératif a été plus tardif que dans d'autres pays comme le Cameroun. A côté des coopératives, existent des pisteurs indépendants et de nombreux agents privés en relation avec les grands commerçants. Ces opérateurs prennent une part active à la commercialisation du cacao. Ils présentent les avantages de disposer de moyens de transports efficaces pour l'enlèvement du cacao des zones de production enclavées permettant ainsi d'écourter le temps de séjour du produit chez le producteur et de payer comptant le cacao. Malheureusement leur méconnaissance et leur manque de rigueur au regard de l'évaluation de la qualité du cacao les conduisent à ne s'intéresser qu'à la quantité au détriment de la qualité du cacao. La multiplicité de ces agents et les différents mélanges des fèves réalisés à tous les niveaux de la filière contribueraient à l'apparition des défauts de qualité souvent associés au cacao en bouts de chaînes.

III.- EXAMEN DE LA QUALITE DES FEVES DE CACAO

Suivant la destination finale du cacao marchand, des critères beaucoup plus spécifiques de qualité reposent sur l'arôme, la pureté, l'uniformité, la teneur en matière utilisable en chocolaterie, les caractéristiques chimiques (la teneur en AGL, absence des off-favours) et enfin les propriétés physiques (la dureté) de la matière grasse (Daviron, 1996). Il n'existe pas de dispositif de classification universelle appliqué par tous les opérateurs du marché du cacao. Une norme internationale négociée au sein de la FAO, coexiste avec différentes dispositions définies dans le cadre de contrats des différentes associations de négoce de cacao (Tab. 3).

Tableau 3. Comparaison des différents contrats de négoce de cacao (Fowler, 1999)

	Description	Grainage pour 100 g de fèves	Défauts (%)			Humidité (%)	Matières étrangères (%)
			Fèves moisies	Fèves ardoisées	Fèves défectueuses ^a		
			FAO ^b	Grade 1	NS ^c		
AFCC ^d	Bien fermentées	100	5	5	- ^e	7,5	NS
CAL ^f	Bien fermentées (récolte principale)	100	5	5	- ^e	NS	NS
CMAA ^g	Récolte principale	100	4 ^h	10	4 ^h	NS	NS

^a Fèves défectueuses= fèves (mitées+germées+plates)

^b La FAO spécifie que le cacao doit être fermenté, exempt de matières étrangères et d'odeurs indésirables.

^c Non spécifié

^d Association Française du Commerce des Cacaos

^e Fèves défectueuses incluant les fèves moisies.

^f Cocoa Association of London

^g Cocoa Merchant's Association of America.

^h Maximum de fèves moisies et défectueuses est de 6%

Outre ces constats, chaque pays producteur possède son propre système de classification. Ces différentes normes définissent en commun le pourcentage autorisé de fèves moisies, ardoisées, mitées, plates et germées. Mais aucune d'entre elles ne donne d'information ni sur la force de l'arôme ni sur les caractéristiques physiques des beurres à l'exception. L'évaluation des défauts de qualité et de la valeur marchande du cacao repose principalement sur le test à la coupe. Ce test qui est un examen essentiellement visuel donc subjectif consiste à couper longitudinalement les fèves de cacao. Dans les usines de traitement du cacao avant l'exportation en Côte d'Ivoire, des analyses de l'aspect physique des fèves de cacao sont réalisées sur environ 300 fèves prélevées à partir de 25 kg échantillonnés à partir de 25 tonnes de produit.

III.1.- Evaluation du taux de matières étrangères

Sous la dénomination de matières étrangères, il faut entendre tout ce qui n'est pas fèves de cacao : cailloux, particules métalliques, plastiques, bois, plumes, placentas, etc. L'estimation du taux de matières étrangères se fait par la détermination de la différence entre la pesée de l'échantillon prélevé avant et après tamisage. Le tamis couramment utilisé en Côte d'Ivoire a des mailles carrées (4x4 mm) ou circulaire ($\varnothing=5$ mm).

III.2.- Evaluation du taux de brisures

Les brisures sont des fèves dont il manque un fragment de cotylédons, la partie manquante ayant une taille inférieure à la moitié d'une fève. et les particules d'amandes de cacao. Elles sont déterminées soit par tri manuel soit par l'utilisation d'un tamis.

III.3.- Evaluation des défauts de qualité

Les défauts de qualité des fèves de cacao sont déterminés sur 300 g de fèves entières et individualisées (Crespo, 1986).

● **La masse spécifique (ou le grainage)** est déterminée par comptage des fèves à partir de 100 g. Le critère de bonne qualité est fixé à un grainage inférieur ou égal à 100 fèves pour 100 g de cacao.

● **Le cut test ou le test de la coupe** permet d'apprécier le degré de fermentation d'un lot de cacao (Barel, 1987) mais aussi de déterminer le pourcentage de fèves défectueuses (Crespo, 1986) telles que :

▶ **Les fèves ardoisées** : les fèves ardoisées sont des fèves qui se caractérisent par un défaut de fermentation. Leur coupe présente une couleur grise ardoisée ;

▶ **Les fèves moisies** : ce sont des fèves dont la partie interne présente des traces de moisissures visibles à l'œil nu par la présence de filaments de couleur blanchâtre ou d'une poudre vert grisâtre ou jaune claire ;

▶ **Les fèves mitées** : une fève est mitée s'il y a présence d'insectes vivants, des déchets visibles à l'œil nu (sciure), de trace de passage de l'insecte ou de cocons.

▶ **Les fèves collées ou grabos ou agglomérats de fèves** : les fèves collées sont des agglomérats de deux ou plusieurs fèves enrobées par la pulpe séchée. Ces agglomérats sont dus soit à l'immaturité des fruits, soit à une mauvaise séparation des fèves du rachis pendant l'écabossage, ou encore à un mauvais brassage des fèves au cours de la fermentation. Elles constituent un défaut de qualité car elles sèchent difficilement et seraient en conséquence le siège de développement de moisissures.

III.4.- Détermination de la teneur en AGL du beurre de cacao à l'usine

Cette analyse porte sur un échantillon de 500 g de fèves prélevé à partir de 25 kg échantillonnés à partir de 25 tonnes de cacao. Une fraction (200 à 300 g) de cet échantillon est grossièrement broyée. Environ 150 g du broyat sont chauffés au four à micro-ondes (3 min à 900 watts ou 5 min à 750 watts) ou chauffés avant d'être broyés. Une nouvelle fraction (100 g) obtenue à partir de la fraction précédente est emballée dans du papier absorbant avant d'être placée dans le moule d'extraction à la presse. Les AGL sont déterminés sur au moins 5 g de beurre de cacao est extrait par pression de 100 g de broyat.

III.5.- Cacao affecté par une teneur en AGL supérieure à la norme en Côte d'Ivoire

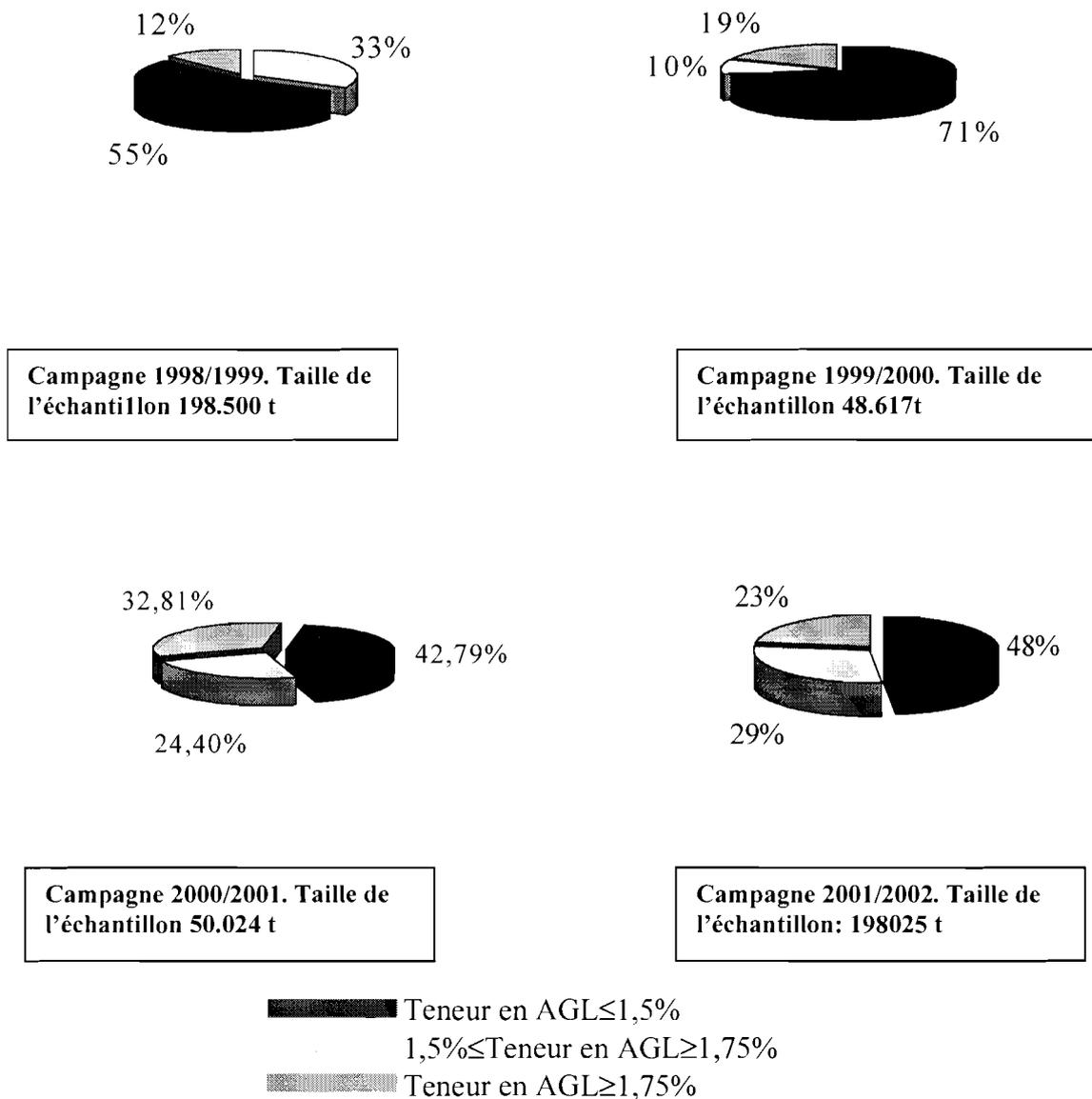
L'évaluation de la qualité d'un lot de cacao n'est pas une activité aisée. En effet, l'on ne dispose que d'informations fragmentaires sur l'itinéraire de préparation du cacao. En Côte d'Ivoire par exemple, l'évaluation de la qualité des fèves est devenue encore plus difficile depuis la libéralisation de la filière à cause du fait qu'aucun des acteurs (producteurs, pisteurs, traitants) n'est outillé pour cela (Guéhi, 2002) et pour deux raisons fondamentales :

- d'abord la teneur en AGL du beurre de cacao étant un critère de qualité du cacao parmi d'autres, elle est différemment considérée selon les produits finis qui vont en découler. Ainsi, certains industriels rejettent catégoriquement les lots de cacao affectés par une teneur en AGL supérieure à la norme, d'autres les achètent avec une décote comprise entre 5 à 10 Francs CFA sur le prix du kilogramme selon des contrats établis de gré à gré avec les traitants.

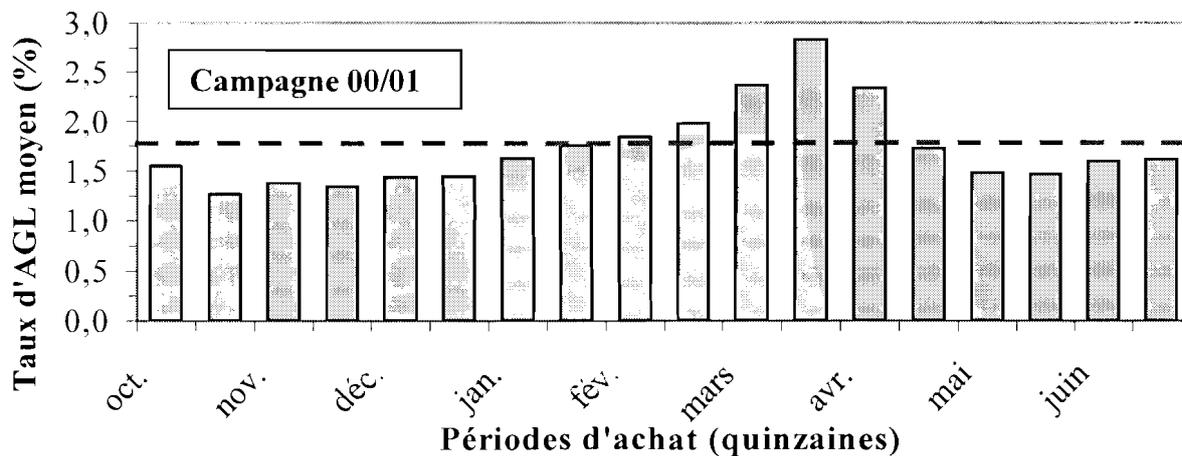
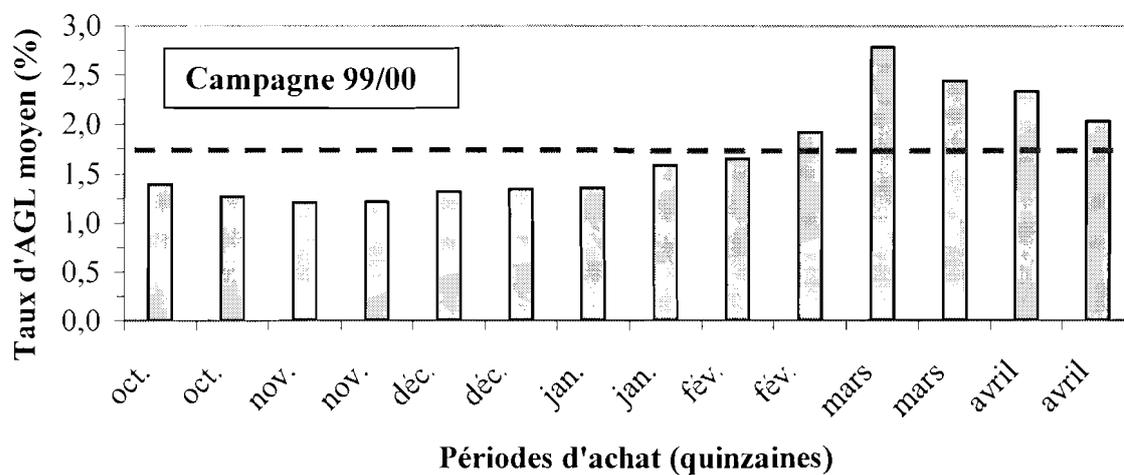
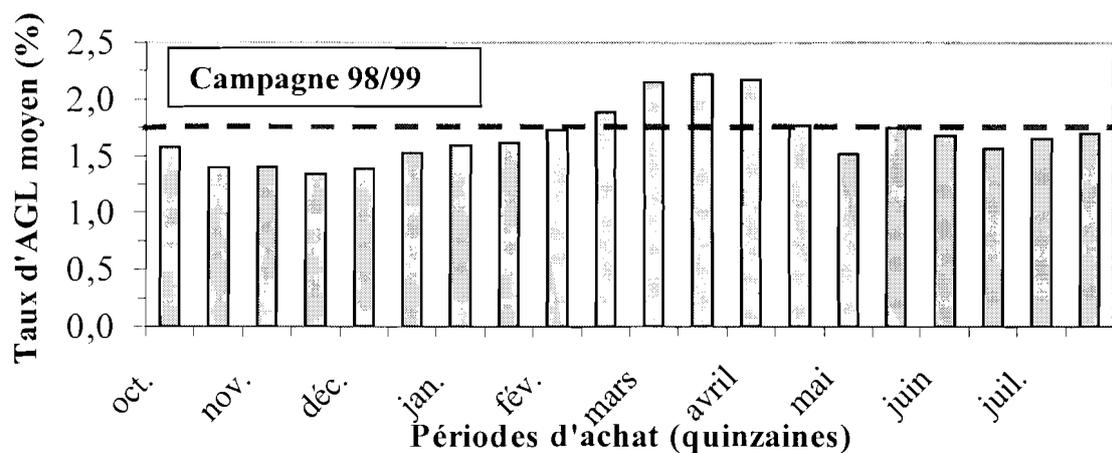
- ensuite les lots de cacao affectés par des fortes teneurs en AGL sont mélangés avec des lots de cacao sains contenant une faible teneur en AGL afin d'obtenir une teneur en AGL moyenne dans les normes.

Tous ces facteurs expliquent pourquoi bien que certains lots de cacao contiennent des fortes teneurs en AGL, il est difficile d'en évaluer l'impact sur la qualité du produit et sur les pertes financières résultants pour les opérateurs de la filière. Cependant, les statistiques des données obtenues auprès d'un exportateur de cacao installé en Côte d'Ivoire révèlent que pour ces 4 dernières campagnes cacaoyères (1998-2002) 15 à 20% en moyenne de la production annuelle ivoirienne de cacao sont affectés par des teneurs anormalement élevées en AGL (fig. 13). Si ces données ne portent pas sur toute la production ivoirienne, elles restent

suffisamment représentatives du problème vu la saisonnalité et la récurrence persistantes du problème des AGL en Côte d'Ivoire (fig. 14).



Figures 13. Variation de la teneur en AGL exprimée en pourcentage du cacao de Côte d'Ivoire durant la période 1998-2002. Source : statistiques d'un exportateur privé.



Figures 14. Variations annuelles de la teneur en AGL du cacao ivoirien en fonction des périodes d'achat. Source : statistiques exportateurs

IV.- LES MOISSURES DU CACAO MARCHAND

De la récolte en passant par les opérations manuelles jusqu'à la transformation finale, les aliments sont généralement exposés à la contamination par une population importante de microorganismes dont les moisissures (Huis in't Veld, 1996). Au cours du stockage, le développement des moisissures est sous la dépendance de multiples facteurs dont les uns, dits externes, sont liés aux caractéristiques du milieu et les facteurs internes propres au produit (Mossel *et al.*, 1995). La vitesse de multiplication des moisissures sur un substrat est également sous la dépendance de leur nature, de l'inoculum initial. Quel que soit le facteur considéré, l'espèce qui prédomine est celle qui se trouve le plus près des conditions optimales requises pour son développement (Poisson et Cahagnier, 1979).

Il est généralement admis que les moisissures, par leurs activités vitales, contribuent à la dépréciation de la valeur technologique, nutritionnelle, sanitaire (Poisson et Cahagnier, 1979, Airede et Esuruso, 1987) des aliments. Perez *et al.* (1982) ont signalé que le développement des moisissures dans les aliments est le meilleur indicateur sensible de leurs mauvaises conditions de stockage et de la détérioration de leur qualité. Chez le cacao, plusieurs facteurs favorisent le développement des moisissures.

IV.1.- Etat des cabosses

D'une façon générale, les moisissures des champs sont remplacés par les moisissures des stocks en raison des différences de l'activité de l'eau des produits. Chez le cacao, les observations faites par Renaud (1954) (Tab. 4) indiquent que le développement des moisissures est favorisé en partie par les agents responsables des maladies de la pourriture des cabosses comme la moniliose (fig. 15). De cette étude se dégagent plusieurs observations :

- le taux de fèves moisies augmente avec le degré de maturité des cabosses,
- les cabosses atteintes par les agents de pourriture présentent un pourcentage élevé de fèves moisies par rapport aux cabosses saines,
- le pourcentage de fèves moisies augmente avec la germination,
- l'endommagement des cabosses suivi d'une écabossage différé entraîne des taux élevés de fèves germées et moisies.



Figure 15. Une cabosse de cacao atteinte par les agents de la moniliose sur l'arbre.

Tableau 4. Pourcentage de fèves moisies et de fèves germées en fonction de l'état des cabosses

Etat des cabosses	Novembre 1950		Décembre 1951	
	Fèves moisies (%)	Fèves germées (%)	Fèves moisies (%)	Fèves germées (%)
Cabosses vertes	1,1	0	0,6	0,0
C. virant au jaune	4,8	0	0,5	0,0
C. normalement mûres	-	-	0,9	0,0
C. très mûres	7,6	0	1,4	0,0
C. surmûries	-	-	4,0	4,2
envahies par les saprophytes				
C. partiellement pourries	12,5	4,4	3,5	2,9
C. entièrement pourries	26,6	15,8	-	-
C. endommagées au cours de la récolte (délais d'écabossage 7 jours)	38,2	23,6		

Source : Renaud (1954)

IV.2.- Traitements post-récolte du cacao

La rapidité de l'écabossage du cacao réduit considérablement les risques de prolifération des moisissures surtout au niveau des cabosses endommagées pendant la récolte (Boussard, 1982). Les modifications des complexes enzymatiques (glucosidases, polyphénoloxydases,...) et celles de la composition biochimique des fèves au cours de la fermentation les rendent plus sensibles à la pénétration des moisissures. Après la fermentation, les fèves deviennent plus sensibles aux moisissures à cause de la diminution de leur teneur en alcool et de leur faible compacité (Renaud, 1954). La prolongation de la fermentation est considérée comme une des causes principales du développement des moisissures (Tab. 5).

Il importe donc de procéder au séchage le plus rapidement possible car plus la teneur en eau du cacao marchand est élevée, plus le développement des moisissures est rapide (Tab. 6). Chez le planteur, le cacao conservé hors-sol dans des hangars ou dans des cases avec un toit de tôles bénéficie des mêmes avantages que dans des magasins de commerce (Dharmaputra, 1999). Par contre, les petites quantités de produit qui sont entreposées à même le sol de terre battue dans les cases de torchis recouvertes de chaumes ou d'autres matières végétales sont inévitablement contaminés par les moisissures en raison de l'humidité trop importante des zones tropicales humides..

Tableau 5. Pourcentage de fèves moisies en fonction du degré de fermentation du cacao

Degré de fermentation	Fèves moisies (%)
Fèves violettes ou ardoisées	1,9
Fèves normalement fermentées	11,1
Fèves sur fermentées	30,9

Source : Renaud (1954)

Tableau 6. Pourcentage des fèves moisies en fonction de la teneur en eau du cacao pendant le stockage

Teneur en eau du cacao (%)	Pourcentage des fèves moisies (%)	
	Après 7 semaines de stockage	Après 11 semaines de stockage
5,4 à 7,9	0	0
10,5 à 11,8	0	1,2 à 10
14,8 à 15,2	5 à 5,5	14 à 15
16,4	20	40
+ de 20	100% en 3 semaines	

Source : Renaud (1954)

IV.3.- Intégrité physique des fèves, présence d'impuretés et des insectes

Certaines espèces comme *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus* et *Mucor buntingii*, ont la faculté de détruire les pentosanes ainsi que la cellulose des coques et de pénétrer dans l'amande grâce à l'action des enzymes qu'elles sécrètent. D'autres espèces utilisent la porte d'entrée fournie par la pénétration des moisissures précédentes, les blessures de la coque provoquées par les coutelas lors de l'écabossage, la formation de brisures, les dégâts d'insectes et enfin l'orifice des fèves germées (Boussard, 1982). C'est par le micropyle que commence le développement des moisissures.

Il est également connu des technologues que les impuretés constituent des foyers d'infection lorsqu'elles sont humides (Poisson *et al.*, 1981). L'attaque du cacao par les insectes, en occasionnant l'ouverture d'orifices dans l'amande de la fève (Dharmaputra *et al.*, 1999), favorise ainsi l'entrée des moisissures à l'intérieure de la fève. D'autre part, les insectes assurent le transport et la propagation des spores de moisissures dans les stocks de cacao (Boussard, 1982). Enfin, leur respiration au sein des stocks entraîne une augmentation de la teneur en humidité des produits en stock. Ceci favorise le développement des moisissures (Lacey *et al.*, 1991).

IV.4.- Conditions de stockage et de transport

Les conditions thermiques, hydriques, et la composition de l'atmosphère de stockage jouent un rôle déterminant dans le développement des moisissures (Huit in't Veld, 1996). L'interférence de ces différents facteurs rend difficile leur étude séparée et la mise en évidence de la contribution de chacun. En dépit d'une somme importante d'informations sur la biochimie et la physiologie des moisissures, leur aptitude à s'implanter et à se développer dans un écosystème donné est souvent difficile à expliquer. Les mécanismes par lesquels telle ou telle espèce prévaut dans telles ou telles conditions, comment elle survit et comment elle s'adapte sont méconnus la plupart du temps.

Au niveau du cacao marchand, la présence d'une soixantaine de champignons a été signalée à l'intérieur des fèves (Renaud, 1954). Les plus fréquents appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* communément considérés comme des moisissures de stocks (Christensen et Kaufman, 1965). Ensuite viennent des Mucorales (Guénot *et al.*, 1976) et enfin quelques genres d'Adélomycètes comme *Monilia sitophila* (Renaud, 1954). Lorsque la teneur en eau du cacao reste très élevée pendant assez longtemps, n'importe quel saprophyte pourrait s'y développer (Renaud, 1954). Les espèces les plus thermophiles peuvent apparaître

dès le début de la fermentation. Ensuite viennent des organismes les moins thermophiles. Les moisissures dont la température optimale de développement se situe entre 22 et 24°C apparaissent généralement après exportation (Boussard, 1982).

Lorsque le transport du cacao dure plusieurs jours par suite de mauvais état des routes ou des véhicules, il peut subir à ce stade d'importants dégâts si les conditions climatiques sont particulièrement défavorables (Renaud, 1954). Un séchage immédiat permet de réduire au minimum l'effet néfaste de ces facteurs.

V.- ACTION DES MOISSURES

D'une façon générale, la relation entre la nature des métabolites issus de l'activité vitale des microorganismes et la présence de ceux ci a été rarement établie (Drosinos et Board, 1994). Dans certain cas, des relations ont été mises en évidence entre le développement des moisissures et certains types de dégradations (Poisson *et al.*, 1979). Dans le cas du cacao, la seule présence des moisissures constitue un défaut de qualité (Renaud, 1954). Mais peu d'études se sont intéressées à l'action réelle de ces microorganismes sur la qualité du produit. Ces études ont mis en évidence la présence de plusieurs espèces de moisissures comme *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp*, *Mucor spp*, *Rhizopus nigrans*,... (Hansen, 1975 ; Niles, 1981). Ces moisissures peuvent sécréter une grande variété d'exoenzymes comme les carbohydrases (Marin *et al.*, 1998), les protéases et les lipases (Bigelis, 1992) dont l'action sur les triglycérides peut se poursuivre même après destruction du mycélium (Jacobsberg, 1977). Les lipases et les lipoxydases mycéliennes de nombreux champignons comme les *Penicillium*, les *Aspergillus* sont à l'origine de l'hydrolyse des triglycérides de certains produits oléagineux stockés (De Lucca et Ory, 1987). Les résultats de la sécrétion d'enzymes extracellulaires dépendent du substrat en présence et sont néfastes pour la qualité des produits. Chez les céréales par exemple, le développement des moisissures s'accompagne d'une modification d'aspects, d'odeurs, de goûts et de la composition en glucides alcool-solubles (Lacey *et al.*, 1991).

VI.- LE BEURRE DE CACAO

VI.1.- Définitions

Sur le plan économique, le beurre de cacao est le composant le plus précieux et le plus cher des fèves de cacao (Fowler, 1999). Il coûte 1,5 à 2 fois plus cher que les autres produits dérivés du cacao telles que la liqueur et les poudres de cacao. Il contribue à hauteur de 25 à 36% dans la formulation du chocolat (Dimick, 1991). C'est l'unique phase continue responsable de la dispersion de tous les constituants et de la rhéologie ultérieure du produit (Fowler, 1999). De ce fait, ses caractéristiques physico-chimiques influent fortement sur la qualité du chocolat (Chin et Nurshwan, 1986). La dureté du beurre de cacao et sa fusion complète à la température de la bouche font de cette matière grasse un produit unique et indispensable dans l'industrie chocolatière (Lipp et Anklam, 1998). Le beurre de cacao est la principale matière grasse végétale utilisée dans les industries du chocolat et de confiseries (Nikless, 1996). Selon Pontillon (1998), on devrait dire "les beurres de cacao". En effet, d'après le législateur, les formes et les dénominations du beurre de cacao dépendent :

- ▶ Des matières de cacao utilisées pour son obtention ;
- ▶ Du mode d'extraction ;
- ▶ De certaines caractéristiques liées aux traitements subis après extraction.

VI.2.- Les propriétés physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques du beurre de cacao déterminent la qualité finale des produits dérivés du cacao et particulièrement du chocolat (Chin et Nurshwan, 1986). Ces propriétés particulièrement recherchées font du beurre de cacao un produit répandu et incontournable dans plusieurs domaines tels que la chocolaterie, les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Pontillon, 1998).

VI.2.1.- Propriétés physiques

La plupart des analyses des propriétés physiques du beurre de cacao portent sur les caractéristiques de tempérage, sa stabilité à température ambiante et pendant la consommation du chocolat (Nikless, 1996). Ce changement d'état d'abord pendant l'utilisation (moulage, enrobage) et ensuite pendant la consommation (fusion dans la bouche) permet à Pontillon (1998) d'affirmer que le beurre de cacao est la partie vivante du chocolat.

VI.2.1.1.- La dureté

Empiriquement, la dureté se définit comme étant la résistance à la pénétration. Elle est déterminée au moyen d'un pénétromètre. Elle dépend de la teneur respective en acides gras constitutifs saturés et insaturés des triglycérides et de celle en AGL du beurre de cacao (Boussard, 1982). Une concentration élevée en acides gras saturés et une faible teneur en acides gras insaturés en sont des indicateurs (Lipp et Anklam, 1998). Les propriétés et les interactions des acides gras constitutifs des triglycérides influent également sur la dureté du beurre de cacao (Nickless, 1996). Pour l'industriel, le critère de dureté correspond à la satisfaction du consommateur qui veut que le chocolat soit cassant et rapidement fondant en bouche (Nickless, 1996). Les chocolatiers préfèrent un beurre de dureté élevée car les propriétés de conservation, de manutention et de dégustation du chocolat en dépendent. Selon leur origine, tous les beurres de cacao n'ont pas la même dureté. Chin et Nurshiwani (1986) ont rapporté par exemple que les beurres de cacao malaisien et indonésien sont plus durs que les beurres de cacao des autres pays comme le Ghana et le Nigeria.

VI.2.1.2.- Le point de fusion

Il est lié à la dureté et donne des indications sur la pureté et les caractéristiques de tempérage du beurre de cacao (Selamat *et al.*, 1996). Le point de fusion du beurre de cacao tempéré s'étend sur une zone de température comprise entre 31,2 et 32,7°C (Pontillon, 1998). C'est pourquoi Martin (1987) parle de plage de fusion. Cette plage de fusion serait influencée aussi bien par la position des acides gras constitutifs dans les triglycérides que leur degré de saturation. La conséquence majeure de l'augmentation de la teneur en AGL est la diminution du point de fusion (Boussard, 1982).

VI.2.1.3.- La cristallisation

Les conditions d'apparition et le degré de cristallisation du beurre de cacao sont d'une importance capitale pour le chocolatier car ils affectent le tempérage et la solidification du chocolat (Nickless, 1996). Le polymorphisme désignant les différentes formes cristallines du beurre de cacao est affecté par une forte teneur en AGL et un traitement alcalin excessif (Nickless, 1996 ; Pontillon, 1998). Un beurre de cacao de bonne qualité est un beurre qui contient une teneur élevée en acides gras saturés (POP, POS, SOS) ou qui présente de bonnes propriétés de cristallisation.

VI. 2.2.- Propriétés chimiques

Afin de comprendre l'impact de nombreux paramètres sur la qualité du beurre de cacao, il est nécessaire de connaître la chimie de cette matière grasse.

VI.2.2.1.- Composition chimique

Comme toutes les matières grasses, le beurre de cacao est composé principalement de triglycérides et d'autres composés mineurs comme les di- et mono-glycérides, les AGL, les tocophérols, les phospholipides et les impuretés (Tab. 7). Les fèves de cacao sain n'ayant subi aucune altération produisent du beurre à faible acidité oléique (0,2-1,20%) et une teneur en diglycérides également faible, de l'ordre de 1,0% quel que soit le mode d'extraction (Pontillon, 1998).

Tableau 7. Composition chimique moyenne du beurre de cacao en pourcentage.

Glycérides et leurs constituants	Triglycérides	96,6%	
	Di-Glycérides	1,0%	
	Mono glycérides	Traces	
	Acides gras libres	1,2%	Maximum légal : 1,75% exprimé en acide oléique
Impuretés	Glycérol	Traces	
	Eau	< 0,05%	
	Matières solides	0,1%	Fines particules solides de cacao
Composants mineurs	Phospholipides	0,3%	
	Glycolipides	0,3%	
	Insaponifiables	0,5%	

Source : (Pontillon, 1998)

VI.2.2.2.- La composition des acides gras constitutifs du beurre de cacao

Les acides gras sont des acides carboxyliques à longue chaîne carbonée. Leurs teneurs pour le beurre de cacao indiquées dans la littérature ne se recourent pas toujours (Pontillon, 1998). Cependant, il est évident que les acides gras majeurs du beurre de cacao sont :

- ▶ L'acide palmitique (C16 :0)
- ▶ L'acide stéarique (C18 :0)
- ▶ L'acide oléique (C18 :1)
- ▶ L'acide linoléique (C18 :2)

Des études ont montré que les conditions climatiques qui prévalent pendant la maturation des fèves de cacao (Chin et Nurshiwani, 1986), l'origine géographique (Lipp et Anklam, 1998) et le "génotype" du cacaoyer (Nickless, 1996) peuvent affecter la teneur en différents acides gras constitutifs du beurre de cacao (Tab. 8). En effet, le cacao en provenance des régions chaudes avec une forte pluviométrie donne du beurre plus ferme par rapport au cacao des régions moins chaudes avec une faible pluviométrie (Lipp et Anklam, 1998). Ainsi, le beurre de cacao des pays africains (Côte d'Ivoire, Ghana) contient une plus faible teneur en acide oléique que celui des pays de l'Amérique du Sud (Equateur, Brésil). Celui des pays de l'Asie du Sud Est (Malaisie, Java) est intermédiaire.

Tableau 8. Composition en % massique des acides gras du beurre de cacao en fonction des pays de production

<i>Pays d'origine</i> <i>Acides</i>	Equateur	Brésil	Ghana	Côte d'Ivoire	Malaisie	Java
Palmitique (C16:0)	25,6	25,1	25,3	25,8	24,9	24,1
Stéarique (C18:0)	36,0	33,3	37,6	36,9	37,4	37,3
Oléique (C18:1)	34,6	36,5	32,7	32,9	33,5	34,3
Linoléique (C18:2)	2,6	3,5	2,8	2,8	2,6	2,7
Linoléinique (C18:3)	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Arachidique (C20:0)	1,0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Béhénique (C22:0)	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Source : Lipp et Anklam (1998)

VI.2.2.3.- Composition en triglycérides

Les triglycérides sont des esters issus de la combinaison entre 3 molécules d'acides gras et 1 molécule de glycérol (Lipp et Anklam, 1998). Ce sont les principaux composés du beurre de cacao où les acides gras en positions 1 et 3 sont généralement des acides gras saturés et celui en position centrale est insaturé (Nickless, 1996). La composition des triglycérides du beurre de cacao varie en fonction des régions de production (Tab. 9). Les

triglycérides du beurre de cacao sont majoritairement constitués de trois acides gras : l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique. Le profil triglycérique du beurre en fonction de l'origine est homogène à l'exception du beurre de cacao brésilien. Ce beurre est particulièrement riche en triglycérides di-insaturés (SOO, POO, POL, SOL).

Tableau 9. Composition en % massique des triglycérides constitutifs du beurre de cacao en fonction des régions de production

Pays d'origine	Samoa	Côte d'Ivoire	Equateur	Malaisie	Ghana	Nigeria	Brésil
POL	0,8	0,6	0,7	0,6	0,6	0,8	1,1
MOO,MMP	0,3	0,2	0,3	0,5	0,2	0,2	0,2
PPL	1,6	1,9	1,9	1,5	1,9	1,9	1,7
OOO	0,2	0,8	0,8	0,8	0,7	0,4	0,9
SOL	0,5	0,9	0,8	0,7	0,4	0,8	1,0
POO	2,2	4,4	3,5	2,7	2,6	3,2	5,5
PSL	2,8	3,6	2,8	2,8	3,2	3,4	3,4
POP	16,4	15,9	15,3	13,8	15,2	14,8	14,0
SOO, PPP	3,7	6,0	4,8	3,8	4,5	5,1	8,4
SSL	2,1	1,8	1,5	2,0	2,1	1,9	2,1
PSO	38,3	36,6	36,3	36,6	37,3	37,4	34,6
OOA	1,6	1,0	1,2	1,6	1,4	1,2	1,5
PPS	0,4	0,4	0,3	0,6	-	0,7	0,3
SOS	26,8	23,8	26,9	28,4	26,8	26,4	23,7
SSP	0,7	0,8	0,9	1,0	1,3	0,4	0,2
SOA	2,2	1,6	2,1	2,5	2,2	1,9	1,6

M=Acide myristique, P= palmitique, S=stéarique, O=oléique, L=linoléique, A=arachidique

Source : Podlaha *et al.* (1984)

VI.3.- Acidité du beurre de cacao : aspects réglementaires

Les AGL sont des acides carboxyliques libres qui sont libérés à partir de glycérides soit par une réaction d'oxydation qui conduit à des AGL courts, soit par l'action d'une lipase avec formation d'AGL à longues chaînes carbonées. La teneur en AGL naturelle du beurre de cacao est faible et n'augmenterait pas tant qu'il n'est pas humide ou contaminé par les microorganismes (Selamat *et al.*, 1996). L'acidification qui en résulte affecte la qualité physico-chimique du beurre en le ramollissant et en induisant des modifications de goûts (Pontillon, 1998). Le raffinage d'un beurre avec une forte teneur en AGL entraîne des pertes

de matières en raison de l'élimination de ces AGL et de l'entraînement des triglycérides. Classiquement la teneur en AGL des fèves marchandes de bonne qualité varie de 0,8 à 1,5% (Fowler, 1999). Cette teneur est réglementée dans de nombreux pays ; l'Union Européenne impose une teneur maximale de 1,75% (Pontillon, 1998). L'acidité du beurre de cacao est exprimée selon différents modes :

► **L'acidité oléique** : C'est la forme d'expression la plus employée. Elle exprime le pourcentage en masse des constituants acides dosés (Pontillon, 1998). Elle est mesurée sur au moins 5 g de beurre dissous dans un mélange d'éthanol et d'éther éthylique (50/50 ; v/v) préalablement neutralisé en présence de la phénol phtaléine par une solution alcoolique de soude ou de potasse à 0,1N. La masse est déterminée en équivalents d'acide oléique.

► **L'indice d'acide** : Il fait partie de la série des divers indices (d'iode, de saponification, de peroxydes...). Il se définit comme la quantité en mg de KOH nécessaire pour neutraliser 1 g de matière grasse.

VI.4.- Différentes qualités de beurre de cacao

VI.4.1.- Le beurre de cacao de pure pression

Ce beurre est obtenu par pression de la partie noble de la fève à savoir le grain décortiqué. Les seules caractéristiques légales sont la teneur en insaponifiables (stérols, alcools terpéniques, tocophérols) inférieure à 0,35% et l'acidité oléique inférieure à 1,75%.

VI.4.2.- Le beurre de cacao d'expeller

Les fèves traitées à l'expeller sont des fèves de fermentation défectueuse ou des fèves de petites tailles posant des problèmes de décorticage. Le procédé d'extraction est le passage en presse à vis en continu des fèves de cacao entières ou éventuellement mélangées avec les matières nobles énumérées pour le beurre de cacao de pure pression. Le tourteau qui en dérive est très dévalorisé. Le maximum de 1,75% d'acidité oléique s'applique aussi au beurre d'expeller sans raffinage alcalin. Cependant sa teneur en insaponifiables est plus forte (jusqu'à 0,50%) car la coque en est particulièrement riche (Pontillon, 1998). Ce type de beurre présente aussi une faible résistance à la fusion parce que riche en acide linoléique (Timms and Stewart, 1999).

VI.4.3.- Le beurre de cacao raffiné

Les procédés d'obtention sont les mêmes que ceux décrits ci dessus (les pressions discontinues ou à vis). Afin de satisfaire aux normes, la directive européenne autorise des traitements classiques des huileries tels que les traitements de démulcination, de neutralisation alcaline, de décoloration et de désodorisation à vapeur sous vide (Pontillon, 1998).

VI.4.4.- Les graisses de cacao

Toute matière grasse obtenue à partir de fèves de cacao ou de parties de fèves de cacao et qui pour une raison ou pour une autre ne correspond pas à l'une des définitions ci dessus est considérée comme graisse de cacao (Pontillon, 1998).

VI.5.- Les traitements d'amélioration de la qualité du beurre de cacao

En industrie, deux traitements, l'un chimique et l'autre physique, sont utilisés pour abaisser la teneur en AGL et normaliser la qualité du beurre de cacao (Nickless, 1996). Le traitement chimique (la saponification des AGL) est effectué par un lavage avec une solution alcaline. Les savons obtenus sont éliminés par centrifugation, lavage et séchage. La désodorisation physique vise à éliminer les odeurs indésirables et à stériliser en même temps le beurre de cacao (Timms and Stewart, 1999). Ce traitement utilise la distillation sous vapeur à une température comprise entre 130 et 180°C pendant des courtes durées (Nickless, 1996). Une température plus élevée peut entraîner un réarrangement des acides avec une réduction de certains triglycérides comme les SOS.

VII.- LES LIPASES : CINETIQUES ET SPECIFICITES

VII.1.- Introduction et définitions

Les substances biologiques sont classées en quatre groupes principaux : les glucides, les protéines, les acides nucléiques et les lipides. Contrairement aux autres, la définition des lipides est ambiguë. Elle est basée sur une propriété physico-chimique commune. Les lipides constituent un groupe de molécules organiques structurellement hétérogène qui ont la propriété d'être relativement insolubles en milieux aqueux mais solubles dans les solvants apolaires comme l'hexane ou peu polaires comme l'éther, le chloroforme ou le benzène

(Egloff *et al.*, 1995). Small (1968) a classé les lipides en deux groupes basés sur leur comportement dans l'eau : les lipides polaires et les lipides non polaires. Les lipides polaires sont subdivisées en différentes classes :

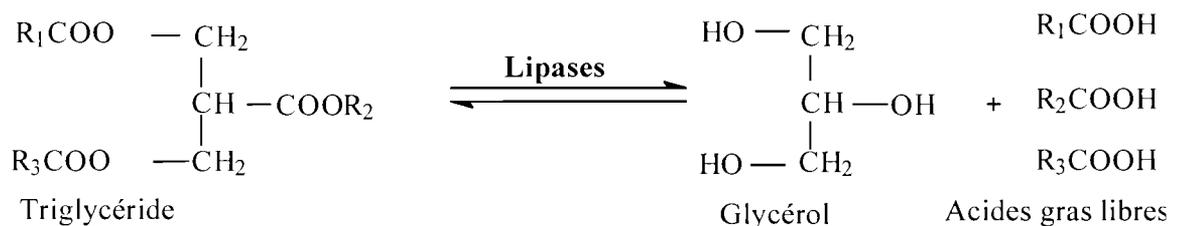
- **Classe I** : Ces lipides ne présentent pas le phénomène de gonflement et forment des films monomoléculaires stables comme les tri- et les di-glycérides, les rétinols et les vitamines A, K et E, les phytols, les stérols et les cires.

- **Classe II** : les lipides s'étalent aussi sur l'eau mais s'hydratent et gonflent comme les mono-glycérides et phospholipides

- **Classe III** : les lipides partiellement solubles dans l'eau et formant des films monocouches instables. C'est le cas des détergents et des savons ainsi que des solutions micellaires au-delà de leur concentration micellaire critique.

VII.2.-Les lipases

Les lipases sont des enzymes lipolytiques qui font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques et qui ont pour classification internationale : glycérol ester hydrolase (E.C.3.1.1.3) (Egloff *et al.*,1995). Ce sont des catalyseurs qui, à l'intérieur d'un organisme, participent au dépôt et à la mobilisation des lipides ainsi qu'au métabolisme des membranes biologiques. D'origines (bactéries, champignons, plantes, mammifères,..) et de propriétés diverses, elles ont une grande spécificité pour les matières grasses et catalysent principalement l'hydrolyse des triglycérides (Rajeshwara et Prapakash, 1995) selon la réaction suivante :



VII.2.1.- Spécificité des lipases

La définition de la spécificité pour un substrat est difficile car de nombreux paramètres liés aux propriétés de l'interface eau/lipides influencent le mode d'action de la lipase (Jensen *et al.*, 1990). La spécificité des lipases par rapport aux triglycérides peut être subdivisée en trois catégories :

- **La typosélectivité** : c'est l'activité lipasique par rapport à un acide gras donné
- **La régiosélectivité** : c'est une plus grande affinité de la lipase pour l'une des liaisons esters carboxyliques primaires (positions sn-1 et sn-3) par rapport à l'ester secondaire.
- **La stéréosélectivité** : c'est la spécificité de la lipase de discriminer entre deux énantiomères d'un substrat racémique.

VII.2.2.- Activation/inhibition des lipases

La mise au point et l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action des lipases (Patkar et Björkling, 1994). Ces composés permettent d'avoir des informations sur la topographie du site enzymatique ainsi que sur les interactions moléculaires enzyme-substrat. L'inhibition des lipases a été étudiée soit avec divers composés amphiphiles qui modifient la tension interfaciale lipide/eau, soit avec des réactifs chimiques qui réagissent de manière covalente avec différents résidus de la lipase (Raghavendra et Prakash, 2002).

VII.3.- Les méthodes de dosage de l'activité des lipases

Plusieurs méthodes permettant de mesurer l'activité ont été développées. Ce qui explique qu'aucune d'entre elles ne soit complètement satisfaisante et qu'il n'existe pas de méthode universelle pour le dosage de l'activité des lipases. La plupart des dosages de cette activité lipasique reposent sur trois méthodes : soit la disparition du substrat, soit la formation d'un acide carboxylique ou d'un alcool, les deux produits résultant de l'hydrolyse du substrat (Egloff *et al.*, 1995).

VII.3.1.- Disparition du substrat

Encore appelée la technique des films mono moléculaires (Verger, 1980), cette méthode permet de moduler et de contrôler la tension inter faciale en absence des détergents. De ce fait, les propriétés physico-chimiques de l'interface sont définies et maîtrisées. Il y a aussi la méthode de la goutte d'huile. Ces deux méthodes permettent d'obtenir des cinétiques

d'hydrolyse à tension inter faciale constante. Cependant, elles ne permettent pas de connaître la quantité d'enzyme effectivement en action à l'interface (Egloff *et al.*, 1995).

VII.3.2.- Apparition d'acides carboxyliques

L'une des méthodes les plus simples utilisée pour le dosage de la quantité d'acides carboxyliques formés est la mesure de la diminution du pH au cours du temps en présence d'un indicateur coloré approprié (rouge de méthyl, rouge de phénol rhodamine B) (Jette et Ziomek, 1994). La variante de cette technique est la méthode du pH-stat qui consiste à maintenir le pH constant pendant l'addition continue d'une solution basique. La formation des AGL peut aussi être révélée en les complexant avec la rhodamine 6G (Van Autryve *et al.*, 1991) ou des sels cuivriques (Safarik, 1991).

VII.3.3.- Formation d'alcool

L'hydrolyse totale des triglycérides libère du glycérol. Celui-ci peut être détecté par des réactions enzymatiques séquentielles (glycérol kinase, glycérol phosphate oxydase et peroxydase) (Fossati *et al.*, 1992) ou par chromatographie liquide haute performance.

VII.4.- Les lipases végétales

VII.4.1.- La physiologie des lipases des plantes oléagineuses

De nombreuses études sur les lipases végétales ont montré que leur activité n'est décelable que pendant la phase germinative de la plante (Jachmanian *et al.*, 1995) à l'exception de certaines plantes oléagineuses comme le ricin (Ory *et al.*, 1962), la nigelle (Mert *et al.*, 1995) et la noix de Barbode (Abigor *et al.*, 2002). Ces dernières contiennent des lipases aussi bien à l'état dormant qu'à l'état germinatif. La mobilisation des réserves lipidiques est essentielle pour la production d'énergie nécessaire à la croissance de l'embryon et à l'entretien de la jeune plante (Huang *et al.*, 1988). Les lipases végétales catalysent à la fois les réactions d'hydrolyse et d'estérifications (Mert *et al.*, 1995). En plus de la germination, la formation de brisures et l'endommagement des tissus cellulaires des graines oléagineuses entraînent une augmentation de l'activité des lipases végétales (Huang *et al.*, 1988). Ceci montre que la lipase et les lipides de réserves sont stockés dans des compartiments cellulaires ou tissulaires distincts sinon les plantes concernées ne seraient pas viables (Alibert *et al.*, 2001).

VII.4.2.- La spécificité des lipases végétales

Les lipases végétales ont une plus grande spécificité pour les matières grasses natives et pour les substrats contenant en grande partie les principaux acides gras natifs des plantes dont elles sont issues (Tab. 10). La lipase du maïs par exemple a une meilleure activité sur les triglycérides qui contiennent une part importante d'acide linoléique qui est un acide gras majeur de l'huile de maïs. Rappelons que la spécificité pour le substrat ne se limite pas seulement à la nature des acides gras, elle dépend aussi de la qualité des émulsions c'est à dire de la solubilité du substrat, de la qualité de l'interface lipide / eau (Huang *et al.*, 1988 ; Egloff *et al.*, 1998).

Tableau 10. Hydrolyse de divers triglycérides par des lipases végétales de différentes sources

Substrats	Source de lipase				
	Ricin	Maïs	Colza	Orme	Moutarde
	Activité relative (nmol/heure) ^a				
Tricaprine	43	127	89	→100	-
Trilaurine	60	0	31	4	-
Trimyristine	26	0	92	3	-
Tripalmitine	46	0	27	0	39
Tristéarine	62	0	36	0	40
Trioléine	55	38	44	4	96
Trilinoléine	57	→100	89	6	89
Tricinoléine	→100	0	83	0	-
Tribehenine	-	0	16	0	-
Triérucine	36	45	→100	0	→100

^a Activité lipasique relative (%)/100 représente 96 nmol/h pour le ricin, 145 pour le maïs, 32 pour le colza, 143 pour l'orme, 28 nmol/h pour la moutarde

Source : (Lin et Huang, 1986)

VII.5.- Les lipases de moisissures

VII.5.1.- Etudes antérieures

La biosynthèse de la lipase intracellulaire de plusieurs espèces de *Rhizopus* a été étudiée : *Rhizopus niveus* (Khono *et al.*, 1994), *Rhizopus arrhizus* (Gancet et Guignard, 1986), *Rhizopus javanicus* (Uyttenbroeck *et al.*, 1993), *Rhizopus oryzae* (Salleh, 1993 ; Essamri *et al.*, 1998); et la lipase extracellulaire de *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al.*, 2000). Celle de l'activité lipasique du *Rhizopus oryzae* a été étudiée sous différentes conditions. Elle est influencée par la composition du milieu de culture et la température (Salleh *et al.*, 1993 ; Fadiloglu et Erkmén, 1999). Il a été démontré que les substrats glucidiques favoriseraient plus la production de lipase extracellulaire et que la lipase intracellulaire serait produite en présence de substrats lipidiques (Salleh *et al.*, 1993). Plusieurs études ont rapporté que la peptone est la meilleure source d'azote pour la production de lipases par les champignons (Tsujisaka *et al.*, 1973, Nakashima *et al.*, 1988). La température d'incubation du milieu de culture affecte également la production de la lipase : la lipase extracellulaire est obtenue à 45°C alors que la lipase intracellulaire est produite à 37°C (Salleh *et al.*, 1993). La plupart de ces études visent à comprendre la relation entre la structure et les fonctions des lipases en vue de leur utilisation en industrie. D'autres études ont porté sur leur rôle dans la dépréciation de la qualité et/ou dans la modification des caractères organoleptiques des aliments particulièrement dans l'industrie laitière (Stead, 1986). Plusieurs moisissures lipolytiques ont été fréquemment et abondamment rencontrées dans le cacao marchand notamment les Mucorales. Si la formation des AGL est attribuée essentiellement aux moisissures (Hansen, 1975 ; Guénot *et al.*, 1976), aucune étude ne s'est encore vraiment intéressée à l'isolement et à la caractérisation des enzymes lipolytiques de ces moisissures en vue de déterminer le niveau réel de leur implication dans ce processus. Certaines études ont montré l'implication des lipases de *Mucor hiemalis* et *R. oryzae* dans l'acidification de matières grasses comme l'huile de palme (Hiol, 1999 ; Hiol *et al.*, 2000) et le beurre de karité (Jacobsberg, 1977).

VII.5.2.- Propriétés biochimiques

Les propriétés physico-chimiques et les spécificités d'action des lipases microbiennes montrent en général qu'il s'agit d'une famille d'enzymes très hétérogène. Cette diversité, loin d'être un inconvénient, constitue un atout majeur d'utilisation de ces molécules en biotechnologie (Hiol *et al.*, 2000). La plupart des études sur les activités lipasiques de moisissures portent essentiellement sur l'optimisation de leur production en vue de leur application industrielle (Salleh *et al.*, 1993). Les lipases extracellulaires produites sont

facilement séparées du mycélium par filtration ou par centrifugation (Iwai et Tsujisaka, 1984). Les conditions de production des lipases d'origine fongique sont variables. Selon Nakashima *et al.* (1988), la présence de plusieurs substrats à la fois améliore la production de lipases. La majorité des substrats lipidiques comme l'huile d'olive, la trioléine et l'acide oléique favorisent la production de lipases intracellulaires chez *Rhizopus oryzae* (Saleh *et al.*, 1993). Qu'elle soit extra ou intracellulaire, l'activité lipasique obtenue est optimale au bout d'un certain temps puis diminue au cours de la croissance de la biomasse (Essamri *et al.*, 1998).

MATERIELS ET METHODES

I.- MATERIEL VEGETAL

I.1.- La mise évidence et la détermination des conditions de fonctionnement de l'activité lipasique à partir du cacao

Un lot de fèves entières de cacao marchand et un lot de brisures naturelles (source exportateur – Abidjan) prélevés en octobre 1999 ont été utilisés. Il n'a pas été possible d'obtenir de renseignement ni sur le "génotype" ni sur les conditions de traitements post-récolte de ces cacaos d'où sont issus ces lots.

I.2.- La recherche d'activité lipasique à partir des fèves fraîches

Des cabosses de cacao (descendances libres) ont été récoltées dans une plantation privée en Côte d'Ivoire en octobre 1999. Les fèves fraîches extraites de ces cabosses ont servi pour l'étude d'activité lipasique à partir du cacao frais non fermenté.

I.3.- L'étude de l'influence des traitements post-récolte sur l'activité lipasique et la teneur en AGL du cacao

I.3.1.- Conditions de fermentation et de séchage du cacao

Le cacao analysé a été récolté dans une plantation privée dans la région de Soubré (Côte d'Ivoire) par un chercheur du Cirad au cours de la grande campagne cacaoyère en début (novembre 2000) et en fin (janvier 2001). Seule la couleur des cabosses a été utilisée comme le critère de maturité. Vingt cinq cabosses de chacun des protocoles décrits ci dessous ont été récoltées puis ouvertes. Les fèves ont été fermentées selon la technique de microfermentation dans une caisse en bois de 65x50x50 cm avec deux retournes à 48 et 96 heures. Tous les cacaos ont été séchés au soleil sur des bâches plastiques noires pendant une semaine jusqu'à une teneur en eau d'environ 8% avant d'être expédiés par avion à Montpellier.

I.3.2.- "Génotype"

Des fèves issues de cabosses matures d'Amélonado, d'hybrides de 1^{ère} génération de Côte d'Ivoire (Amélonado x Trinitario ouest africain) et de descendances libres ont été utilisées pour cette étude.

I.3.3.- Degré de maturité des cabosses à la cueillette

L'influence du degré de maturité des fruits a été étudiée sur des fèves issues des cabosses immatures, mures et surmures d'hybrides de 1^{ère} génération de Côte d'Ivoire. Après 5 jours de stockage en tas des cabosses, les fèves ont été extraites, fermentées puis séchées.

I.3.4.- Délai d'écabossage

Des cabosses mures d'hybrides de 1^{ère} génération récoltées le même jour ont été séparées en trois lots sur la plantation. Le lot n°1 a été écabossé le jour de la récolte (J₀), le lot n°2 et le lot n°3 respectivement au bout de 5 et 9 jours de stockage sur la plantation. Les fèves issues de ces traitements ont été fermentées et séchées.

I.3.5.- Durée de fermentation

L'influence de la durée de fermentation a été étudiée sur des fèves extraites des cabosses mures de descendances libres puis fermentées sur la plantation. Des prélèvements de fèves ont été effectués au cœur de la caisse chaque jour pendant toute la durée de fermentation puis les fèves ont été séchées.

I.3.6.- Durée de stockage

Tous les échantillons ont été stockés dans une armoire climatique (Firlabo, type SB-BVEHF) dont la température et l'humidité relative ont été respectivement fixées à 30 °C et HR 80% pendant le premier mois par simulation des conditions thermiques et hydriques moyennes porches de celles des zones de production en Côte d'Ivoire. Un développement massif de moisissures inféodées au cacao nous a amené à réduire la température à 27°C et le taux d'humidité relative à 75%. Des prélèvements de 35 à 40 g de fèves de chaque échantillon ont été effectués chaque mois pendant les trois premiers mois de stockage puis tous les deux mois. La teneur en AGL et l'activité lipasique ont été conjointement mesurées à partir de la poudre de fèves décortiquées.

I.3.7.- Décontamination des fèves

Dans cette étude, deux solutions de décontamination à différentes concentrations ont été utilisées : une solution d'hypochlorite de sodium et une solution de peroxyde d'hydrogène. Environ 600 g de fèves noires prélevées à partir d'un exportateur à Abidjan ont été grossièrement brisées puis fractionnées en deux parts de 300 g chacune :

- 300 g de brisures ont été décontaminés par trempage dans une solution de peroxyde d'hydrogène (Sigma) puis fractionnés en 8 parts égales dans des flacons stériles hermétiquement fermés avant d'être conservés en atmosphère confinée à 27°C/HR 75%.
- 300 g de brisures non traitées ayant été placées dans des flacons (30-40g/flacon) puis stockées dans les mêmes conditions que précédemment ont servi de contrôle.

1.3.9.- L'étude de l'évolution de la teneur en AGL en fonction de la qualité des fèves, de la formation artificielle des brisures durant le stockage

Quatre lots (600 g) de fèves de différentes qualités (fèves saines, collées, noires et brisures naturelles) ont été fractionnés en deux échantillons de 300 g chacun. Les fèves d'une fraction ont été grossièrement brisées et l'autre fraction conservée telle quelle. Tous les échantillons ont été stockés dans l'armoire climatique à 27°C, sous une humidité relative de 75% pendant 3 mois. Des prélèvements de 35 à 40 g ont été effectués toutes les deux semaines et la mesure de la teneur en AGL a été réalisée.

1.4.- Influence de la méthode d'échantillonnage sur la mesure de la teneur en AGL du cacao

Cette étude a été réalisée à partir d'un lot de 1 kg fèves noires considérée comme contenant une teneur en AGL supérieure à 1,75% selon les mesures effectuées à l'usine d'un traitant privé. Ce lot de cacao a été aléatoirement fractionné en deux parts égales de 500 g chacune.

Toutes les fèves de la première part ont été entièrement (cotylédons + coques) réduites en poudre tamisées (500 µm). Huit échantillons de 10 à 11 g de poudre ont été prélevés après homogénéisation du broyat obtenu.. Le beurre de cacao a été extrait au Soxhlet et la teneur en AGL mesurée par la méthode acido-basique.

Les fèves de la seconde part (535 fèves) ont été alignées dans un quadrillage de 25 colonnes x 22 lignes. Un échantillonnage aléatoire a été réalisé par tirage de fèves par l'utilisation de la table des nombres aléatoires. A partir de cette randomisation, 8 échantillons de 10 fèves chacun, 6 échantillons de 15 fèves et 6 de 20 fèves ont été constitués. Les fèves de chacun des échantillons prélevés ont été entièrement réduites en poudre puis la mesure de la teneur en AGL a été réalisée.

I.5.- Influence des conditions de stockage sur la formation des AGL des brisures de cacao

Des brisures artificielles obtenues à partir d'un lot de fèves noires ont été réparties en deux parts égales de 300 g. Les brisures de la première part ont été réparties dans 8 flacons (35 à 40 g de brisures par flacon) hermétiquement fermés puis stockés ainsi à 27°C sous une humidité relative de 75%. Les brisures de la seconde fraction ont été étalées sur un plateau et stockées directement à 27°C sous une humidité relative de 75%. Des prélèvements de 35 à 40 g de brisures ont été réalisés toutes les deux semaines puis la mesure de la teneur en AGL a été effectuée.

I.6. - Influence de la formation artificielle de brisures de fèves sur la formation des AGL du cacao.- Etude quantitative et qualitative de la microflore du cacao

Cette étude a porté sur 16 lots de fèves de différentes qualités (fèves saines, noires, collées, brisures de naturelles) prélevés en fonction de leur teneur en AGL dans trois régions productrices de Côte d'Ivoire (Aboisso, Hiré et Vavoua). Chaque lot de fèves entières a été fractionné en deux échantillons. Les fèves du premier échantillon ont été grossièrement brisées et les fèves du second échantillon ont été conservées intactes. Tous les échantillons ont été emballés dans des sacs en plastiques puis transférés par avion à Montpellier. Le cacao a été ensuite stocké dans une armoire climatique à 27°C sous une humidité relative de 75% pendant 3 mois. Le dénombrement de la flore totale et la mesure de la teneur en AGL des échantillons ont été conjointement effectués chaque mois à partir de prélèvements de 35 à 40 g de fèves.

II.- METHODES ANALYTIQUES

II.1.- Mesure de l'activité lipasique du cacao

II.1.1.- Principe

Une hydrolyse complète d'un triglycéride produit une molécule de glycérol et trois molécules d'AGL. Pour la détermination de l'activité lipasique à partir du cacao, une émulsion à base d'un substrat lipidique riche en triglycérides a été préparée dans une solution de gomme arabique à 10%. Après action enzymatique sur les triglycérides à 40°C pendant un temps défini, les acides gras libérés sont protonnés par ajout d'un mélange acétone anhydre /

éthanol absolu / acide sulfurique à 95-97% (Merck) (50/50/0,1, v/v/v/) qui a constitué la solution d'arrêt de la réaction enzymatique (solution "STOP"). La différence entre la quantité d'AGL du mélange réactionnel incubé et celle du flacon témoin correspond à la quantité d'AGL formés sous l'action lipasique. L'unité enzymatique a été définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour la formation de 1 nmol d'AGL par min et par mg de poudre de cacao ou 1 μ mol par min et par ml d'extrait enzymatique de cacao.

II.1.2.- Protocole

II.1.2.1.- Broyage du cacao

Les fèves de cacao frais et les fèves de cacao marchand ont été décortiquées à l'aide d'un scalpel. Les cotylédons ont été congelés puis broyés dans de l'azote liquide (Henderson et Osborne, 1991) dans un bol mixer de type Waring Blendor. Le broyat a été tamisé à travers un tamis de mailles 500 μ m. La poudre de cacao obtenue a été utilisée pour la préparation de l'extrait enzymatique.

II.1.2.2.- Préparation de la poudre de cacao acétonique

Il a été constaté que les conditions expérimentales utilisées ne permettent pas de doser l'activité lipasique mise en évidence à partir de la poudre de cacao non dégraissée. Cette observation a conduit à la délipidation de la poudre de cacao avant le dosage de l'activité lipasique. Une autre raison de cette élimination partielle des lipides endogènes du cacao est d'éviter le contact entre l'enzyme et son substrat naturel afin de mieux maîtriser la quantité de substrat présente dans le milieu réactionnel.

A cette fin, 25 ml d'hexane (Prolabo Normapur) ont été ajoutés à 5 g de poudre de cacao à température ambiante. L'ensemble a été laissé sous agitation magnétique pendant 20 min. L'hexane a été éliminé et la poudre reprise dans 2x20 ml d'acétone anhydre (Prolabo Normapur) (Hansen *et al.*, 1998 ; Hassanien et Mukerjee, 1986). Ce traitement à l'acétone a pour effet de dégraisser encore la poudre de cacao et d'en éliminer partiellement les polyphénols. La poudre de cacao acétonique de couleur blanchâtre et exempte d'acétone obtenue a été séchée à l'air libre pendant 20 min puis à 40-60°C pendant 30 min. Cette poudre a constitué le matériel enzymatique.

II.1.2.3.- Préparation de l'extrait enzymatique de cacao

Cet extrait a été préparé à partir de la poudre de cacao acétonique reprise dans du tampon K_2HPO_4/KH_2PO_4 (0,15 M, pH 5,5) contenant 2 mM de DL-dithiothréitol (DTT) (Sigma) ($1g \cdot 5ml^{-1}$). Du polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Sigma) a été additionné afin de complexer les composés phénoliques (0,5 g pour 1 g de cacao). Le mélange laissé sous agitation magnétique à 4°C pendant une demi-heure a été filtré sous vide sur papier filtre sans cendre (Durieux, n°111). L'extrait de cacao obtenu est immédiatement utilisé pour le dosage de l'activité lipasique.

II.1.2.4.- Préparation des émulsions

Les émulsions ont été préparées extemporanément aux concentrations voulues dans une solution de gomme arabique (Sigma) à 10% au moyen d'un Ultra turax (IKA, T 25, Staufen, Germany) à une vitesse de 13000 tours/min pendant 45 à 60 secondes. Différents substrats ont été utilisés pour la préparation des émulsions : le beurre de cacao industriel (groupe Barry), l'huile d'olive (Sigma), l'huile de soja (Sigma), la trioléine (Sigma), la triacétine (Sigma).

II.1.2.5.- Composition et conditions d'incubation du mélange réactionnel

La détermination de l'activité lipasique de l'extrait enzymatique de cacao a été réalisée à partir de 0,6 ml d'extrait de cacao additionné de 1,9 ml de solutions tampons (0,15 M) de CH_3COOH/CH_3COONa et de KH_2PO_4/K_2HPO_4 à pH déterminé.

Celle de la poudre de cacao a été déterminée à partir de 200 mg de poudre de cacao acétonique auxquels sont ajoutés 2,5 ml de la solution tampon précédente. Les différents mélanges ont été incubés à 40°C pendant 15 min avant d'ajouter 2,5 ml de substrat (émulsion). Le pH du mélange a été ajusté à 5,2 et 7,4. Le mélange réactionnel est incubé à 40°C pendant 20 min sous agitation magnétique. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 10 ml de solution "STOP".

II.1.2.6.- Extraction des AGL du mélange réactionnel

Après arrêt de la réaction enzymatique, les AGL sont extraits en ampoules à décanter par 3x15 ml d'hexane. La phase aqueuse est écartée et la phase hexanique d'environ 45 ml contenant les AGL est récupérée.

II.1.2.7.- Quantification des AGL formés sous l'action enzymatique.

La méthode utilisée est celle de Chakrabatry *et al.* (1969) modifiée par Van Autryve *et al.* (1991). Cette technique utilise la rhodamine 6G (Fluka) qui s'associe aux AGL à longues chaînes carbonées (à partir de 12 carbonés) en formant un complexe de coloration rose dont l'absorbance est mesurée à 513 nm.

II.1.2.7.1.- Préparation et étalonnage de la solution de rhodamine 6G

La solution de rhodamine est composée de 100 mg de rhodamine 6G dissous dans 100 ml de tampon NaOH/NaH₂PO₄ (0,2 M, pH 10) afin d'obtenir la forme basique du réactif. La rhodamine est ensuite extraite avec 100 ml de toluène (Prolabo Normapur). La phase organique est récupérée et la phase aqueuse reprise à nouveau dans 3x100 ml de toluène. Les phases organiques sont regroupées puis filtrées et séchées par percolation sur pastilles de NaOH. Environ 400 ml de solution de rhodamine totalement anhydre sont obtenus et stockés à l'abri de la lumière à 4°C. L'étalonnage de cette solution est fait à chaque préparation avec une solution d'acide oléique (Sigma) à une concentration de 100 mg/ml dans l'hexane.

II.1.2.7.2.- Quantification des AGL

Après extraction des AGL formés par l'hexane, un volume déterminé de cet extrait est dilué dans de l'hexane de sorte à avoir une concentration en AGL mesurable par la gamme d'étalonnage. Ainsi 0,5 ml de solution rhodamine 6G sont ajoutés sur 3,5 ml de l'extrait dilué. Le mélange est incubé dans un bain-marie chauffé et thermostaté à 25°C pendant 5 minutes. L'absorbance du complexe formé a été mesurée contre un essai à blanc. Cette absorbance permet de déterminer la quantité d'AGL correspondante à partir de la courbe d'étalonnage.

II.2.- Etude des conditions de fonctionnement de l'activité lipasique à partir du cacao

II.2.1.- Influence de la délipidation de la poudre de cacao et du solvant

La poudre de cacao a été dégraissée par 5 lavages successifs avec l'hexane (5 ml pour 1 g de poudre) à température ambiante pendant 20 min sous agitations magnétiques. L'activité lipasique de la poudre délipidée a été mesurée sur 200 mg de poudre de cacao, en présence de 7,5 ml de solution tampon CH₃COOH /CH₃COONa (0,15 M, pH 5,2), de 2,5 ml d'émulsion à base de beurre de cacao (0,25 g.ml⁻¹).

Dans une seconde étude, la poudre de cacao a été délipidée par 3 lavages successifs avec l'acétone anhydre (5 ml pour 1 g de poudre) à +4°C pendant 20 min.

Enfin, d'autres essais de délipidation de la poudre de cacao ont été réalisés par trois lavages successifs dont l'un avec l'hexane à température ambiante et les 2 suivants avec l'acétone anhydre à froid. L'activité lipasique a été mesurée dans les conditions similaires à celles décrites ci dessus.

II.2.2.- Influence du pH

L'influence du pH a été évaluée sur 0,6 ml d'extrait de cacao (cf. II.1.2.3.) à des pH compris entre 4 et 5,5 avec une solution tampon CH₃COOH /CH₃COONa (0,15 M) et à des pH compris entre 5,2 et 8,5 avec une solution tampon K₂HPO₄/KH₂PO₄ (0,15 M) (Sambanthamurthi *et al.*, 1995) en présence du beurre de cacao.

II.2.3.- Influence de la nature du substrat

Cette étude a été réalisée aux pH 5,2 et 7,4 à partir de 0,6 ml d'extrait de cacao en présence de 2,5 ml d'émulsion à base de différentes matières grasses dont :

- le beurre de cacao à 25 mg/ml
- l'huile d'olive, huile de soja à 25 mg/ml
- la triacétine à 25 mg/ml
- la trioléine à 2,2 et 4,44 mg/ml

II.2.4.- Influence de la concentration du milieu réactionnel en substrat

L'activité lipasique a été mesurée à partir de 0,6 ml d'extrait enzymatique de cacao à pH 5,2 en présence de concentrations croissantes (25 à 150 mg/ml) d'émulsion à base de beurre de cacao dans le mélange réactionnel.

II.2.5.- Influence de la concentration enzymatique du milieu réactionnel

► **A partir de la poudre de cacao** : l'activité lipasique a été mesurée à partir de quantités croissantes (100-300 mg) de la même poudre de cacao délipidée en présence de 25 mg/ml de beurre de cacao à pH 5,2 dans du tampon K₂HPO₄/KH₂PO₄.

► **A partir de l'extrait de cacao** : l'activité lipasique a été mesurée à partir de volumes croissants d'extrait de cacao (0-1,2 ml) à pH 5,2 en présence d'émulsion à base de beurre de cacao.

II.2.6.- Influence du temps de réaction

L'influence du temps de réaction a été étudiée à partir de l'extrait de cacao à pH 5,2. Dix flacons contenant le mélange réactionnel de même composition (0,6 ml d'extrait enzymatique, de 1,9 ml de solution tampon K_2HPO_4/KH_2PO_4 et de 2,5 ml d'émulsion à base de beurre de cacao à 50 mg/ml) ont été préparés puis incubés à 40°C pendant un temps compris entre 0 et 10 min. A chaque minute, la réaction enzymatique dans un flacon est arrêtée par ajout de 10 ml de solution "STOP".

II.3.- Mesure de la teneur en AGL de la matière grasse par la méthode acido-basique

II.3.1.- Extraction la matière grasse

A partir des fèves entières (cotylédons + coques) ou de fèves décortiquées (cotylédons seuls) la matière grasse a été extraite au Soxhlet. Environ 15 g de fèves ou de cotylédons sont réduits en poudre dans un bol mixer (Waring blender). Dix grammes de poudre tamisée (tamis de maille 500 μ m) sont plongés dans 350 ml d'éther de pétrole (Prolabo Normapur, type 40°C-60°C) pendant une nuit. L'extraction du beurre de cacao est conduite pendant 8 heures. Le solvant est ensuite éliminé dans un évaporateur rotatif puis le ballon contenant la matière grasse est étuvé à 105°C pendant 4 h.

II.3.2.- Dosage des AGL du beurre de cacao

Les AGL du beurre de cacao ont été dosés par la méthode officielle 42-1993 (OICC, 1996). Environ 5 g de beurre de cacao est dissous dans 50 ml du mélange éther de pétrole/éthanol absolu, 1:1, (v/v) préalablement neutralisé. Les AGL sont titrés par une solution alcoolique de KOH à 0,1 N régulièrement contrôlée à l'aide d'une solution d'hydrogénophthalate de potassium (Aldrich) à 200 mg/30 ml en présence de phénol phtaléine (Sigma). Les teneurs sont exprimés en équivalents d'acide oléique.

II.4.- Analyse des AGL de la matière grasse par la chromatographie en phase gazeuse

II.4.1.- Préparation et dépôt de solutions de matières grasse sur plaque CCM

Les solutions de beurre de cacao ont été préparées à des concentrations permettant d'avoir une quantité suffisante d'AGL dans le dépôt pour être visible à la révélation sans risque de surcharge de la plaque. Chaque solution a été donc préparée dans l'hexane en

fonction de la teneur en AGL préalablement déterminée par la méthode acido-basique. 20 µl de solution de beurre de cacao ont été déposés en une bande de 2 cm de long par un déposeur automatique (Camag Linomat IV Y) sur plaques de silice (Merck, 20x10 cm, épaisseur 25 mm) préalablement lavées à l'éther diéthylique et réactivée à 120°C pendant 1 heure.

II.4.2.- Conditions d'élution et révélation par carbonisation

Après migration sur environ 15 cm dans une solution d'hexane / éther diéthylique / acide acétique glacial, 70/30/1 (v/v/v), la plaque témoin comportant plusieurs dépôts dont d'une solution d'acides gras standards (acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique) est séchée à l'air libre. Les spots sont révélés par carbonisation de la plaque à 180°C pendant 10 min après pulvérisation d'un mélange acide orthophosphorique / une solution aqueuse saturée d'acétate de cuivre, 50/50, (v/v). Les triglycérides moins polaires migrent jusqu'au front. Les AGL ($R_F = 0,5$) sont repérés en comparaison de la plaque échantillon à la plaque témoin comportant des AGL standards.

II.4.3.- Extraction des AGL

La bande correspondant aux AGL est grattée puis extraite par 2x25 ml d'un mélange méthanol / solution aqueuse de NaCl à 1% / acide acétique glacial, 10:10:1, (v/v/v) pendant 15 min à température ambiante sous agitation magnétique. L'extrait est filtré sur papier filtre puis séché par percolation sur sulfate de sodium anhydre. Les AGL sont ensuite extraits en ampoule à décanter par 3x50 ml de solvant hexane / éther diéthylique, 75/25 (v/v). Les phases hexaniques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre. L'extrait est filtré puis concentré sous azote jusqu'à 0,5 ml (Turbovap II Zmak) après ajout de 1 ml d'une solution d'acide margarique utilisé comme étalon interne à une concentration de 0,8 mg/ml.

II.4.4.- Analyse qualitative par chromatographie en phase gazeuse

◆ **Phase stationnaire** : La phase FFAP (Free Fatty Acid Phase) est une phase stationnaire polaire spécialement conçue pour l'analyse des AGL, en particulier dans les produits laitiers. Elle est constituée d'un polyéthylèneglycol modifié à l'acide nitrophtalique. Grâce à sa température d'utilisation maximum de 250°C en isotherme, tous les acides de C2 à C24 peuvent être analysés sur un seul chromatogramme, sans dérivatisation en esters méthyliques. La structure rigide de ce polymère due aux réticulations empêche sa dégradation par les acides.

◆ **Caractéristiques de la colonne**

Colonne FFAP

◆ Dimension : Longueur : 25 m

Diamètre interne : 0,32 mm

Épaisseur du film : 0,3 μm

◆ Conditions chromatographiques

◆ Températures :

- Colonne : programmation de $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 200 à 230°C puis 30 min à 230°C

- Injecteur : 270°C

- Détecteur : 300°C

◆ Gaz vecteur : Hélium

- Pression en tête de colonne : 50 kPa

- Débit : $1,58\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$

- Débit de fuite : $16\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$

◆ Injection : $2\mu\text{l}$, mode split, rapport de division =10.

II.4.5.- Analyse quantitative des AGL par CPG

Les teneurs relatives en AGL majeurs ont été déterminées par la méthode d'étalonnage interne (étalon interne = acide margarique ; C17:0) après détermination du coefficient de réponse de chaque AGL standard identifié à partir du chromatogramme.

II.5.- Préparation des milieux de culture et des solutions pour l'isolement de la flore microbienne

II.5.1.- Extraction et isolement des microorganismes des fèves

La solution d'extraction des microorganismes à partir des fèves a été préparée par adjonction de 1 g de peptone tryptique, (Difco), 8,5 g de NaCl (Carlo Erba) et 0,5 g de Tween 80 (Fluka) dans 1 l d'eau distillée chauffée à 60°C . La solution obtenue est stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. 5 g de brisures de fèves ont été plongés dans $3\times 45\text{ ml}$ de cette solution puis placés sous agitation magnétique pendant 1h à 28°C . Tous les extraits réunis constituent la solution mère. L'isolement des microorganismes a été effectué à partir d'un étalement de 0,1 ml de dilutions successives de la solution mère de 10^{-1} à 10^{-5} sur 3 boîtes de Pétri par dilution selon la méthode proposée par Milslivec *et al.* (1992).

Un milieu solide préparé avec de la gélose nutritive ordinaire (Difco) 23g.l⁻¹ et contenant 10⁻² mg.ml⁻¹ de cycloheximide a été utilisé pour le dénombrement des bactéries.

Le milieu « *potatoes dextrose agar* » (PDA) 39g.l⁻¹, contenant 5.10⁻² mg.ml⁻¹ de chloramphénicol (Sigma) et 0,1 mg.ml⁻¹ d'acide tartrique (Carlo Ebra) ajouté après filtration sur membrane Millipore type GS, 0,45µm a été utilisé pour le dénombrement des levures et des moisissures. Les résultats ont été exprimés en nombre d'unités formant des colonies microbiennes sur milieux de culture par g de matières sèches de cacao (UFC/g de cacao).

II.5.2.- Etude des propriétés lipolytiques des microorganismes

La technique utilisée consiste en la réalisation d'une culture microbienne sur un milieu de culture solide en présence d'un substrat lipidique et de la rhodamine B (Hiol, 1999). Les colonies des souches ayant des propriétés lipolytiques sont entourées d'un halot de fluorescence après incubation lorsqu'elles sont exposées aux rayons UV

II.5.2.1.- Composition du milieu rhodamine B pour l'étude des propriétés lipolytiques des bactéries et des moisissures

Un mélange de 10 g de peptone (Difco), 3 g d'extrait de levure (Difco), 5 g de NaCl et 30 g de gélose bacto agar (Difco) est dissous dans 890 ml d'eau milli-Q. Le mélange est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Une émulsion d'huile de colza commerciale (5 g/100 ml) préparée par sonnication dans une solution stérile à 2% d'alcool polyvinylique (Merck) et 10 ml de solution de rhodamine B (1 mg/ml) préalablement stérilisée par filtration (Millipore type GS, 0,22 µm) y sont ajoutés. Le milieu est coulé dans les boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Les souches bactériennes ou fongiques ont été repiquées sur ce milieu à partir de jeunes colonies pures. Les cultures ainsi réalisées sont incubées à 28°C pendant 48 heures. Après complexation de la rhodamine B se complexe avec les acides gras libérés sous l'action de la lipase microbienne produite, l'intensité de l'activité lipolytique de la souche est déterminée par la mesure du diamètre de la zone de fluorescence sur trois boîtes de Pétri à l'aide d'un pied à coulisse et la valeur moyenne est retenue.

II.5.2.2.- Préparation du milieu YNB-rhodamine B pour les levures

Ce milieu est composé de 5 g de glucose, 20 g de bactor agar (Difco), 790 ml de tampon NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (0,2 M, pH 7), de 5 g d'huile de colza commerciale émulsionnée

dans 100 ml d'une solution d'alcool polyvinylique à 2%, 10 ml d'une solution de rhodamine B stérile (1 mg/ml). Enfin 100 ml d'une solution de Yeast Nitrogen Base with amino acids (YNB, Difco) à 6,7% stérilisée par filtration (Millipore type GS, 0,22 μ m) y sont ajoutés.

II.5.3.- Détermination de la nature des microorganismes

L'identification des germes a porté essentiellement sur les bactéries et les moisissures ayant des propriétés lipolytiques.

Les tests de coloration de Gram et l'utilisation des tests d'identification de la galerie API 20E ont permis l'identification des bactéries. La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant l'incubation à 28°C pendant 24 à 48h se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition d'autres réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et permet d'obtenir une série de chiffres affectés à chaque résultat. L'identification des souches se fait grâce à cette série de chiffres à l'aide d'un logiciel d'identification dit API CAB +.

Les moisissures ont été identifiées par l'Institut de Mycologie de l'Université Catholique de Louvain en Belgique. Cette identification est basée sur les observations macroscopiques (croissance et morphologie des colonies) et microscopiques (morphologie des thalles, des spores et des conidies).

II.6.- Méthode d'étude de la biosynthèse de la lipase du *Rhizopus oryzae*

II.6.1.- Techniques de cultures

La souche de *R. oryzae* isolée du cacao marchand a été conservée dans des tubes de milieu PDA à +4°C jusqu'à utilisation. Une jeune culture a été réalisée à partir du tube de conservation par repiquage sur milieu PDA pendant 4 jours à 28°C. Une suspension de spores a été préparée à partir de cette culture dans une solution composée de Tween 80 (0,005%) et de peptone (1g.ml⁻¹). La numération des spores a été réalisée par le comptage hématimétrique de Thomas (Guiraud, 1998).

Le milieu de Czapeck-Dox liquide composé de 0,5g.l⁻¹ KCl, 70g.l⁻¹ NaNO₃, 1g.l⁻¹ KH₂PO₄, 10mg.l⁻¹ FeSO₄, 0,5g.l⁻¹ MgSO₄.H₂O, 30g.l⁻¹ glucose a été utilisé pour la pré culture des spores. La culture a été effectuée au 1/10^{ème} dans une série de 10 flacons Erlenmeyer de 100 ml rempli au 1/10^{ème} de leur volume à une concentration finale d'environ 10⁵ spores/ml. Les milieux de culture ont été incubés à 28°C sous agitation (80 oscillations/min, 7 cm

d'amplitude). Après 48 h d'incubation, le surnageant de culture de chaque flacon Erlenmeyer est éliminé par centrifugation (11159g pendant 10 min). Le culot de mycéliums est repris dans 10 ml d'eau physiologique stérile avant d'être mis en culture dans un autre Erlenmeyer contenant le milieu de production de lipase. La composition de ce milieu est la même que celle du milieu de pré culture sauf qu'il est sans glucose et additionné d'une émulsion à base d'huile de colza commerciale à concentration finale de 5g.l⁻¹. Tous les milieux de culture ont été incubés comme décrit ci dessus et des prélèvements (un par Erlenmeyer) ont été réalisés au cours du temps. Le milieu de culture est centrifugé à 11159g pendant 10 min. La biomasse produite est lavée dans l'eau stérile puis placée dans un flacon Becher préalablement taré. La quantité de biomasse formée au cours du temps est mesurée par pesée du flacon Becher après dessiccation à 100-105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (environ 18 à 24 heures).

II.6.2.- Détermination de l'activité lipasique du *R. oryzae*

L'activité lipasique a été étudiée au cours de la croissance de la biomasse. Les cultures ont été réalisées sur le milieu de production de lipase. L'activité lipasique a été mesurée au cours du temps à partir du surnageant de culture puis centrifugé (11159g pendant 10 min). L'activité lipasique de cet extrait enzymatique a été mesurée après 5 min de réaction à 37°C. Le milieu réactionnel est composé de :

- 100 µl d'extrait enzymatique
- 900 µl ml de tampon phosphate NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50mM à pH 7),
- 100 µl d'émulsion de trioléine (Sigma) à 50mM.

La réaction est arrêtée par addition de 2 ml d'une solution "STOP" composée d'acétone, d'éthanol et d'acide sulfurique 36 N (50/50/0,1, v/v/v). Les produits de la réaction ont été extraits dans 1 ml d'hexane. Les AGL formés sont mesurés par la méthode de la rhodamine 6G. Une unité enzymatique correspond à la libération de 1 µM d'acides gras par minute par ml d'extrait enzymatique. Un blanc a été réalisé auquel la solution "STOP" est ajoutée avant incubation afin de tenir compte de la quantité d'acides gras initialement présente dans le mélange réactionnel.

II.6.3.- Etude des conditions optimales de l'activité lipasique du *R. oryzae*

- **Influence du pH :** Le milieu réactionnel est composé de 100 µl d'extrait enzymatique de 30 h de culture incubés en présence de 100 µl d'émulsion à base de trioléine (50mM), 800 µl de solution tampon citrate (50mM, pH compris entre 2,7 et 7) et tris/HCl, (50mM, pH compris entre 7 et 9) sans ajustement de pH.

- **Influence de la concentration en enzyme** : Des volumes croissants (100-500 μ l) d'extrait enzymatique d'une culture de 18 h ont été incubés en présence de 100 μ l d'émulsion à base de trioléine (50mM) et de solution tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50mM, pH 6,5).

- **Influence de la nature du substrat** : 5 matières grasses végétales ont été testées : le beurre de cacao industriel, les huiles de lin, de soja, de colza et d'olive à une concentration finale de 0,025g.ml⁻¹ avec l'extrait enzymatique de 48 h de culture.

- **Influence de la température de réaction** : Le milieu réactionnel est composé de 100 μ l d'extrait enzymatique après 48h de culture, de 100 μ l d'émulsion à base d'huile de lin à 25mg.ml⁻¹, et de 800 μ l de tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ à pH 6,5. Ce milieu a été placé à des températures comprises entre 25 et 55°C.

II.6.4.- Etude du métabolisme oxydatif ou fermentaire des bactéries

La méthode utilisée est basée sur la modification du pH. Elle utilise le milieu semi-solide de Hugh et Leifson. Après incubation, le virage de l'indicateur coloré et la présence de gaz indiquent le type de métabolisme utilisé par les bactéries.

Le milieu de Hugh et Leifson est composé de 2g.l⁻¹ de peptone tryptique, de 5g.l⁻¹ de chlorure de sodium, de 0,3g.l⁻¹ de phosphate di-potassique (Prolabo), de 30mg.l⁻¹ de bleu de bromothymol et de 2,5g.l⁻¹ de gélose bacto agar. Après dissolution complète des différents éléments, le milieu est reparti dans des tubes à essai (9 ml) puis stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20min. Avant emploi, 1ml d'une solution de glucose (Riedel-deHaën) à 10% stérilisée par filtration (Millipore, GS 0,22 μ m) est ajouté. Deux tubes sont ensemencés à partir d'une jeune culture bactérienne par une piqûre centrale au fil droit. L'un des tubes est incubé à 37°C pendant 48h comme tel, l'autre est recouvert d'une couche d'environ 1cm de paraffine préalablement stérilisée (Guiraud, 1998).

II.7.- Décontamination des brisures de cacao

La décontamination des brisures artificielles de fèves noires a été réalisée par trempage pendant 3h à 28°C dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 5% (Sigma) (p/v=10) sous agitation magnétique (Guiraud, 1998). La phase liquide est éliminée par filtration sur une toile synthétique stérile de porosité 2mm. Le cacao décontaminé a été ensuite étalé sur un plateau préalablement désinfecté à l'éthanol absolu puis séché sous une hotte à flux laminaire jusqu'à obtention d'une teneur en eau de 8%. Le produit ainsi traité a été placé dans des flacons stériles fermés hermétiquement puis stockés à 27°C.

II.8.- Dosage des protéines

La mesure de la teneur en protéines des extraits enzymatiques de cacao a été réalisée selon la méthode standard de Bradford (1976). Cette méthode utilise le Bleu de Coomassie G-250 qui s'associe aux protéines par l'intermédiaire des groupes amines et arginines en modifiant leurs spectres d'absorption. Ceux ci présentent alors une bande intense dont le maximum est situé à 595nm.

Une variante (Microassay Procedure) permettant de doser des quantités de protéines comprises entre 1 à 20 μ g (Anon., 1990) a été utilisée pour la mesure de la teneur en protéines du surnageant de cultures microbiennes. La quantité de protéines est déterminée à partir d'une courbe standard réalisée avec le sérum albumine bovin. Le protocole consiste à ajouter 0,2ml du réactif Dye reagent concentré 5 fois (Bio-rad) à 0,8ml de l'échantillon. La coloration reste stable entre 5 et 60min. L'absorbance a été mesurée à 595nm contre un blanc réalisé avec de l'eau Milli-Q.

II.9.- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites avec les logiciels SAS et Sigmaplot V 8.0. La méthode d'estimation du maximum de ressemblance restreinte (REML) a été utilisée pour la corrélation entre la teneur en AGL et la teneur en microflore du cacao au cours du stockage. La comparaison des moyennes obtenues de l'étude de l'influence des méthodes d'échantillonnage des fèves sur la mesure de leur teneur en AGL a été réalisée par le test de Student à 0,001 et celle des écarts-types par le test de Fischer à 0,01 (Dagnelie, 1998).

CHAPITRE I.

*ETUDE DES CONDITIONS OPTIMALES
DE FONCTIONNEMENT DE L'ACTIVITE
LIPASIQUE MESUREE A PARTIR DU
CACAO MARCHAND*

L'hypothèse initiale qui a orienté les premières expérimentations donnait une origine endogène aux fèves à la lipase responsable de la formation des AGL du cacao. Ainsi l'étude d'activité lipasique potentiellement issue des fèves de cacao a été réalisée dans un premier temps à partir de fèves marchandes décortiquées et réduites en poudre. Cette poudre a été préparée à partir de lots dont l'identification concernant leur "génotype" et leur provenance précise en Côte d'Ivoire n'était pas connue.

1.1.- INFLUENCE DE LA DELIPIDATION DE LA POUDRE DE CACAO

L'influence de la délipidation a été étudiée en dégraissant par 5 lavages successifs la même poudre de cacao avec l'hexane. Après chaque lavage, environ 1 g de poudre est mis de côté pour la mesure de l'activité lipasique en fonction du nombre de traitements de délipidation.

L'influence du solvant a été étudiée à partir de la poudre de cacao dégraissée par 3 lavages avec l'hexane, par 3 lavages avec l'acétone anhydre et par 3 lavages successifs dont un lavage avec l'hexane et par deux lavages avec l'acétone anhydre.

Les conditions de dosage utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence une activité lipasique à partir de la poudre de cacao non dégraissée. L'activité lipasique mise en évidence à partir de la poudre de cacao dégraissée augmente avec le nombre de lavages successifs. Elle diminue après le troisième lavage (fig. 16). Mesurée à partir de la poudre de cacao acétonique, l'activité lipasique est plus importante que celle mesurée à partir de la poudre délipidée uniquement avec l'acétone elle-même plus importante que celle mesurée à partir de la poudre hexanique (fig. 17).

L'absence d'activité lipasique dans la poudre non dégraissée semble être due à la présence de lipides endogènes. Ce même phénomène a été observé dans les graines d'autres végétaux (Sahasrabudhe, 1982, Njoku *et al.*, 1996). L'augmentation de l'activité lipasique en fonction du degré de délipidation indique que l'enzyme est probablement sous forme de pré lipase. Cette forme semble susceptible de passer à la forme active suite à une élimination partielle des lipides endogènes. Ceci indique que les lipides endogènes sont probablement néfastes pour son fonctionnement. Cependant, la diminution de l'activité suite à un dégraissage exagéré peut être reliée à une modification du site actif de la lipase. L'activité de cette lipase après élimination partielle des poly phénols par extraction avec l'acétone est comparable à celle obtenue par dégraissage avec l'hexane. La présence des poly phénols semble bloquer aussi l'activité de la lipase détectée comme les lipides endogènes. Ce

phénomène de blocage des activités enzymatiques par les composés polyphénoliques a été déjà décrit par plusieurs auteurs (Hagermann, 1992 ; Kallithraka *et al.*, 2001 ; Misnawi *et al.*, 2002). Il semble que cela est dû à l'établissement d'une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle des polyphénols et le groupement amide carboxyle des protéines.

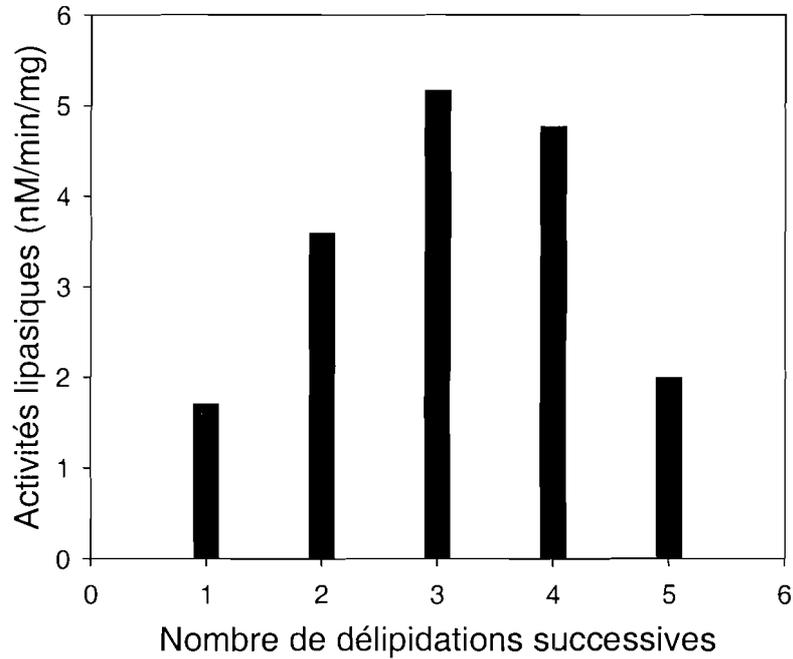


Figure 16. Influence du nombre de délipidations successives par l'hexane sur l'activité lipasique du cacao.

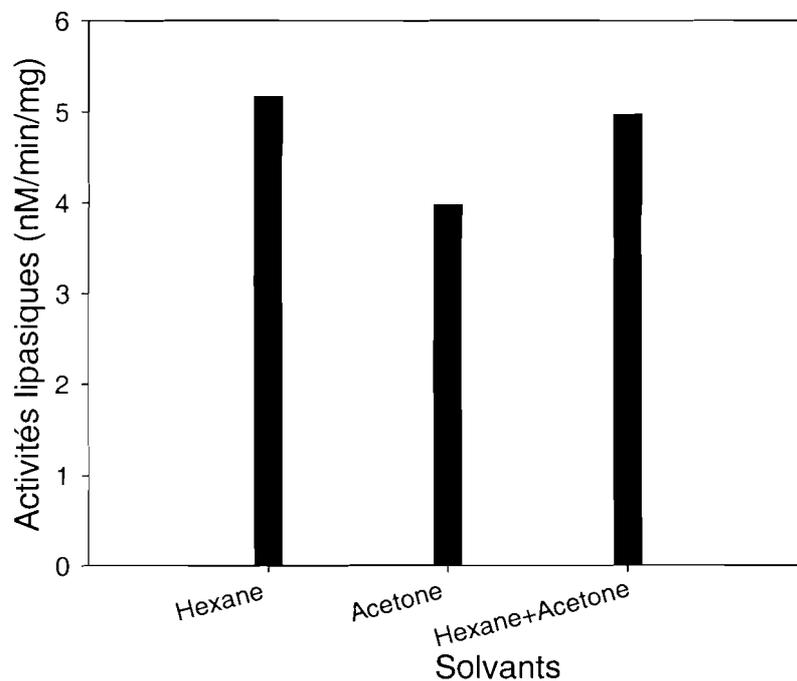


Figure 17. Influence du solvant de délipidation de la poudre de cacao sur l'activité lipasique du cacao

1.2.- INFLUENCE DU PH

L'influence du pH a été étudiée à partir de l'extrait enzymatique de cacao préparée à partir de la poudre de cacao acétonique dans une solution tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (1 g.5ml⁻¹). Une solution tampon $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ pour des pH compris entre 4 et 5,5 et une solution tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pour des pH compris entre 5,2 et 8,5 contenant 2 mM de DTT ont été utilisées. Le milieu réactionnel composé de 0,6 ml d'extrait de cacao, 1,9 ml de solution tampon et 2,5 ml d'émulsion à base de beurre de cacao (50 mg.ml⁻¹) a été incubé à 40°C pendant 8 min. Le pH a été ajusté si nécessaire.

L'activité lipasique mesurée à partir de la poudre de cacao acétonique présente deux pH optima dont l'un acide est compris entre 5,2 et 5,4 et l'autre basique entre 7 et 7,5 (Fig. 18). Ceci impliquerait la présence de deux lipases indépendantes ou d'un système d'iso enzymes. Le pH optimal acide pourrait avoir une signification physiologique car ce pH est avoisine celui des fèves cacao marchand qui est compris entre 4,5-5,5 (Yusep *et al.*, 2002). Mais les végétaux contenant une lipase active à pH acide pendant la dormance sont rares. C'est le cas du ricin (Ory *et al.*, 1962), de la nigelle (Mert *et al.*, 1995). Cette rareté rend contraire l'hypothèse d'une origine physiologique de l'activité lipasique ayant un pH optimal acide mesurée à partir des fèves de cacao. Le pH optimal alcalin est difficilement interprétable. En effet, l'activité de la majorité de lipases végétales à pH alcalin (Tab. 11) s'exprime pendant la germination où elles contribuent à la mobilisation des réserves lipidiques pour la production de l'énergie nécessaire à la croissance de l'embryon (Imeson *et al.*, 1993 ; Jachmanian *et al.*, 1995 ; Wanasundara *et al.*, 2001). Or chez le cacao, la montée en température ($\geq 50^\circ\text{C}$) et la diffusion d'acides à travers la fève due à la lyse partielle des parois cellulaires pendant la fermentation suppriment le pouvoir germinatif des fèves (Quesnel, 1965). Cette perte des facultés germinative des fèves de cacao devrait limiter le déclenchement d'activité de lipasique endogène éventuelle du cacao. Toutes ces observations ne permettent pas de conclure que sur l'origine de l'activité lipasique mise en évidence à partir du cacao.

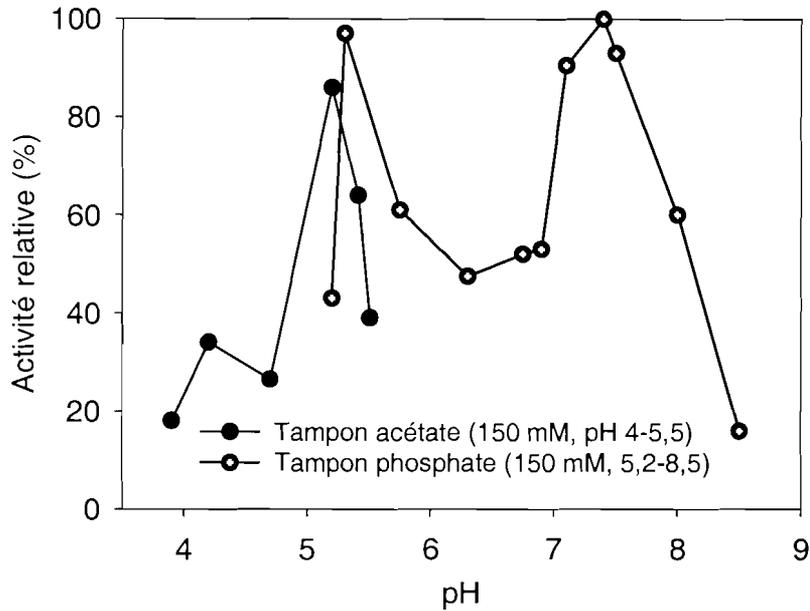


Figure 18. Influence du pH sur l'activité lipasique du cacao.

Tableau 11. pH optimal de l'activité lipasique de certaines plantes oléagineuses pendant la germination

Végétaux		pH optimal de l'activité lipasique germinative
Lupin ¹		8,5
Nigelle ²		8,5
Sésame ³		8,0
Colza ⁴	activité microsomale	7,5
	activité des corps lipidiques	9,0
Noix de Barbode ⁵		7,5

¹ Hassanien et Mukherjee (1986)

² Mert *et al.* (1995)

³ Wanasundara *et al.* (2001)

⁴ Hills et Murphy (1988)

⁵ Abigor *et al.* (2002)

I.3.- INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT

L'influence de la nature du substrat sur l'activité de la lipase a été étudiée à partir de la poudre de cacao acétonique aux pH optima précédemment déterminés (5,2 et 7,4) en présence d'émulsions à base de différentes matières grasses végétales et de matières grasses de synthèse.

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'activité lipasique mise en évidence à partir de la poudre de cacao possède une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao par rapport aux autres substrats comme l'huile d'olive, l'huile de soja et les substrats de synthèse quel que soit le pH optimal déterminé (fig. 19). Cette "affinité" peut s'expliquer soit par la teneur soit par la nature des acides gras constitutifs des triglycérides des matières grasses. En effet, les propriétés physico-chimiques des acides gras influent sur leurs propriétés émulsifiantes et donc sur la qualité de l'interface huile/eau (Egloff *et al.*, 1995). Elle peut être due aussi à la présence dans le beurre de cacao de cofacteurs de nature indéterminée ou par le fait d'une adaptation déjà acquise par les lipases en présence de catalyser l'hydrolyse des triglycérides constitutifs du beurre de cacao.

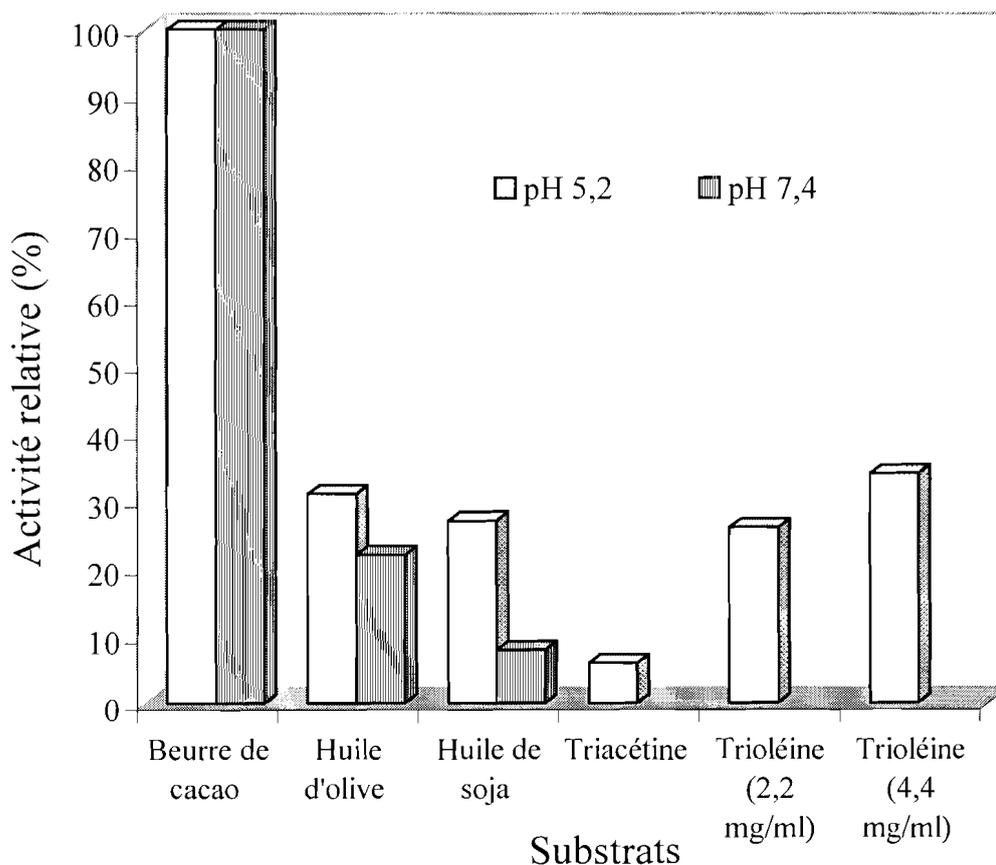


Figure 19. Influence de la nature du substrat sur l'activité lipasique du cacao.

1.4.- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT DU MILIEU REACTIONNEL

L'influence de la concentration en substrat a été étudiée avec le beurre de cacao car l'activité lipasique mise en évidence présente une plus grande "affinité" pour ce substrat. A cet effet, des émulsions à concentrations croissantes comprises entre 50 et 300 mg.ml⁻¹ ont été préparées. L'activité lipasique a été mesurée à partir de la poudre de cacao acétonique en présence de chaque émulsion préparée.

Les résultats de cette étude montrent que la variation de la concentration du milieu réactionnel en beurre de cacao de 25 à 125 mg.ml⁻¹ entraîne une augmentation de l'activité lipasique de 1 à 5,5 nM.min.⁻¹.mg⁻¹. Une concentration supérieure à 125 mg.ml⁻¹ engendre une diminution de l'activité (fig. 20). L'augmentation de la concentration en substrat au-delà de 0,125 g.ml⁻¹ entraîne vraisemblablement une modification de la taille des micelles et de la qualité de l'interface lipide/eau de l'émulsion. Un phénomène comparable a été observé avec le fonctionnement de l'activité lipasique microsomale des graines de colza en présence d'une émulsion à base de trioléine (Hills et Murphy, 1988).

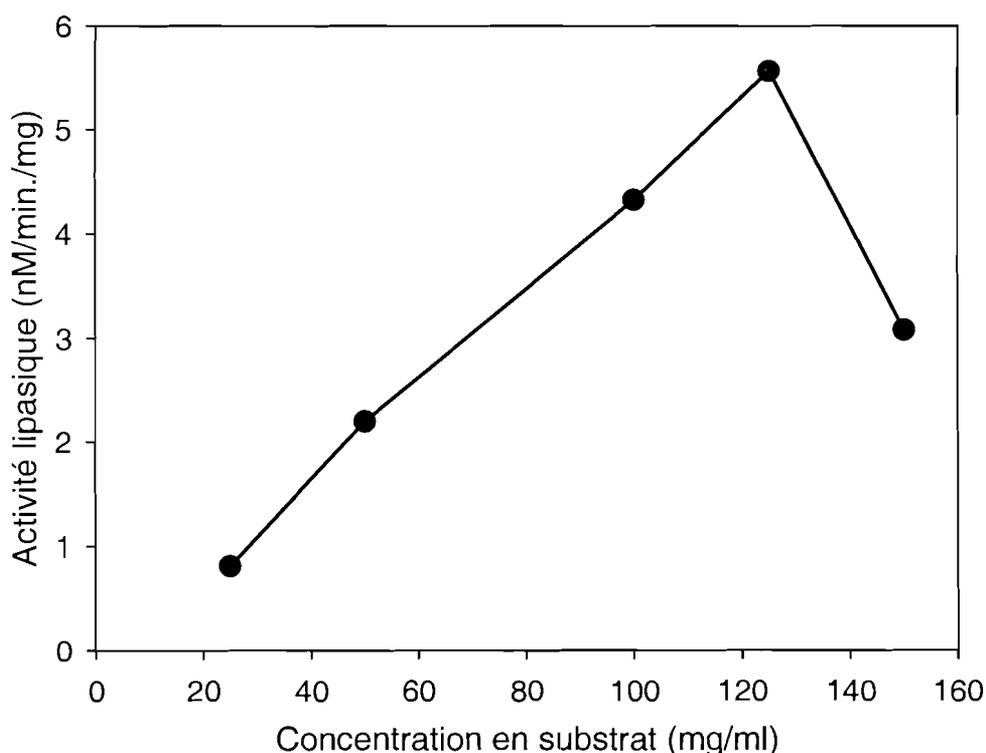


Figure 20. Influence de la concentration en beurre de cacao du milieu réactionnel sur l'activité lipasique du cacao.

1.5.- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION ENZYMATIQUE DU MELANGE REACTIONNEL

1.5.1.- Essais réalisés à partir de la poudre de cacao acétonique

Des quantités croissantes de poudre de cacao acétonique (25 à 300 mg) ont été utilisées dans 7,5 ml de solution tampon $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ à pH 5,2 en présence de 2,5 ml d'émulsion à base de beurre de cacao (250 mg.ml^{-1}).

Les résultats de cette étude montrent que l'augmentation de la concentration du milieu réactionnel en poudre de cacao de 5 à 20 mg.ml^{-1} en présence de 125 mg.ml^{-1} de substrat entraîne une augmentation de l'activité lipasique. Cette activité est limitée pour une concentration en poudre de cacao acétonique supérieure à 20 mg.ml^{-1} (fig. 21). Le blocage de l'activité lipasique peut résulter d'une modification des propriétés physico-chimiques du milieu réactionnel (interface huile/eau) due à une concentration plus élevée en poudre de cacao et à un rapport substrat/enzyme néfaste. Un phénomène analogue a été observé pour l'activité lipasique des céréales comme le blé, l'orge et l'avoine qui augmente jusqu'à 500 mg.ml^{-1} puis diminue pour des concentrations supérieures (O'connor *et al.*, 1992).

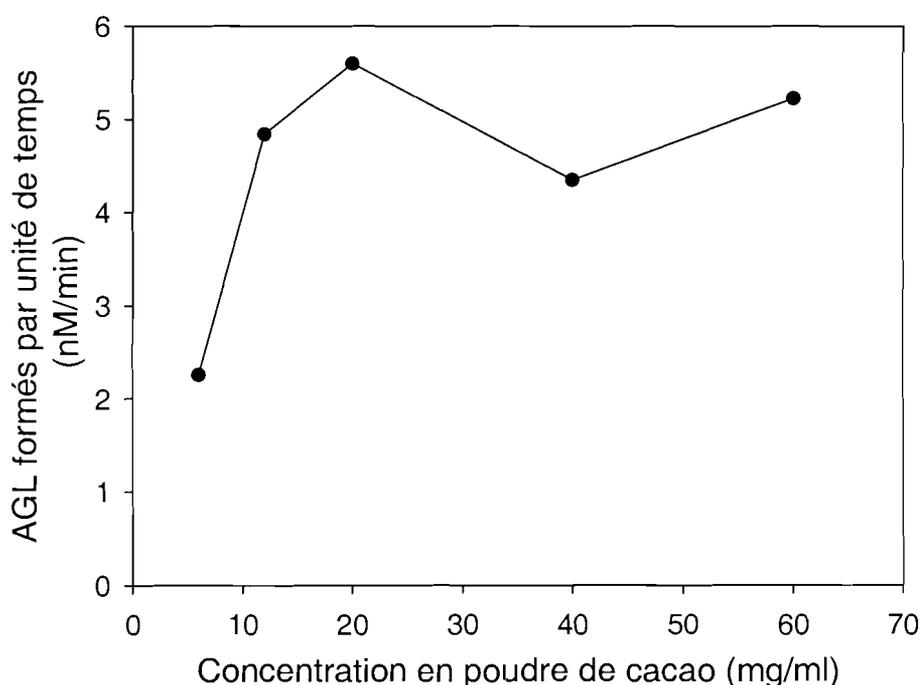


Figure 21. Influence de la concentration du milieu réactionnel en poudre de cacao acétonique sur l'activité lipasique du cacao

I.5.2.- Essais réalisés à partir de l'extrait enzymatique de cacao -Influence de l'ajout de sels et de détergents

Le mélange réactionnel a été composé d'un volume d'extrait enzymatique de cacao compris entre 0,2 et 0,8 ml complété à 2,5 ml par ajout d'une solution tampon $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ à pH finale de 5,2, de 2,5 ml d'émulsion à base de beurre de cacao ($250 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Des détergents comme le triton à 0,05 % et le n- β -glucopyranoside à 10 mM (Hills et Murphy, 1988), ont été utilisés lors de la préparation de l'extrait afin d'améliorer l'extraction des protéines du cacao. De plus, le NaCl et le CaCl_2 utilisées comme activateurs d'activité lipasique d'origine végétale (Hills et Murphy, 1988) ont été ajoutés au milieu réactionnel.

Les résultats montrent que l'activité lipasique est constante pour un volume d'extrait enzymatique de cacao compris entre 0,2 à 0,4 ml. Elle est bloquée pour des volumes supérieur à 0,4 ml. (fig. 22). Bien que l'extraction des protéines ait été améliorée (passage de 5 à 7 %) par l'utilisation des détergents, l'activité lipasique de l'extrait de cacao reste bloquée. L'ajout des sels (NaCl , CaCl_2) n'ont eu aucun effet sur elle ni à partir de la poudre de cacao acétonique ni à partir de l'extrait d cacao.

Le blocage de l'activité lipasique peut s'expliquer par l'action des composés comme les polyphénols résiduels dissous dans l'extrait de cacao. L'ajustement du pH du milieu réactionnel à cause du pouvoir acide important du cacao peut contribuer aussi à ce phénomène de blocage de l'activité lipasique. Enfin, ce blocage peut provenir d'une modification de la qualité de l'émulsion dans le mélange réactionnel et/ou du rapport lipase/substrat néfaste pour le fonctionnement de la lipase détectée.

L'absence à partir de l'extrait après ajout de détergents peut s'expliquer par un blocage dû à la présence de détergents (triton, n- β -glucopyranoside). En effet, une interaction de ces composés avec les triglycérides du substrat peut être défavorable à l'activité de l'enzyme. Un tel phénomène inhibiteur a déjà été observé par Hills et Murphy (1988) sur l'activité lipasique du colza.

Par ailleurs, l'absence d'effet de sels de calcium et de sodium sur l'activité suggère que l'activité lipasique mise en évidence ne serait pas d'origine endogène au cacao. En effet, ces composés présentent généralement des propriétés activatrices pour les activités lipasiques d'origine végétale (Hills et Murphy, 1988). De cette étude, les observations obtenues ne permettent pas de conclure précisément sur l'origine végétale ou microbienne des protéines responsables de cette activité lipasique.

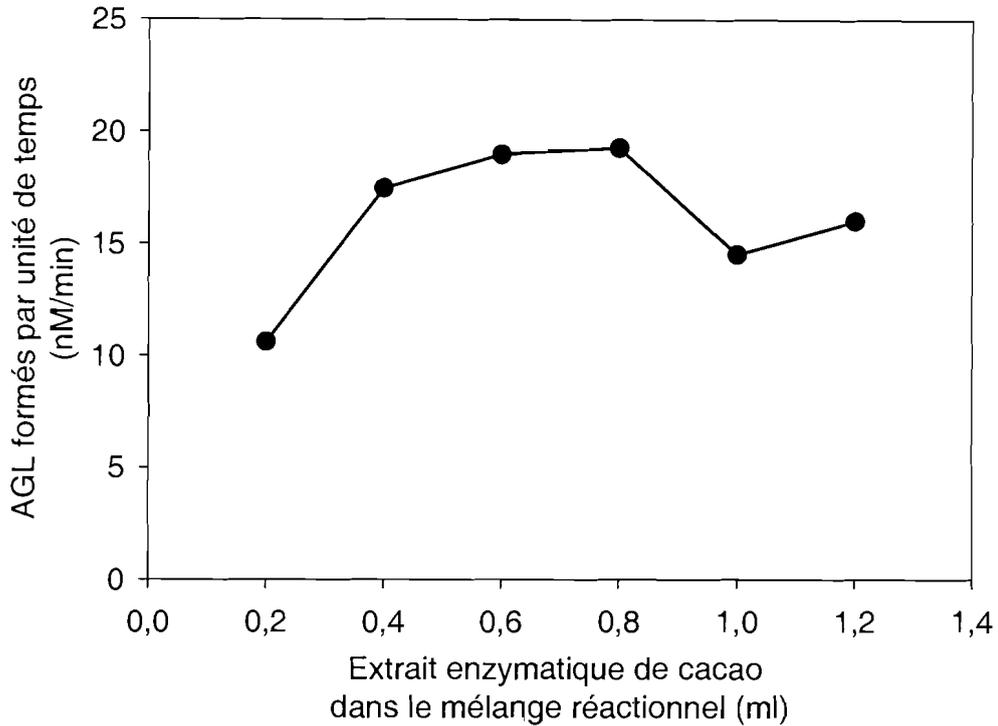


Figure 22. Influence de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité lipasique du cacao

1.6.- INFLUENCE DU TEMPS DE REACTION

L'influence du temps de réaction a été étudiée à partir de l'extrait de cacao. Les mélanges réactionnels, composés de 0,6 ml d'extrait, 1,9 ml de solution tampon acétate (0,15 M, pH 5,2) et 2,5 ml d'émulsion à base de beurre de cacao ($250 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) ont été incubés à 40°C sous agitation magnétique. Une série de 11 tubes contenant le même milieu réactionnel a été ainsi préparée. La réaction enzymatique de chaque milieu réactionnel est arrêtée par ajout de solution "STOP" aux temps 0, 1, 2, ..., 10 min.

Les résultats obtenus de cette étude montrent que l'activité lipasique reste constante pour un temps de réaction compris entre 0 et 5 min. Elle est bloquée pour un temps de réaction supérieur à 5 min (fig. 23). Ceci peut s'expliquer par une action défavorable des produits de la réaction comme les AGL, les mono- et di-glycérides sur l'activité lipasique étudiée. Un phénomène comparable a été observé pour l'activité des lipases des graines de moutarde et des graines de lupin germées (Hassanien et Mukherjee, 1986). Le blocage de l'activité lipasique peut s'expliquer aussi par une dénaturation de l'enzyme au cours du temps de réaction prolongé à 40°C .

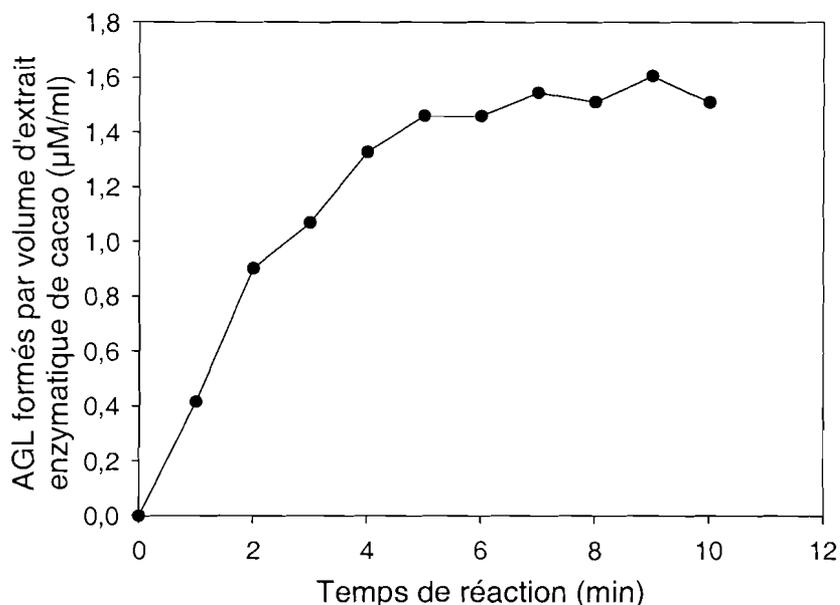


Figure 23. Influence de la variation du temps réaction à 40°C du mélange réactionnel sur l'activité lipasique du cacao

1.7.- LOCALISATION DE L'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LA FEVE SECHE

L'étude de l'activité lipasique à partir des différents organes de la fève de cacao a été réalisée sur un lot de fèves fractionné en deux échantillons. Les fèves du premier échantillon ont été broyées sans être décortiquées contrairement à celles du second échantillon. Les cotylédons et les coques ont été séparées puis broyées séparément. L'activité lipasique a été mesurée à partir de 200 mg poudre de chaque organe dans 7,5 ml de solution tampon acétate (0,15 M, pH 5,2) en présence de 2,5 ml d'émulsion à base de beurre de cacao (250 mg.ml⁻¹).

Les résultats montrent une différence entre l'activité lipasique mesurée à partir des cotylédons et celles mesurées à partir des coques seules et des fèves non décortiquées qui sont d'intensité comparable (fig. 24).

La diminution de l'activité lipasique du cacao mesurée à partir des coques seules et des fèves non décortiquées par rapport à celle mesurée à partir des cotylédons peut être due à la présence d'inhibiteurs indéterminés dans les coques. **L'activité lipasique détectée et mesurée à partir du cacao est présente dans tous les organes** contrairement par exemple à celle du riz qui est essentiellement localisée dans la pellicule du grain (Raghavendra et Prakash, 2002).

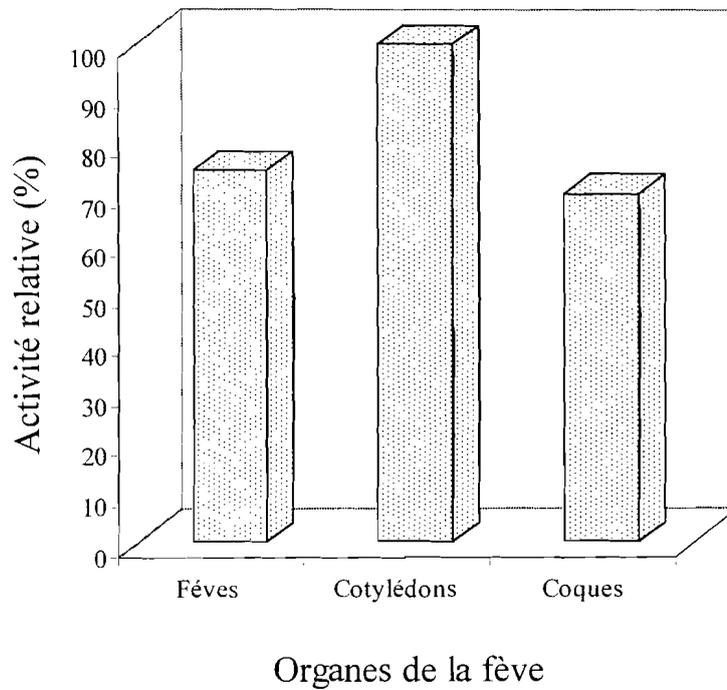


Figure 24. Localisation de l'activité lipasique à partir des organes de la fève de cacao

1.8.- RECHERCHE D'ACTIVITE LIPASIQUE DANS LES FEVES FRAICHES NON-FERMENTEES

Deux études complémentaires sur la recherche d'activité lipasique à partir des fèves fraîches et dans les brisures naturelles contenant une forte teneur en AGL (11%) ont été effectuées.

Les résultats obtenus indiquent qu'aucune activité lipasique n'a été décelée dans les fèves fraîches non fermentées. L'activité lipasique mesurée ponctuellement à partir des brisures naturelles est faible et comparable à celle dosée dans les lots de cacao marchand précédemment analysés (activité comprise entre 4 et 5 nmol/mg/min).

L'absence d'activité lipasique observée à partir du cacao frais peut s'expliquer par trois facteurs :

- la faible intensité de l'activité lipasique mise en évidence
- la probable origine exogène de l'activité lipasique mesurée à partir du cacao
- l'inadaptation du protocole de mesure de cette activité lipasique à partir du cacao frais.

Le faible niveau d'activité lipasique mesurée à partir des brisures naturelles qui contiennent pourtant une forte teneur en AGL suggère trois observations :

- la formation des AGL dans les brisures ne semble pas être en relation avec l'activité lipasique mesurée car la formation d'AGL se poursuit alors que l'activité lipasique est faible et comparable à celle mesurée à partir des fèves saines ayant des faibles teneurs en AGL,
- l'activité impliquée dans l'hydrolyse des triglycérides du beurre de cacao ne semble plus fonctionnelle au moment de la mesure de la teneur en AGL car pendant qu'il se produit une augmentation de la teneur en AGL une faible activité lipasique a été mise en évidence,
- l'activité lipasique responsable de la formation de ces AGL ne serait pas d'origine endogène.

Conclusion

La méthode de dosage utilisée ne permet pas de mesurer l'activité lipasique à partir de la poudre de cacao non dégraissée ainsi qu'à partir des fèves non fermentées et séchées. Mesurée à partir du cacao marchand, cette activité présente deux pH optima et possède une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao par rapport à d'autres matières grasses d'origine végétale comme les huiles d'olive et de soja. Elle est faible par rapport à celle d'autres végétaux et reste avec l'augmentation de la concentration de la poudre de cacao acétonique ou d'extrait de cacao dans le mélange réactionnel. Elle est présente dans tous les organes de la fève mais son intensité est plus élevée dans les cotylédons. Par ailleurs, l'activité de la lipase détectée dans les brisures naturelles contenant des teneurs anormalement élevées en AGL est aussi faible que celle mesurée à partir des fèves saines contenant des faibles teneurs en AGL. **Ceci suggère que l'hydrolyse du beurre de cacao ne peut être reliée à l'activité lipasique détectée et mesurée à partir de la poudre de cacao acétonique.**

L'utilisation de certains sels minéraux considérés comme des activateurs de lipases d'origine végétale et de détergents comme le triton et n- β -glucopyranoside lors de la préparation de l'extrait de cacao n'a pas eu d'effet sur l'activité lipasique mise en évidence à partir du cacao. Ceci rend peu probable l'origine endogène de la lipase détectée à partir de la poudre de cacao dégraissée.

Toutefois, l'activité de cette lipase pourrait dépendre des traitements post-récolte du cacao pratiqués par le producteur puisque les fortes teneurs en AGL apparaissent de façon récurrente et saisonnière. Il s'est avéré alors intéressant d'étudier l'influence du "génotype" et des différents traitements post-récolte du cacao sur les conditions de fonctionnement de l'activité lipasique détectée à partir de la poudre de cacao et conjointement sur l'évolution de la teneur en AGL.

CHAPITRE II.

*INFLUENCE DU GENOTYPE ET DES
TRAITEMENTS POST RECOLTE SUR
L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE
LIPASIQUE ET DE LA TENEUR EN AGL
DU CACAO*

Une faible activité lipasique a été mise en évidence à partir du cacao. L'origine de cette activité lipasique reste non ciblée et il est peu probable qu'elle provienne du cacao. Il est également peu probable que cette activité soit à l'origine de la formation des AGL du cacao. En vue de compléter ces observations, l'étude des conditions de fonctionnement de cette activité lipasique en fonction du "génotype" et des traitements post-récolte du cacao a été entreprise. L'influence des facteurs comme le "génotype", le degré de maturité des fruits à la cueillette, le délai d'écabossage, la durée de fermentation, la durée de stockage a été étudiée à partir du cacao sain récolté en début et en fin de la campagne cacaoyère 2000-2001 dans une plantation privée dans la région de Soubré en Côte d'Ivoire.

II.1.- CACAO RECOLTE EN DEBUT DE CAMPAGNE

II.1.1.- Influence du "génotype" du cacao

L'influence du "génotype" sur l'activité lipasique et sur la teneur en AGL a été étudiée sur du cacao sain de type Forastero haut-amazonien, des hybrides de 1^{ère} génération et de descendances libres.

Les résultats obtenus montrent qu'au cours des deux premiers mois de stockage, aucune activité lipasique n'a été mesurée à partir des hybrides de la 1^{ère} génération. Le cacao de descendances libres présente une activité lipasique légèrement plus importante que les autres "génotypes". Dans les conditions expérimentales utilisées, le "génotype" du cacao a une influence négligeable sur l'activité lipasique du cacao. Après 2 mois le stockage, l'activité lipasique évolue de façon similaire dans tous les cacaos quel que soit le "génotype" considéré. Globalement, elle augmente légèrement vers le troisième mois de stockage mais reste constamment faible par la suite (fig. 25).

La teneur en AGL initiale de tous les cacaos est faible et avoisine 0,4%. Elle augmente très légèrement durant le stockage et se situe entre 0,5 et 0,6% quel que soit le "génotype" du cacao (fig. 26). Cependant, aucun cacao n'est hors norme après 5 mois de stockage quel que soit le génotype.

Pour des cacaos sains présentant une faible teneur en AGL, la formation des AGL est réduite et l'activité lipasique mise en évidence reste faible au cours du stockage quel que soit le "génotype".

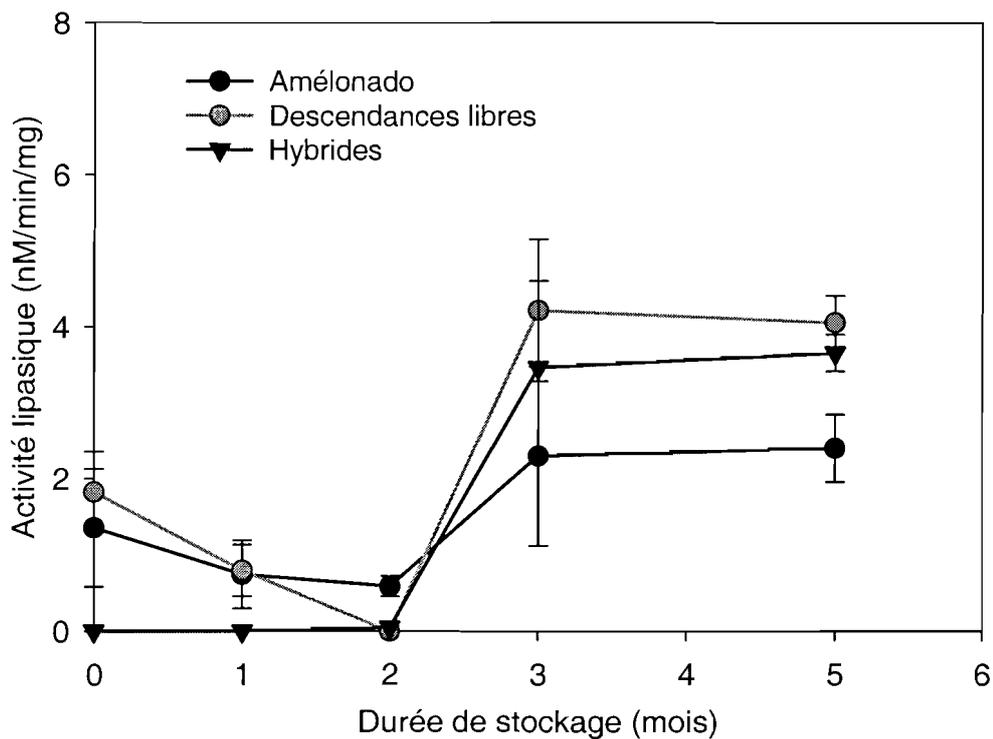


Figure 25. Evolution de l'activité lipasique durant le stockage en fonction du "génotype" du cacao récolté en début de campagne.

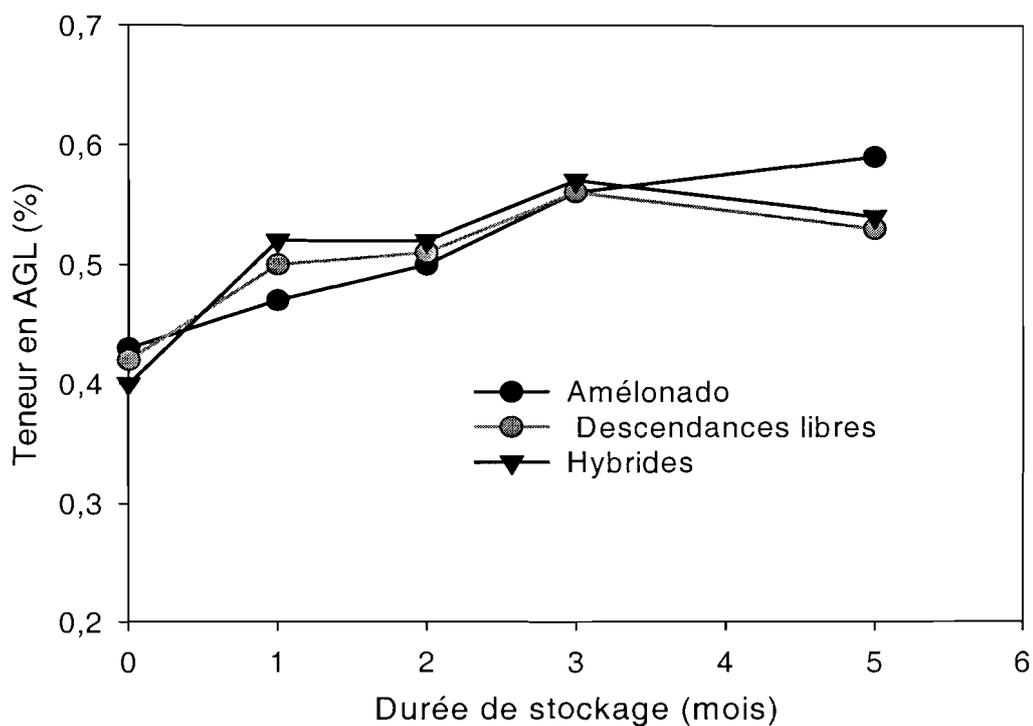


Figure 26. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du "génotype" du cacao récolté en début de campagne.

II.1.2.- Influence du niveau de maturité des cabosses

L'influence du degré de maturité des fruits du cacaoyer sur l'activité lipasique et sur la teneur en AGL du cacao a été étudiée à partir des fèves issues des cabosses saines immatures, mures et surmures. Les fèves ont été extraites des cabosses 5 jours après la récolte puis mises en microfermentation.

Avant stockage, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité lipasique à partir des fèves issues des fruits surmures. L'activité lipasique mesurée à partir des fèves issues des fruits mures est légèrement plus importante que celle mesurée des fèves provenant des fruits immatures.

Après 1 mois de stockage, cette activité lipasique mesurée à partir fèves issues seulement des fruits immatures a particulièrement augmenté. A partir du second mois de stockage, elle augmente quelle que soit le degré de maturité des fruits et tend à diminuer à partir du 3^{ème} mois de stockage (fig. 27).

L'intensité d'activité lipasique semble dépendre du niveau de maturité des fruits à la cueillette. Cependant, cet impact est faible lorsque les fruits sont très mûrs. L'augmentation de l'activité lipasique observée à partir des fèves provenant des fruits immatures après 1 mois de stockage peut être expliquée par un problème d'échantillonnage. Cette valeur nous semble aberrante, d'autant plus que le niveau d'activité régresse brutalement en un mois de stockage.

De façon globale, il est difficile d'interpréter les cinétiques obtenues car elles montrent une forte variabilité, probablement due à la forte hétérogénéité des lots étudiés et à l'échantillonnage.

La teneur en AGL du cacao est faible quel que soit le degré de maturité des fruits récoltés. Cette teneur en AGL augmente très légèrement durant le stockage mais reste conforme à la norme officielle (fig. 28).

L'influence du niveau de maturité des fruits sains et de la durée de stockage sur la teneur en AGL reste limitée et négligeable.

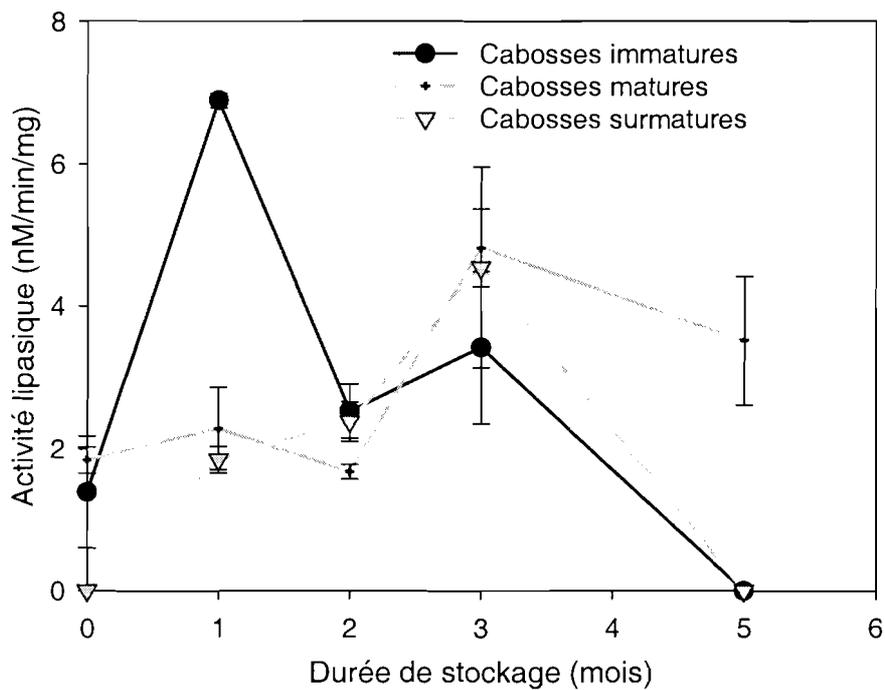


Figure 27. Evolution de l'activité lipasique du cacao durant le stockage en fonction de la maturité des cabosses récoltées en début de campagne.

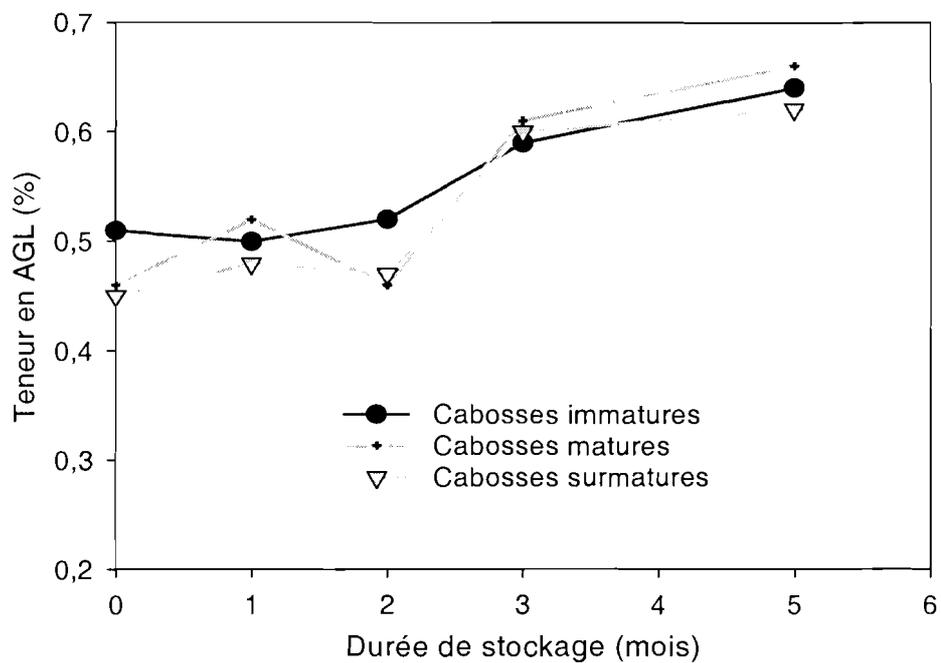


Figure 28. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction de la maturité des cabosses récoltées en début de campagne.

II.1.3.- Influence du délai d'écabossage des fèves

L'influence de l'écabossage différé a été étudiée à partir de 3 lots de cacao semblables récoltés le même jour. Le lot n°1 a été écabossé le jour de la récolte, les lots n°2 et n°3 ont été écabossés respectivement 5 et 9 jours après la récolte. Les fèves issues des différents lots ont été fermentées puis séchées séparément.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité lipasique à partir des fèves issues des fruits écabossés 5 jours après la récolte. L'activité lipasique mesurée à partir des fèves issues des fruits écabossés le jour même de la récolte et des fruits écabossés 9 jours après est faible et avoisine 2,5 nmol/min/mg.

Avant stockage, aucune activité lipasique n'a pu être mesurée à partir de fèves extraites 5 jours. Une activité comparable a été en revanche mesurée à partir des fèves extraites 9 jours après la récolte et de celles extraites le jour même de la récolte. En trois mois de stockage, l'activité lipasique du cacao a globalement augmenté quel que soit le délai d'écabossage (fig. 29). **Cependant, quel que soit le délai d'écabossage, les cinétiques d'activité lipasiques obtenues ne permettent ni une interprétation aisée ni une caractérisation concluante de l'influence du délai d'écabossage et celle de la durée du stockage sur l'activité lipasique étudiée.** Ces cinétiques difficiles d'interprétation peuvent être reliées à un problème d'échantillonnage à cause d'une probable hétérogénéité des lots de cacao analysés

La teneur en AGL du cacao avant stockage est faible (0,4-0,5%) quel que soit le délai d'écabossage. En cinq mois de stockage, cette teneur a évolué très légèrement jusqu'à atteindre 0,6%. En fin de stockage, aucun cacao n'est affecté par une forte teneur en AGL (fig. 30). **Quel que soit le délai d'écabossage du cacao, le délai d'écabossage a une influence peu importante sur la teneur en AGL du cacao.**

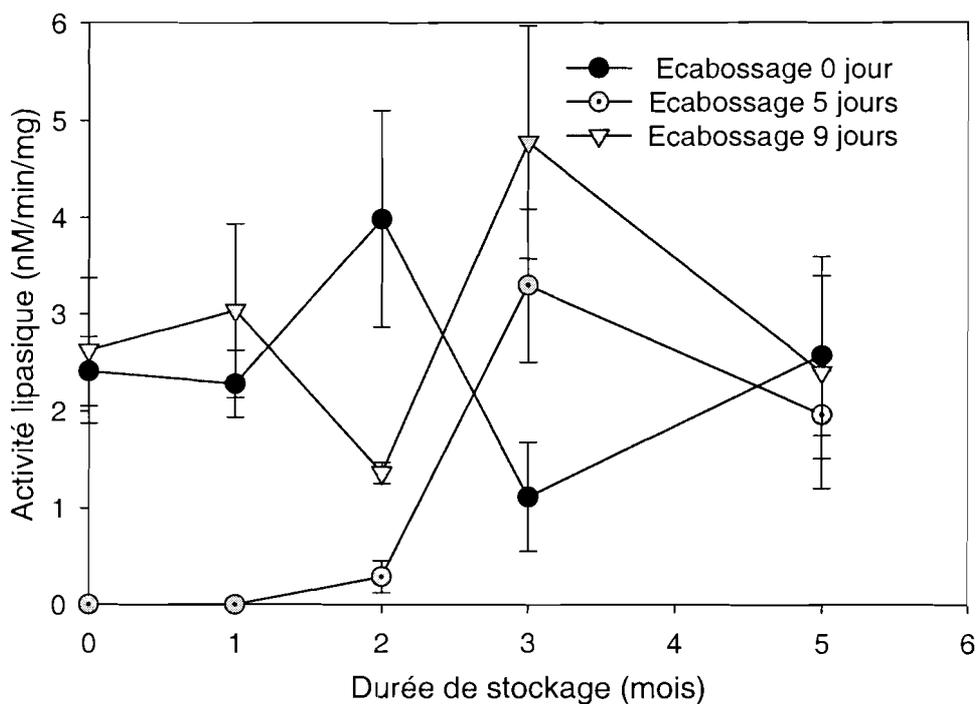


Figure 29. Evolution de l'activité lipasique du cacao durant le stockage en fonction du délai d'écabossage des fruits récoltés en début de campagne.

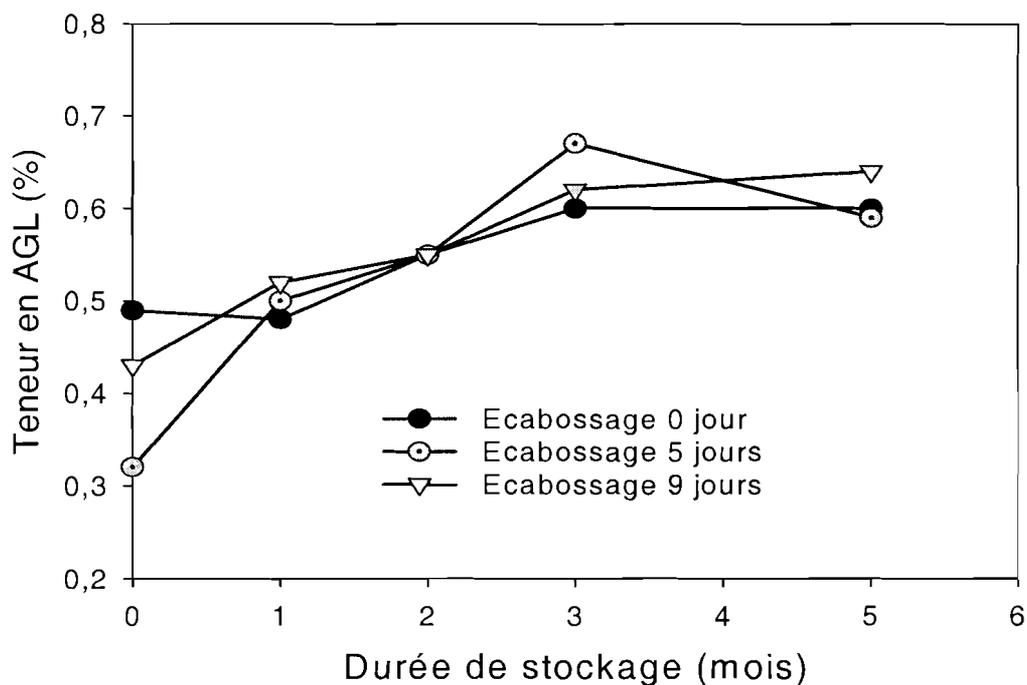


Figure 30. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du délai d'écabossage des fruits récoltés en début de campagne.

II.1.4.- Influence de la durée de fermentation des fèves

L'influence de la durée de fermentation sur l'activité lipasique et sur la teneur en AGL du cacao a été étudiée à partir du cacao de descendances libres. Des prélèvements de fèves ont été effectués chaque jour à partir du "cœur" de la masse en fermentation pendant 6 jours.

Une activité lipasique a été mesurée à partir du cacao quelle que soit la durée de fermentation à l'exception des fèves fermentées durant 1 jour. Cette activité n'augmente pas proportionnellement avec la durée de fermentation. Avant stockage, l'absence d'activité lipasique dans les fèves fermentées pendant 1 jour est comparable à l'observation faite dans les fèves fraîches. Cette absence d'activité dans les fèves moins fermentées suggère encore une fois que la lipase étudiée n'est pas d'origine endogène. Au cours du stockage, l'activité lipasique des fèves fermentées durant 6 jours augmente nettement alors que celles des fèves fermentées en moins de 6 jours augmente puis tendent à diminuer (fig. 31). La disparition d'activité lipasique dans les fèves fermentées pendant 5 jours et sa diminution dans les autres cacaos à l'exception des fèves fermentées pendant 6 jours au cours du stockage restent inexplicables. L'évolution constante de l'activité lipasique mesurée à partir des fèves fermentées pendant 6 jours peut s'expliquer par une présence plus importante des protéines exprimant une activité lipolytique sur la matrice lipidique des fèves. En effet, en admettant l'hypothèse d'une origine microbienne de la lipase responsable de la genèse des AGL du cacao, les microorganismes impliqués dans la sécrétion de cette lipase peuvent se développer vers la fin de la fermentation acétique.

Toutefois, les cinétiques observées ne permettent pas d'expliquer l'influence de la durée de fermentation sur l'activité lipasique étudiée à cause de leur forte variabilité.

Parallèlement, la teneur en AGL des fèves en fonction de la durée de fermentation est faible et comprise entre 0,2 et 0,4%. Cette teneur en AGL augmente légèrement et de façon identique pour tous les cacaos au cours du stockage (fig. 32). La faible teneur en AGL des fèves en fonction du temps de fermentation du cacao peut s'expliquer par le fait que le beurre de cacao ne subit pas de transformation notable au cours d'une fermentation correctement menée (Schwan, 1998). La valeur légèrement élevée de la teneur en AGL des cacaos plus fermentés (6 jours) par rapport à celle des cacaos moins fermentés suggère que la formation des AGL est due à l'activité de certains microorganismes thermophiles dont des moisissures sont capables de se développer comme l'a signalé Oyeniran (1980).

La durée de stockage a une influence réduite sur la formation des AGL du beurre de cacao quelle que soit la durée de fermentation. Un phénomène comparable a été mis en évidence par Renaud (1954).

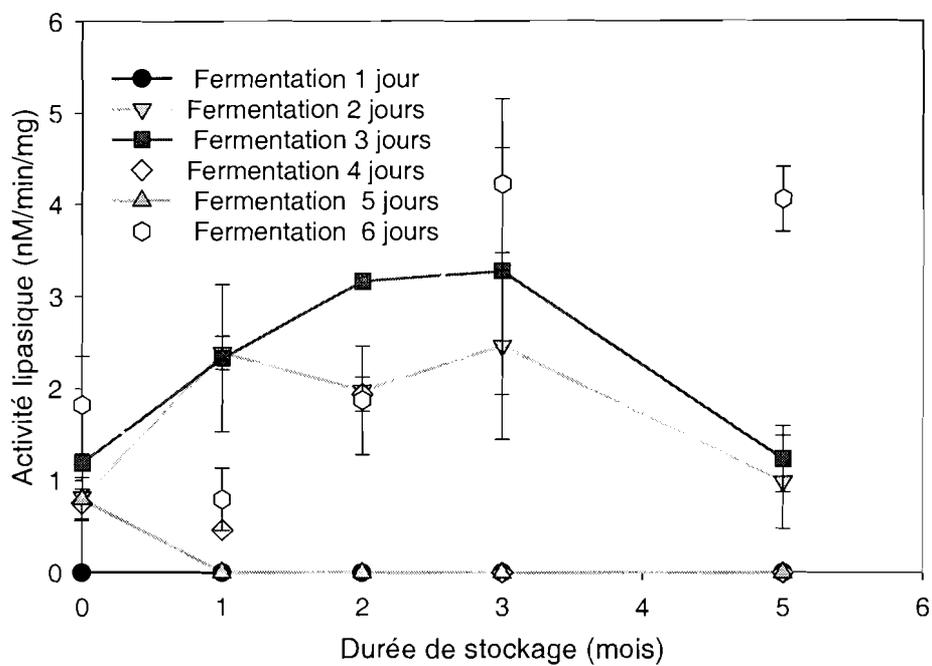


Figure 31. Evolution de l'activité lipasique durant le stockage en fonction de la durée de fermentation du cacao récolté en début de campagne.

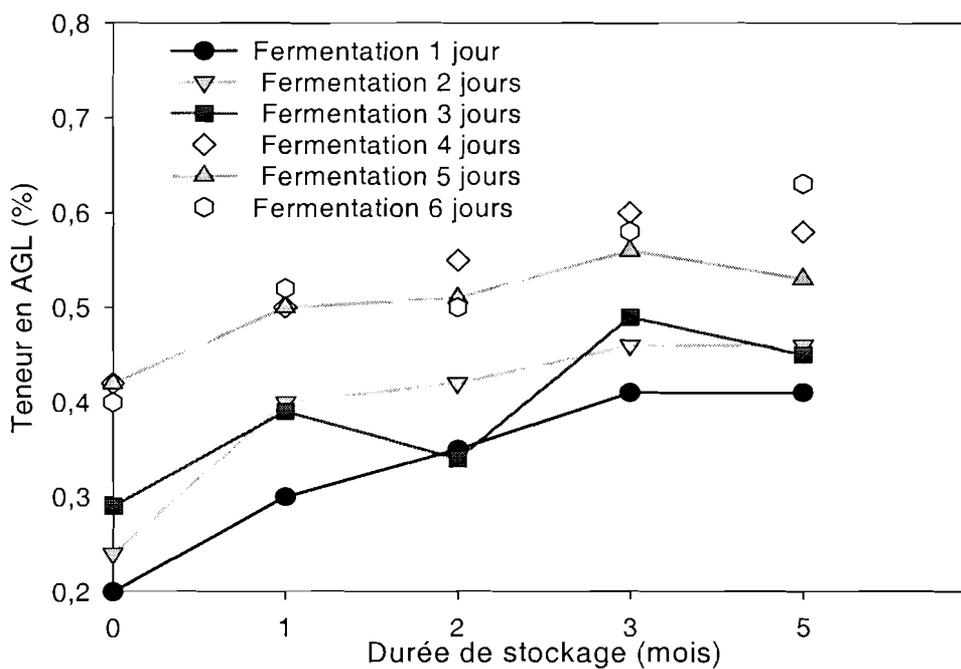


Figure 32. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction de la durée de fermentation du cacao récolté en début de campagne.

II.2.- INFLUENCE DES TRAITEMENTS POST RECOLTE SUR LA FORMATION DES AGL DU CACAO RECOLTE EN FIN DE CAMPAGNE

Une seconde série d'analyse basée sur les mêmes hypothèses que précédemment ("génotype", maturité, délai d'écabossage, durée de fermentation, durée de stockage) a été effectuée sur des échantillons récoltés en fin de campagne. Compte tenu des résultats précédents, témoins d'une activité lipasique faible sans lien direct avec les hypothèses formulées ainsi que des teneurs en AGL faibles, seules les teneurs en AGL ont été étudiées dans ce deuxième protocole. Ainsi l'influence du "génotype", du degré de maturité des fruits à la cueillette, du délai d'écabossage et de la durée de fermentation a été étudiée dans des conditions identiques à celles décrites dans le cas des fèves récolté en début de campagne.

Les résultats obtenus montrent que le "génotype" (fig. 33), le niveau de maturité des cabosses (fig. 34) et la pratique d'écabossage différé (fig. 35) n'ont pas d'influence sur la teneur en AGL. En effet, comme pour les cacaos de début de récolte, la teneur en AGL augmente légèrement en fonction de la durée de fermentation (fig. 36). Mais cette influence de la fermentation reste faible de même que celle de la durée de stockage car aucun cacao étudié ne présente une teneur en AGL hors norme.

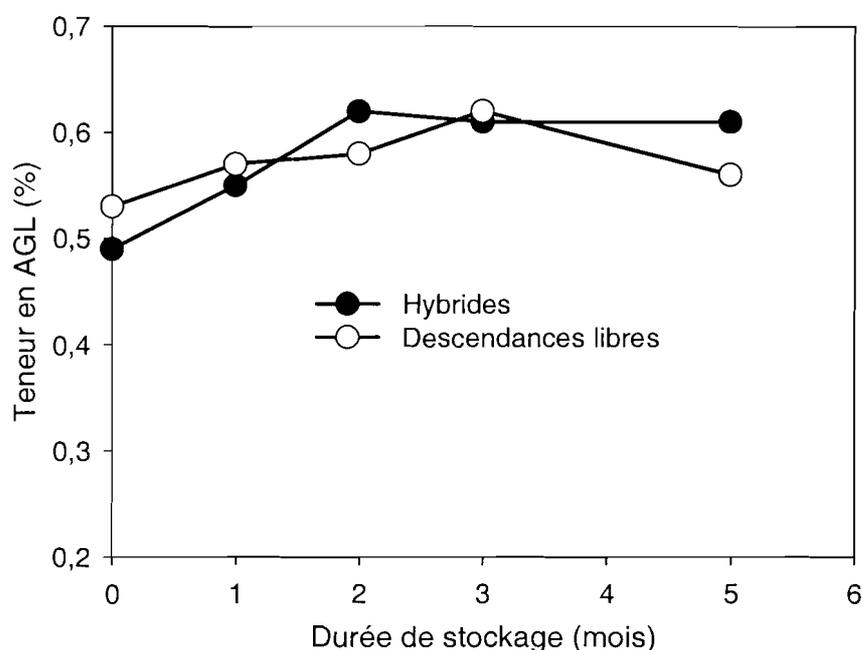


Figure 33. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du "génotype" du cacao récolté en fin de campagne

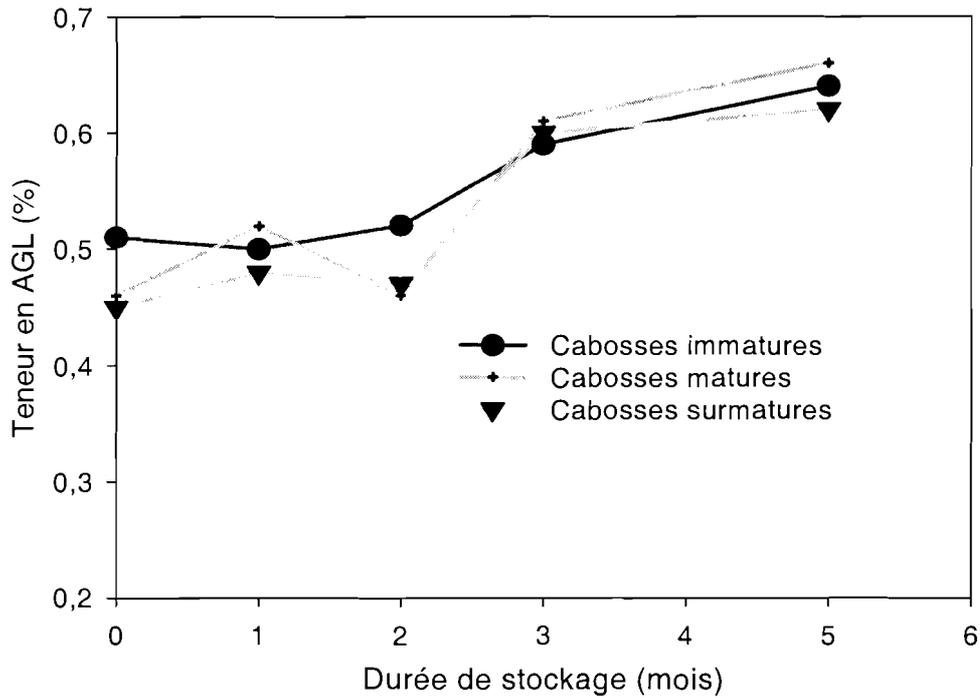


Figure 34. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du degré de maturité des fruits récoltés en fin de campagne.

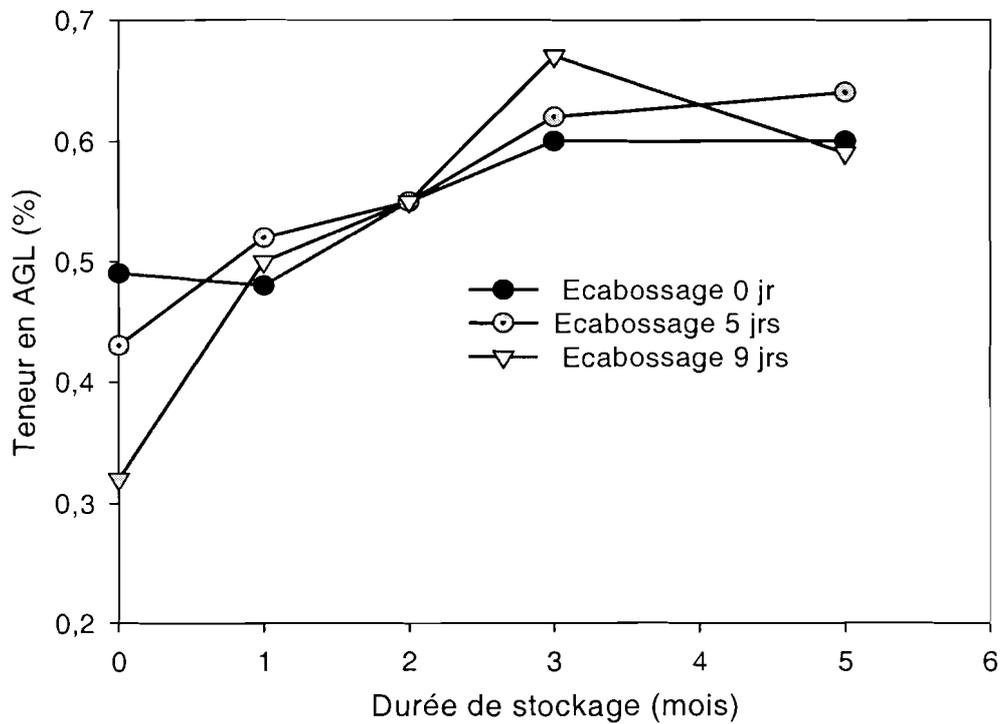


Figure 35. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du délai d'écabossage du cacao récolté fin de campagne

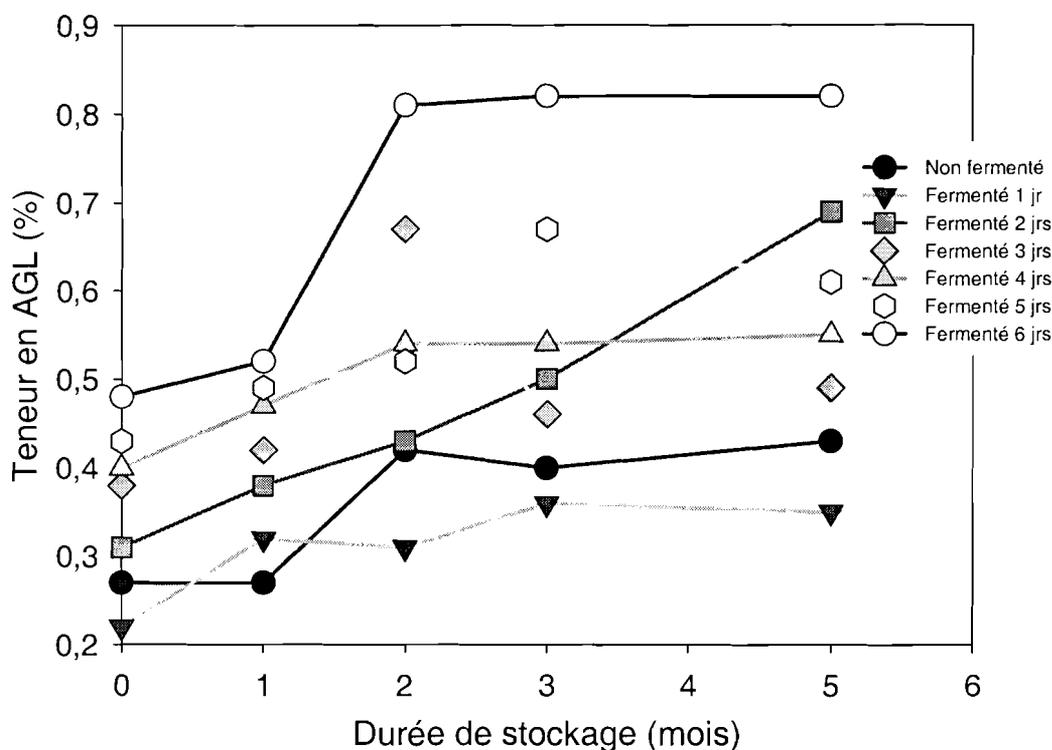


Figure 36. Evolution de la teneur en AGL des cotylédons durant le stockage en fonction du temps de fermentation du cacao récolté en fin de campagne.

Conclusion

Quelle que soit la date de récolte, l'activité lipasique et la teneur en AGL du cacao sain sont faibles que ce soit en fonction du "génotype" ou des traitements post-récoltes étudiés. A l'exception de la durée de fermentation, la teneur en AGL ne dépend pas des facteurs précédents. L'influence de la durée de fermentation reste cependant limitée car pour une durée comprise entre 0 et 6 jours aucun cacao ne contient une teneur en AGL supérieure à la norme.

Globalement, pour des cacaos sains dont les conditions de préparation ont été soigneusement contrôlées, la teneur en AGL est faible, augmente très peu et ne dépasse pas la norme admise. De même, l'activité lipasique mesurée à partir de du cacao sain est faible et ne semble pas être impliquée dans la formation des AGL du cacao. Les causes de la formation récurrente et saisonnière des fortes teneurs en AGL du cacao marchand en provenance de la Côte d'Ivoire restent inconnues. Seule une activité lipasique exogène notamment microbienne favorisée par d'autres facteurs comme la qualité des fèves, la formation des brisures de cacao et les conditions défectueuses de stockage du cacao reste envisageable.

CHAPITRE III.

*LES FACTEURS FAVORABLES A LA
FORMATION DES AGL DU CACAO.*

Les expérimentations conduites à partir de fèves saines n'ont pas montré des teneurs anormalement élevées en AGL. Lorsque la récolte et les traitements post-récolte sont contrôlés, les teneurs en AGL restent faibles. Il était alors envisageable que la formation d'AGL soit reliée à une activité lipasique d'origine exogène en liaison avec la présence de fèves défectueuses comme les fèves noires, collées ou brisées dans la filière (brisures naturelles). En effet, l'inclusion de telles fèves a été toujours considérée par les opérateurs de la filière comme étant responsable de graves défauts de qualité du cacao souvent constatés y comprise la teneur en AGL bien que cela n'ait jamais été réellement prouvée par une étude. Dans cette étude, la teneur en AGL et le dénombrement de la flore microbienne totale ont été conjointement mesurés à partir de la poudre de fèves (source exportateur 2002) entières (cotylédons + coques) en stockage. L'influence des facteurs telle que la qualité des fèves, la formation des brisures de caca et le développement de microorganismes dans les lots de cacao sur la formation des AGL des lots de cacao échantillonnés ont été étudiés.

III.1.- INFLUENCE DE LA METHODE D'ECHANTILLONNAGE SUR LA MESURE DE LA TENEUR EN AGL DU CACAO

Les résultats de mesure de la teneur en AGL à partir d'un échantillon homogène de cacao (poudre de cacao obtenue à partir de 500 g de fèves noires) confirment que la méthode de mesure utilisée, avec un faible coefficient de variation (2,8%), est répétable.

Selon le test de Fischer à 0,01, la comparaison des écarts-types des différentes mesures de teneur en AGL issues des différentes méthodes d'échantillonnage montre qu'il y a des différences significatives de précision entre la méthode de prélèvement des échantillons de cacao à partir de la poudre de cacao et celles qui procèdent par prélèvement de fèves. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre la teneur en AGL moyenne obtenue par prélèvement d'échantillons de poudre de cacao et celle obtenue par prélèvement d'échantillons de 15 à 20 fèves. Pour des prélèvements d'échantillons de 10 fèves, la teneur en AGL moyenne obtenue est significativement différente de celle mesurée à partir d'échantillons de poudre de cacao (Tab. 12).

De cette étude se dégagent plusieurs observations :

- les méthodes d'échantillonnage du cacao (par prélèvements de fèves de cacao et prélèvements de poudre de cacao) donnent, en moyenne, des résultats de teneurs en AGL identiques

- la précision de la méthode d'échantillonnage est plus grande avec des échantillons de poudre qu'avec des échantillons de fèves de cacao.

- la variabilité des résultats de mesure de la teneur en AGL régresse avec l'augmentation de la quantité de fèves contenues dans un échantillon de cacao prélevé.

Compte tenu de la taille réduite des échantillons analysés, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure de l'influence de la méthode d'échantillonnage sur la précision de la mesure de la teneur en AGL. Cependant, la méthode d'échantillonnage du cacao à partir de la poudre et l'échantillonnage des fèves donnent, en moyenne, des résultats identiques à condition d'e prélever une quantité de fèves plus grande et homogène. La détermination de cette quantité de fèves pourrait faire l'objet d'une étude.

Tableau 12. Analyse statistiques des valeurs de teneur en AGL mesurées à partir d'un même lot de cacao suivant différents deux différents modes d'échantillonnages.

Types de prélèvement des fèves	Taille de l'échantillon	Teneur en AGL moyenne	Ecart-types
Tirage aléatoire de lots de 10 à 11 g de poudre	8	3,33 ^a	0,09 ^a
Tirage aléatoire de lots de 10 fèves	8	1,24 ^{b,c}	0,69 ^{a,d}
Tirage aléatoire de lots de 15 fèves	6	2,55 ^{a,c}	2,08 ^{b,d,c}
Tirage aléatoire de lots de 20 fèves	6	2,40 ^{a,c}	1,30 ^{c,d,e}

Les moyennes affectées en exposant des mêmes lettres alphabétiques ne sont pas significativement différentes selon le test de Student à .P=0,9995

Les écarts-types affectées en exposant des mêmes lettres alphabétiques ne sont pas significativement différentes selon le test de Fischer à .P=0,99.

III.2.- INFLUENCE DE LA QUALITE, DE L'INTEGRITE PHYSIQUE DES FEVES ET DE LA DECONTAMINATION DES FEVES

L'influence de l'intégrité physique des fèves sur la formation d'AGL du cacao a été étudiée à partir d'un lot de fèves entières fractionné en deux échantillons. Les fèves du premier échantillon ont été grossièrement broyées et celles du second sont restées intactes.

Les deux échantillons ont été stockés dans les mêmes conditions. La teneur en AGL a été mesurée au cours du temps de stockage à partir de prélèvements de 35 à 40 g.

L'influence de la présence de microorganismes dans le cacao sur la teneur en AGL a été étudiée en décontaminant deux lots indépendants de brisures artificielles obtenues à partir de fèves noires. La décontamination a été réalisée par trempage dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 5%. Après séchage puis emballage aseptique des échantillons décontaminés dans des flacons stériles (35 à 40 g/flacon) a eu lieu le stockage dans les mêmes conditions que les échantillons non traités qui ont servi de témoins. La teneur en AGL a été mesurée au cours de 12 semaines de stockage.

Les résultats obtenus de cette étude montrent que les teneurs en AGL initiales des fèves collées (6,23%), des fèves noires (7,48%) ainsi que celle des brisures naturelles (10,3%) sont nettement plus élevées que la teneur en AGL des fèves saines (0,48%). En 12 semaines de stockage, la teneur en AGL des fèves saines varie seulement de 0,48 à 0,78% alors qu'elle passe à 13,79 et à 13% respectivement pour les brisures naturelles (fig. 37) et pour les fèves collées (fig. 38). La variation observée pour les fèves noires ne permet pas de caractériser l'évolution de leur teneur en AGL (fig. 39).

La teneur en AGL des brisures artificielles de fèves saines est passée de 0,55 à 9% (fig. 37). Celles des brisures artificielles des fèves collées et des fèves noires varient respectivement de 8,77 à 21,45% (fig.38) et de 8,88 à 18,8% (fig.39).

La teneur en AGL des brisures décontaminées reste pratiquement inchangée (8,17 à 8,66%) alors que celle des brisures non traitées augmente significativement ($P < 0,05$, analyses statistiques par régression quadratique par SigmaPlot V8.0) (fig. 40). Cette augmentation de la teneur en AGL pour les échantillons décontaminés a été observée dans les deux essais réalisés mais seul les résultats d'un essai ont été présentés.

Les fèves noires proviennent vraisemblablement des cabosses atteintes par les agents des maladies de pourriture comme les *Phytophthora* car ces agents rendent les fèves de cacao plus sensibles à l'action des moisissures des stocks comme les *Aspergillus*, les *Mucor* et les *Penicillium* (Renaud, 1954). La formation des AGL dans ce type de fèves est liée à l'action des moisissures qui s'y développent. Cependant, la variation observée ne permet pas de caractériser les fèves noires. Cette limite provient vraisemblablement d'une hétérogénéité des lots de cacao analysés (problème d'échantillonnage).

La formation de fèves collées peut être expliquée par l'immaturation des fruits ou par une mauvaise séparation des fèves du rachis lors de l'écabossage (Barel, 1998). La formation des AGL dans ce cas résulte probablement d'un séchage insuffisant des fèves. Cette

insuffisance de séchage est à relier à la présence d'une croûte superficielle qui enrobe plusieurs fèves. Cette croûte empêche l'évaporation de l'eau contenue à l'intérieur des fèves (Barel, 1998). Les fortes teneurs en eau qui en résultent favorisent le développement des moisissures qui peuvent sécréter des lipases extracellulaires. Ces lipases extracellulaires auraient pour action de contribuer à la formation des AGL en hydrolysant les triglycérides du beurre de cacao (Wood and Lass, 1985).

Les brisures naturelles résultent d'un séchage excessif du cacao suivi d'une manutention et d'un stockage du cacao favorables à la formation de brisures. La formation massive d'AGL dans ce type d'échantillon semble être favorisée par une plus grande surface de contact entre la matière grasse du cacao et le système lipolytique impliqué ce phénomène comme l'a supposé Oyeniran (1980). Cette observation est confirmée par la forte augmentation des AGL constatée à partir de toutes les brisures artificielles réalisées à partir des fèves quelle que soit leur qualité. Ceci révèle l'importance de l'intégrité physique des fèves (présence des coques) qui jouerait un rôle crucial dans le ralentissement du processus de formation des AGL en assurant une barrière face à l'action de lipases responsables de la formation des AGL du cacao. Ceci suggère clairement que l'activité lipasique impliquée dans la formation des AGL du cacao est d'origine exogène. Le rôle protecteur des coques dans la préservation de la qualité des aliments a été déjà démontré par Poisson et Cahagnier (1979) chez d'autres cultures comme les céréales. **Les fortes teneurs en AGL des fèves défectueuses sont dues à la qualité des fèves et à leur état physique.**

Au cours du stockage, l'augmentation sensible de la teneur en AGL déjà élevée des fèves défectueuses suggère que la durée de stockage a une influence sur l'évolution de la teneur en AGL. Cette influence augmente avec la teneur initiale, lorsque l'intégrité physique des fèves est mal préservée et si la qualité initiale du cacao est défectueuse. Ces observations indiquent évidemment que la formation des AGL du cacao est due à une activité lipasique d'origine exogène. L'arrêt de la formation des AGL observé après décontamination des brisures artificielles de fèves noires démontre que l'hydrolyse des triglycérides du beurre de cacao est due à la présence des microorganismes. Ceci met en évidence que l'activité lipasique d'origine exogène impliquée dans formation d'AGL du cacao provient des microorganismes. Des résultats comparables ont été obtenus pour l'acidification d'autres matières grasses comme le beurre de karité (Jacobsberg, 1977) et l'huile de palme (Hiol, 1999).

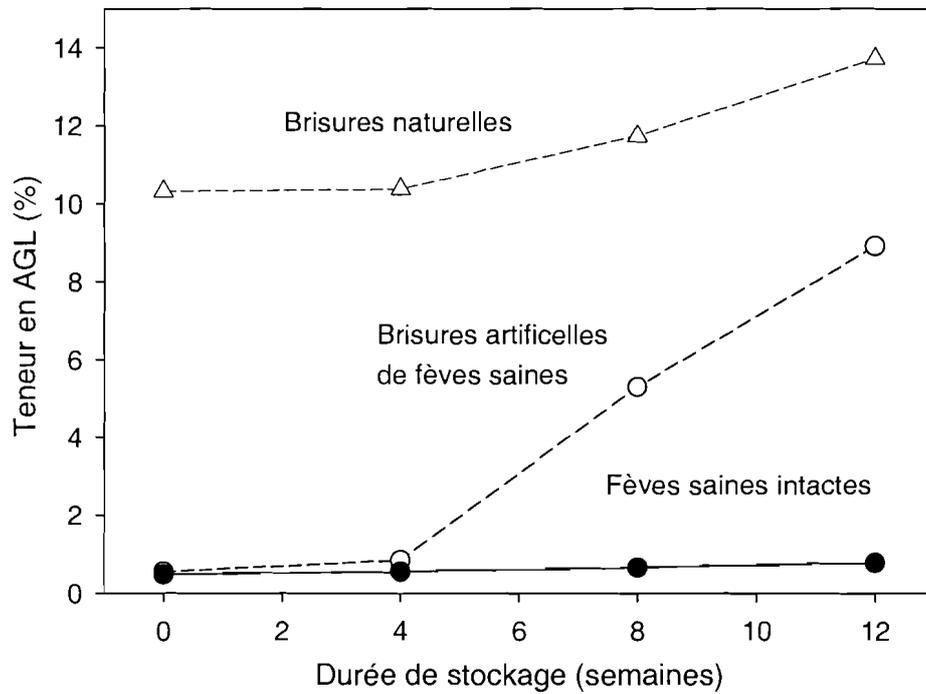


Figure 37. Influence de la formation de brisures artificielles de fèves saines et de brisures naturelles durant le stockage sur la formation des AGL du cacao

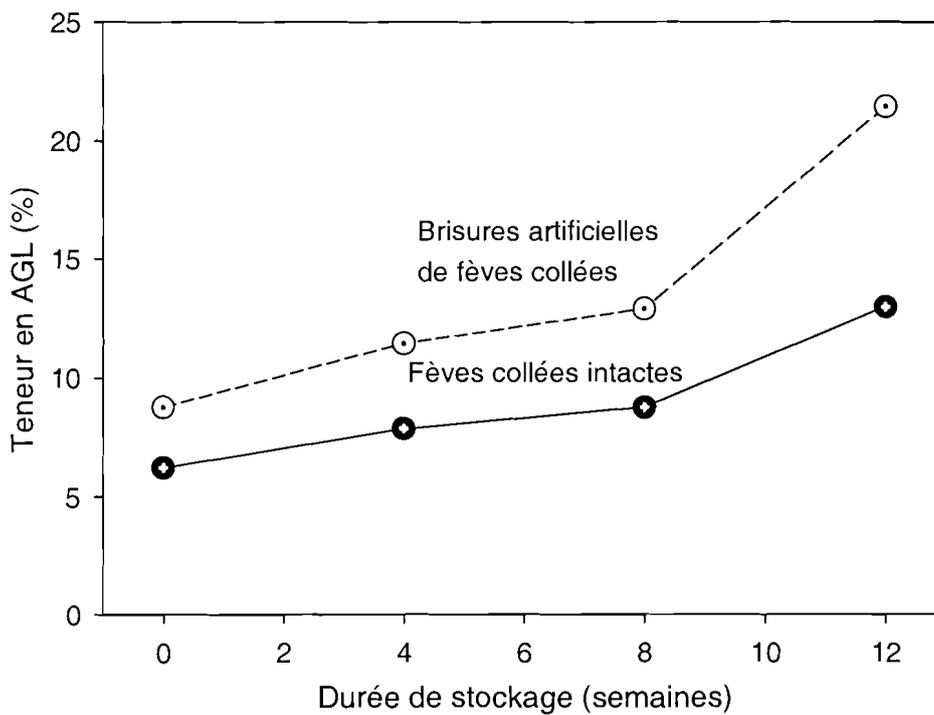


Figure 38. Influence de la formation des brisures artificielles de fèves collées durant le stockage sur la formation des AGL du cacao

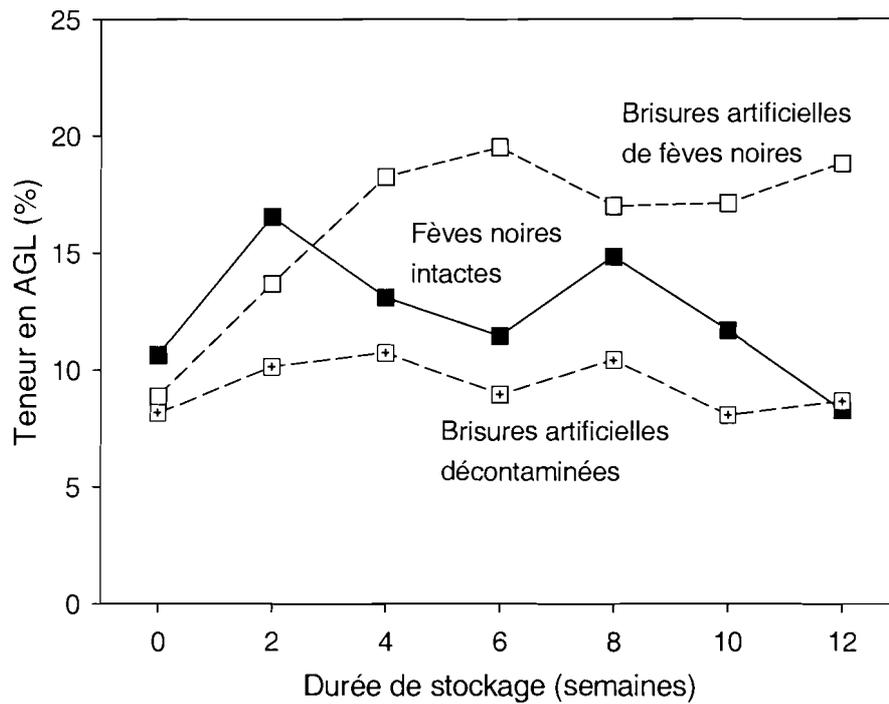


Figure 39. Influence de la formation de brisures artificielles de fèves noires et de leur décontamination durant le stockage sur la formation des AGL

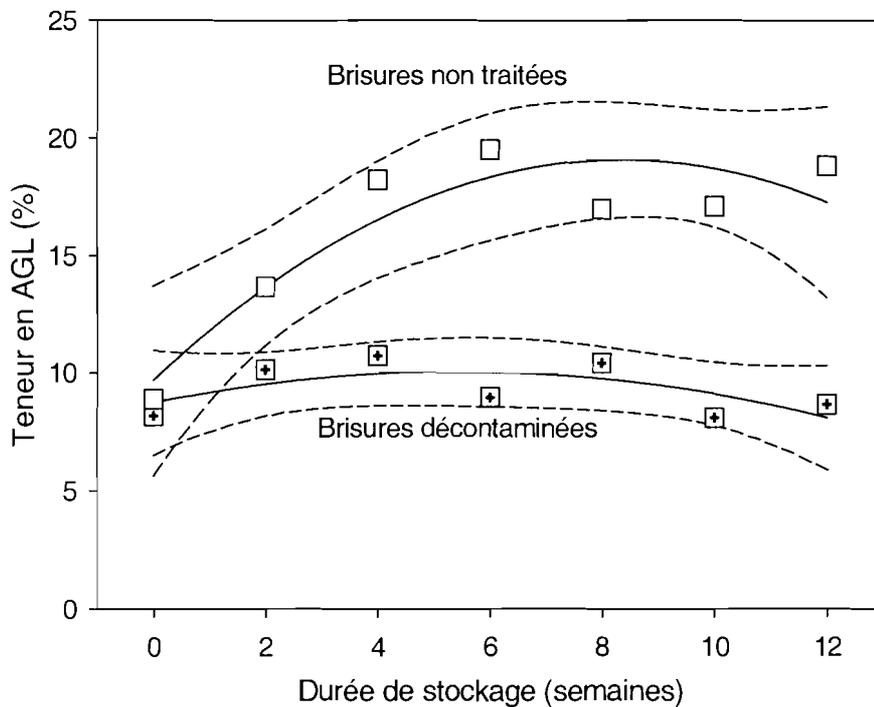


Figure 40. Régression quadratique (lignes solides) de l'évolution de la formation des AGL des brisures décontaminées et non traitées au cours du temps de stockage, les lignes en pointillés représentent les intervalles de confiance à $P < 0,05$ de chaque fonction de régression.

III.3.- INFLUENCE DU MODE DE STOCKAGE

III.3.1.- Mesure de la teneur en AGL par la méthode acido-basique

Il a été démontré que la formation des AGL du cacao est reliée à la présence de microorganismes dans le cacao. L'intérêt d'étudier l'influence du mode de stockage sur la formation des AGL du cacao provient du fait que l'aptitude d'un microorganisme à se développer sur un substrat est régulée par plusieurs facteurs dont la composition de l'atmosphère. Cette étude a été réalisée à partir des brisures artificielles des fèves noires d'un même lot fractionné en deux parts. Le stockage en atmosphère confinée a été réalisé en emballant les brisures de cacao dans des flacons hermétiquement fermés et celui en atmosphère renouvelée en plaçant le produit sur un plateau au contact de l'air circulant dans l'enceinte de l'armoire climatique. Deux essais indépendants ont été réalisés.

En 12 semaines de stockage, la mesure de la teneur en AGL par la méthode acido-basique montre dans le premier essai que la teneur en AGL du cacao passe de 8,3 à 18,8% pour les brisures conservées en atmosphère confinée et de 8,3 à 13% pour celles stockées en atmosphère renouvelée (fig. 41a). Dans le second essai, la teneur en AGL passe de 3,69 à 17% et à 15% respectivement pour les brisures en atmosphère confinée et pour celles conservées en atmosphère renouvelée (fig. 41b).

Dans les deux essais, la teneur en AGL des brisures en atmosphère confinée est plus forte que celle des brisures en atmosphère renouvelée. A partir de ces résultats, il apparaît évident que le stockage confiné favorise plus la formation des AGL du cacao par rapport au stockage en atmosphère renouvelée. **Le mode de stockage du cacao a donc une incidence sur la formation des AGL du cacao. Mais les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur la nature de cette influence.**

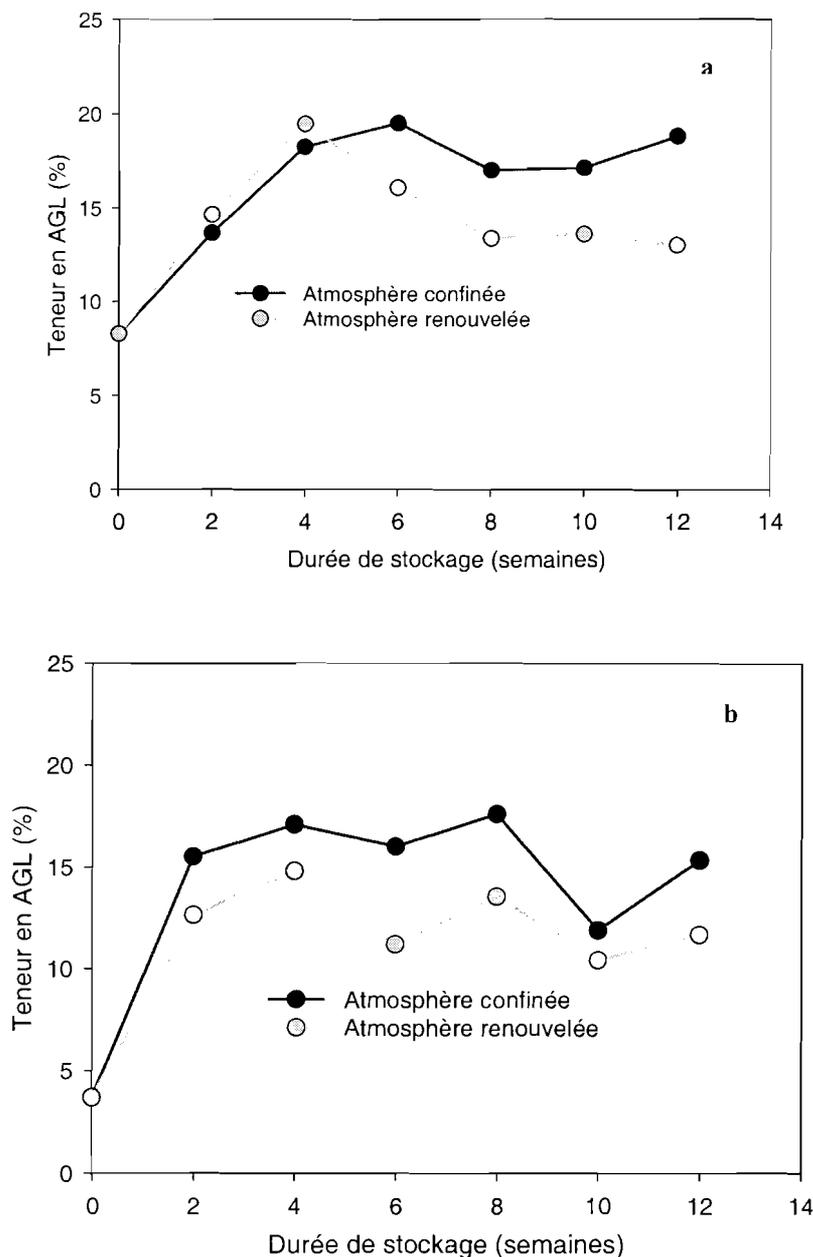


Figure 41. Influence du mode de stockage sur la formation des AGL des brisures de fèves noires: a) essai 1, b) essai 2

III.3.2.- Caractérisation des AGL majeurs du beurre de cacao et évaluation de la teneur en AGL par chromatographie en phase gazeuse

Afin de conclure sur l'influence du mode de stockage du cacao sur la formation des AGL, nous avons jugé utile d'étudier la qualité des différents AGL majeurs présents dans le beurre cacao extrait des brisures en fin des deux types stockage employés. Au cours de cette étude, bien que de manière générale, l'acide myristique (C14 :0) n'est pas considéré comme un acide gras majeur du beurre de cacao et que les données de la littérature signalent rarement

sa présence, nous avons pris en compte sa teneur dans l'expression de l'acidité absolue puisque nous l'avons identifié.

La caractérisation des AGL du beurre de cacao par chromatographie en phase gazeuse (CPG) montre la présence des principaux acides gras (acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique) et de l'acide myristique que l'échantillon ait été conservé en atmosphère confinée ou renouvelée (fig. 42a et b). La quantification des principaux acides gras du beurre de cacao pour *l'essai 1* montre les mêmes teneurs relatives en acide palmitique et en acide stéarique quel que soit le mode de stockage employé. En revanche, l'acide oléique est en quantité plus importante en atmosphère renouvelée qu'en atmosphère confinée. L'inverse est observé pour l'acide linoléique. Les teneurs absolue en AGL déterminées par CPG à partir de l'ensemble d'acides gras identifiés, bien qu'inférieure aux teneurs déterminées par la méthode acido-basique, confirment que la teneur en AGL de l'échantillon stocké en atmosphère confinée est supérieure à celle de l'échantillon stocké en atmosphère renouvelée (Tab. 13).

Tableau 13. Teneur relative en AGL majeurs identifiés par CPG (%) du beurre de cacao des brisures de fèves noires conservées (12 semaines, 27°C) en atmosphère renouvelée et en atmosphère confinée : *essai 1*.

AGL	Brisures stockées en conditions renouvelées	Brisures stockées en conditions confinées
C16:0	21,83	22,6
C18:0	42,80	41,7
C18:1	30,5	20,6
C18:2	4,9	15,04
Teneur absolue (C14 :0 inclue)	5,91±0,28	9,57±0,41

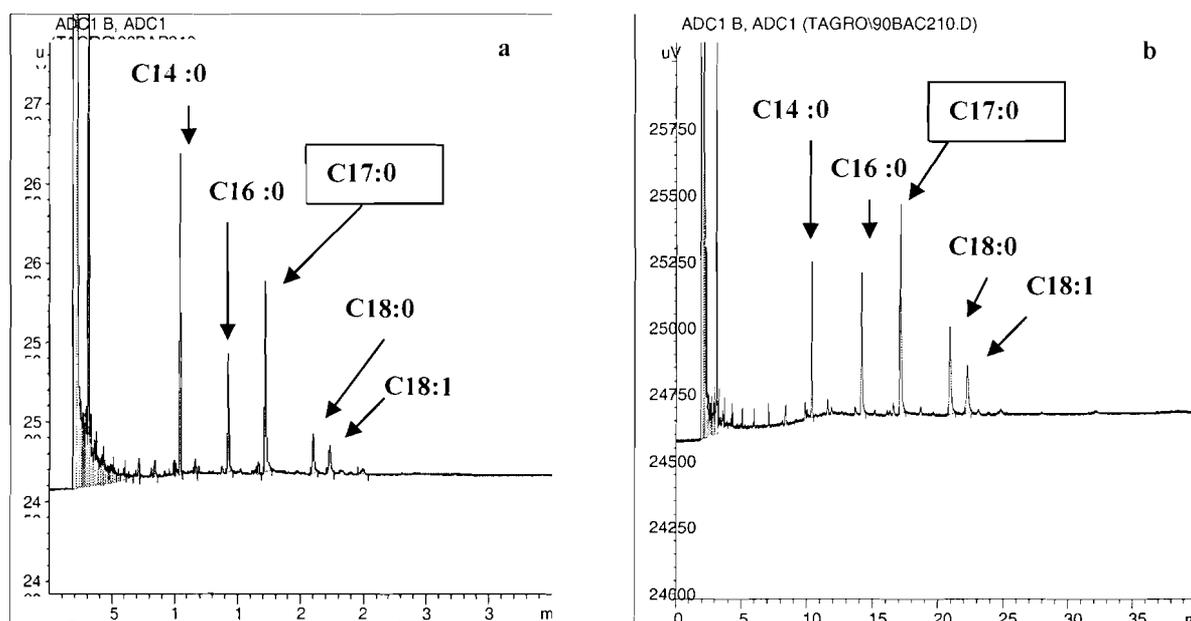


Figure 42. Chromatogrammes des AGL majeurs du beurre de cacao des brisures de fèves noires stockées 12 semaines **a)** en atmosphère renouvelée et **b)** en atmosphère confinée : essai 1

Comme dans l'essai 1, la caractérisation des AGL du beurre de cacao par chromatographie en phase gazeuse montre la présence des mêmes principaux acides gras (acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique) et de l'acide myristique quel que soit le type de stockage adopté dans l'essai 2 (fig. 43a et b). En revanche pour cet essai, l'acidité du beurre extrait des brisures stockées en atmosphère renouvelée est supérieure à celle du beurre extrait des brisures stockées en atmosphère confinée. Quel que soit le mode de stockage, les acides palmitique, stéarique et oléique ont les mêmes teneurs relatives. Seule la teneur en acide linoléique est légèrement plus importante pour les brisures stockées en atmosphère renouvelée que pour les brisures stockées en atmosphère confinées (Tab. 14).

Tableau 14. Teneur relative en AGL majeurs par CPG (%) du beurre de cacao des brisures de fèves noires conservées (12 semaines, 27°C) en atmosphère renouvelée et en atmosphère confinée : essai 2.

AGL	Brisures stockées en conditions renouvelées	Brisures stockées en conditions confinées
C16:0	23,8	23
C18:0	39,5	41,1
C18:1	32,16	33,25
C18:2	4,20	2,68
Teneur absolue (C14 :0 incluse)	5,81±0,2	4,15±0,05

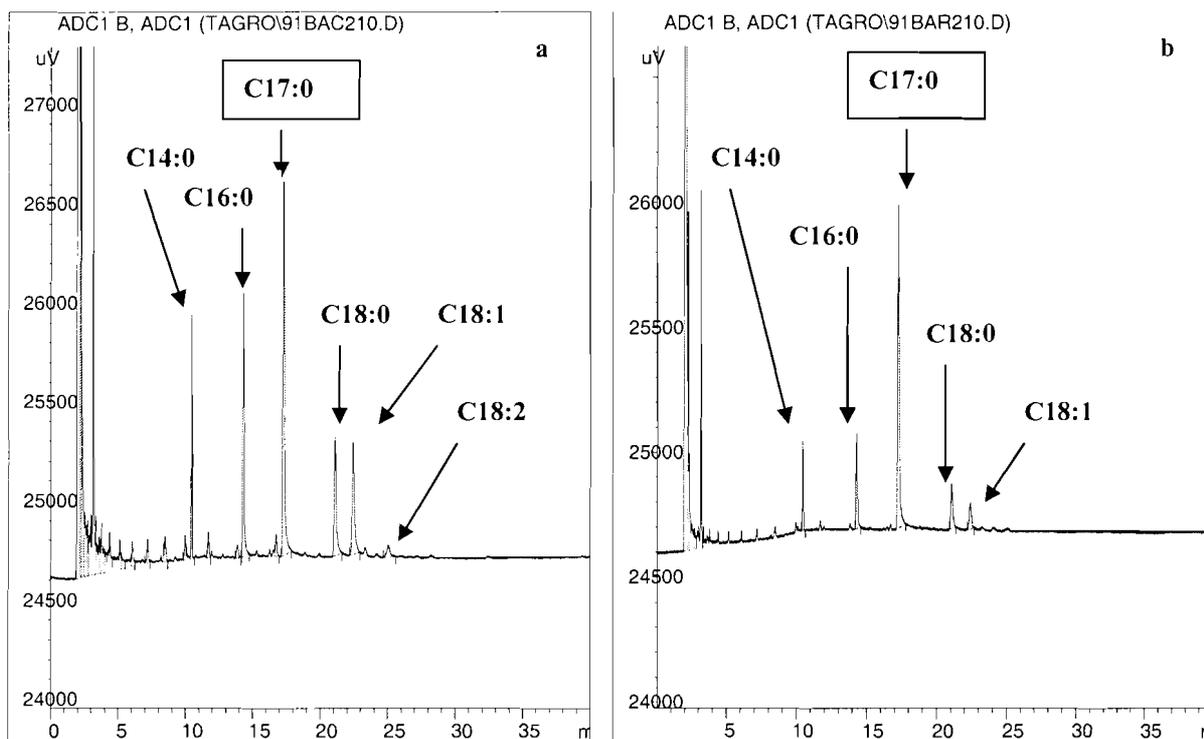


Figure 43. Chromatogrammes des AGL majeures du beurre de cacao des brisures de fèves noires stockées 12 semaines en atmosphère renouvelée (a) et en atmosphère confinée (b). *essai 2*

La teneur absolue en AGL des différents échantillons mesurée par la méthode acido-basique est plus importante que celle déterminée par la CPG. Cette différence peut s'expliquer par les pertes de matières qui ont lieu au cours des différentes étapes de la méthode chromatographique surtout lors du grattage de la bande des AGL à partir des plaques de silice utilisée dans la CCM, par l'évaluation de l'acidité du beurre par la CPG seulement à partir des acides gras qui ont pu être identifiés alors que la méthode acido-basique prend en compte toutes les formes d'acidité présentes dans la matière grasse. Toutefois, la valeur élevée de l'acidité déterminée par CPG de l'échantillon stocké en atmosphère renouvelée pour *l'essai 2* reste inexpliquée.

Il est clair que le mode de stockage du cacao a une influence certaine sur la teneur et la nature des AGL formés sous l'action de lipases microbiennes. Mais, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur la caractérisation de cette influence.

Conclusion

Les objectifs de cette étude étaient d'étudier les différents facteurs susceptibles d'influencer la formation des AGL du cacao.

Les teneurs anormalement élevées en AGL n'ont été observées qu'à partir des fèves défectueuses (fèves collées, noires et brisures naturelles). Ces teneurs augmentent durant le stockage alors que celles des fèves saines sont faibles et évoluent très peu. Quelle que soit la qualité des fèves, la teneur en AGL augmente avec la formation des brisures. Toutefois, l'hydrolyse du beurre de cacao est arrêtée lorsque le cacao a été décontaminé. Le mode de conservation des fèves a une incidence sur la formation des AGL mais les résultats obtenus ne permettent pas de caractériser cette influence.

CHAPITRE IV.

*ETUDE QUANTITATIVE ET
QUALITATIVE DE LA MICROFLORE
DES FEVES MARCHANDES ET DES
CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT DE
L'ACTIVITE LIPASIQUE DU RHIZOPUS
ORYZAE*

Nous venons de montrer que la formation des AGL du cacao est sous la dépendance de plusieurs facteurs dont principalement la présence de microorganismes, en combinaison avec la qualité et l'état physique des fèves. L'objectif de cette partie de notre étude est de déterminer résous la dépendance de quel(s) groupe(s) de microorganismes cette genèse des AGL s'opère.

IV.1.- EVOLUTION DE LA FLORE MICROBIENNE EN FONCTION DE LA QUALITE DES FEVES

Cette étude a porté sur 11 lots de cacao de diverses qualités autres que ceux étudiés précédemment. Ces lots ont été prélevés dans plusieurs régions cacaoyères de Côte d'Ivoire en février 2002. Le dénombrement de la flore microbienne a été effectué au cours du temps de stockage de fèves entières ou brisées par la méthode de dilutions successives à partir d'une solution mère préparée à partir de 5 g d'échantillons dans 45 ml de solution de peptone.

IV.1.1.- Evolution du nombre de bactéries

Le nombre initial de bactéries est plus faible dans les fèves saines ($\approx 10^4$ UFC/g de cacao) que dans les fèves collées et les fèves noires ($\approx 10^8$ UFC/g de cacao). En 3 mois de stockage, le nombre de bactéries reste constant dans tous les lots étudiés. (fig. 44a, b et c).

La flore bactérienne bien qu'importante en début de stockage ne subit pas d'évolution sensible au cours du stockage. Le nombre de bactéries reste constamment faible dans les fèves saines et plus important dans les fèves défectueuses. La prolifération des bactéries dans les fèves collées après un mois de stockage peut être due à la forte teneur en eau initiale des fèves (9-10%) ou à une contamination par les mains au cours de la manipulation. Globalement, la faible prolifération de la flore bactérienne dans les fèves quelle que leur qualité est vraisemblablement défavorisée par les conditions hydriques et thermiques de stockage.

Parallèlement, la teneur en AGL des fèves saines est très inférieure à celle des fèves défectueuses. Celle des fèves défectueuses de cette étude reste constante au cours du stockage. Ces observations ne permettent pas de conclure avec certitude que la flore bactérienne est impliquée dans l'hydrolyse du de cacao.

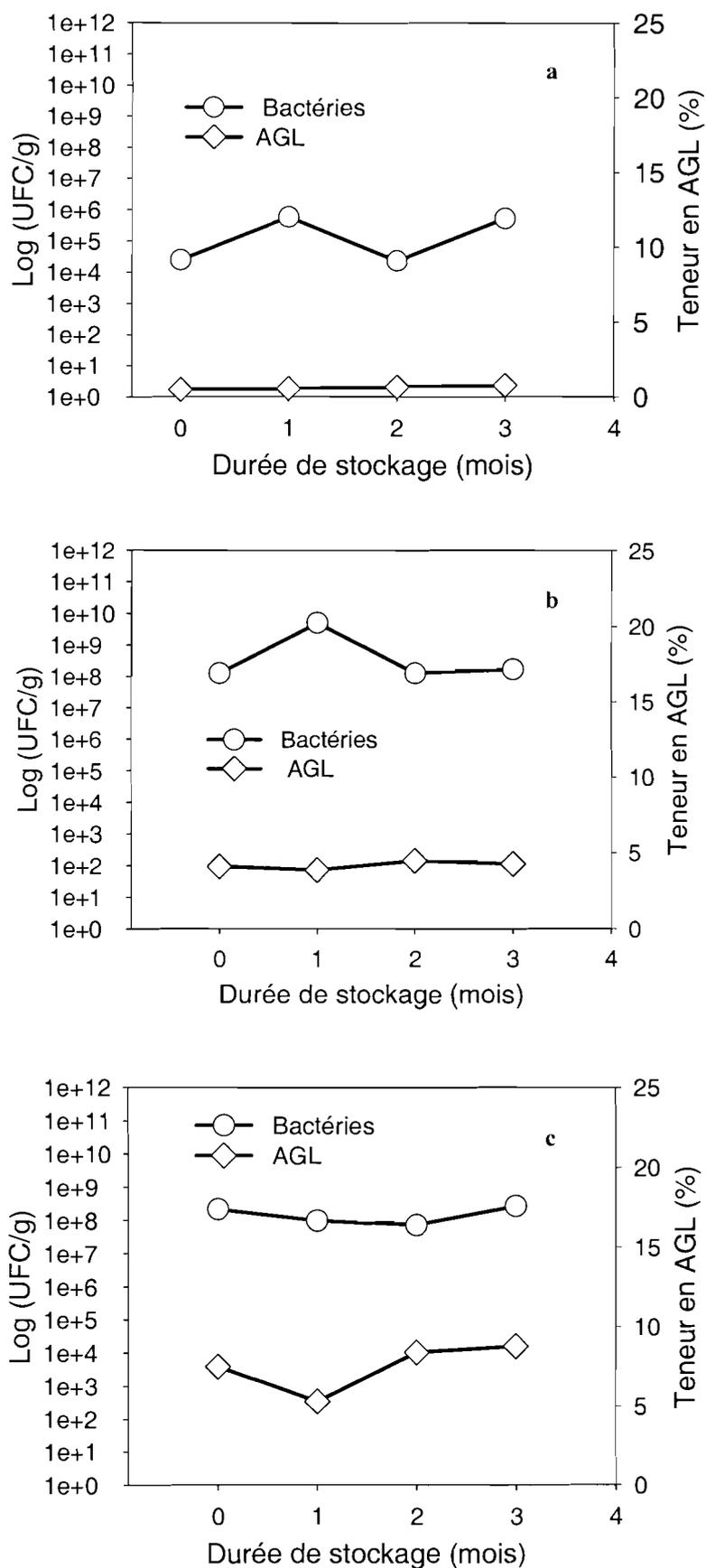


Figure 44. Evolution du nombre de bactéries et de la teneur en AGL des fèves saines (a), collées (b) et noires (c) durant le stockage

IV.1.2.- Evolution du nombre de moisissures

Le nombre initial de moisissures des fèves saines est faible ($\approx 10^2$ UFC/g de cacao), il est compris entre $\approx 10^5$ et $\approx 10^6$ UFC/g de cacao pour les fèves défectueuses. Ce nombre diminue progressivement dans les fèves saines au cours du stockage puis atteint un niveau non mesurable ($< 10^2$ UFC/g) par la méthode de dénombrement utilisée. En revanche, il reste constant dans les fèves défectueuses (fig. 45a, b, et c).

Le développement des moisissures dans les fèves défectueuses est expliqué par leur sensibilité importante à l'infection fongique déjà décrite par Wilbaux (1965). Un séchage insuffisant du cacao à l'origine des fortes teneurs en eau peut favoriser ce développement des moisissures.

Dans les fèves noires en particulier, le développement de moisissures peut avoir été favorisé par une attaque antérieure des cabosses au champ par les agents des maladies de la pourriture tels que les *Phytophthora* comme l'avait déjà signalé Renaud (1954). Certains auteurs comme Boussard (1982) et Barel (1995) ont signalé également qu'un lot de cacao peut devenir le siège d'une infection importante si des fèves affectées par les moisissures ou par les agents de pourritures y étaient incluses. Les renseignements relatifs à la traçabilité ou à l'itinéraire technique des lots de cacao analysés faisant défaut ou étant fragmentaires de façon générale, ils ne permettent pas de savoir ni l'état des cabosses ni les conditions de traitements post-récolte ayant conduit à la formation des fèves noires.

Le faible niveau de contamination du cacao sain par les moisissures est vraisemblablement dû à la compacité et aux conditions sanitaires des fèves. La régression du nombre de moisissures dans les fèves saines indique que ces fèves constituent un mauvais écosystème pour leur développement. La compacité et les conditions sanitaires de ces fèves sont des facteurs vraisemblablement défavorables au développement des moisissures. Toutefois, celles-ci semblent avoir rencontré des conditions favorables à leurs activités vitales dans les fèves défectueuses. L'évolution constante de ces moisissures peut être due à la méthode de numération utilisée. En effet, de par leur structure mycélienne, les champignons filamenteux ne peuvent être évalués en terme d'individus comme les bactéries et les levures (Guiraud, 1998).

En parallèle, la faible teneur en AGL des fèves saines est à relier à leur faible niveau de contamination par les moisissures. La forte teneur en AGL des fèves défectueuses alors très contaminées par les moisissures suggère que la formation des AGL du cacao peut être reliée au développement des moisissures.

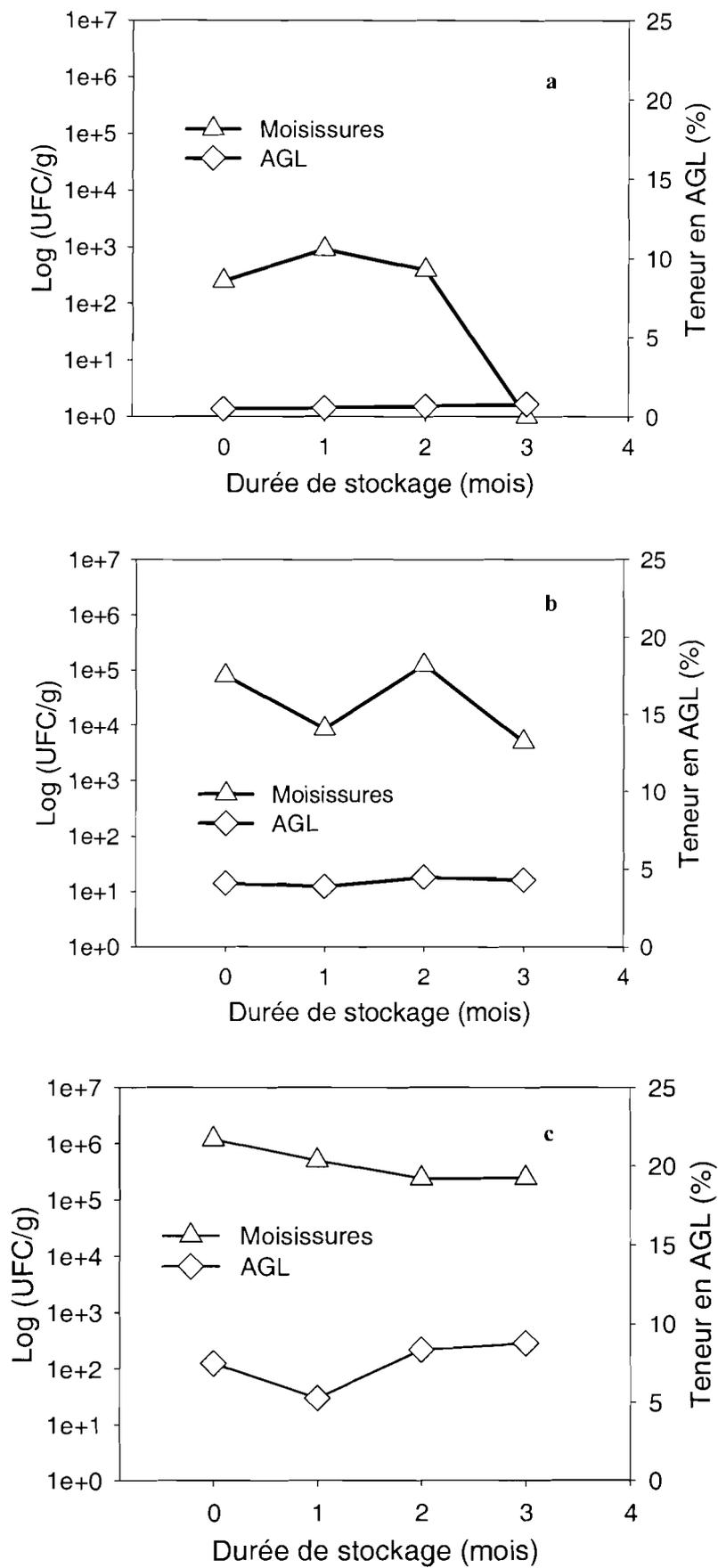


Figure 45. Evolution du nombre de moisissures et de la teneur en AGL des fèves saines (a), collées (b) et noires (c) pendant le stockage

IV.1.3.- Evolution du nombre de levures

D'importantes quantités ($\approx 10^6$ à 10^8 UFC/g de cacao) de levures ont été décelées dans les fèves quelle que soit la qualité du cacao. Au cours du stockage, la population de levures régresse sensiblement : elle diminue nettement dans les fèves défectueuses alors qu'elle a complètement disparu dans les fèves saines (fig. 46a, b et c).

La présence de levures dans le cacao peut s'expliquer par leur prolifération massive pendant la phase alcoolique de la fermentation du cacao où elles jouent très actif dans la dégradation des sucres de la pulpe en éthanol et en gaz carbonique (Ostovar et Keeney 1973). Contrairement à ces résultats, la présence de levures n'a pas été mise en évidence dans le cacao marchand (Guénot *et al.*, 1976).

La diminution du nombre de ces levures au cours du stockage peut s'expliquer soit par l'épuisement des substrats glucidiques, soit par un antagonisme entre elles et les autres microorganismes (bactéries et moisissures) ou encore par les conditions thermiques et hydriques du stockage. Parallèlement, tandis que les levures tendent à disparaître, la teneur en AGL des cacaos défectueux augmente. Ce qui suggère que les levures ne joueraient pas un rôle actif dans la formation des AGL.

Les bactéries et les moisissures sont les microorganismes les plus abondants dans le cacao marchand par rapport aux levures. La prolifération des bactéries et des moisissures au cours du stockage est d'autant plus constante que la qualité des fèves est défectueuse. Alors que quelle que soit la qualité des fèves la population de levures régresse au cours du stockage.

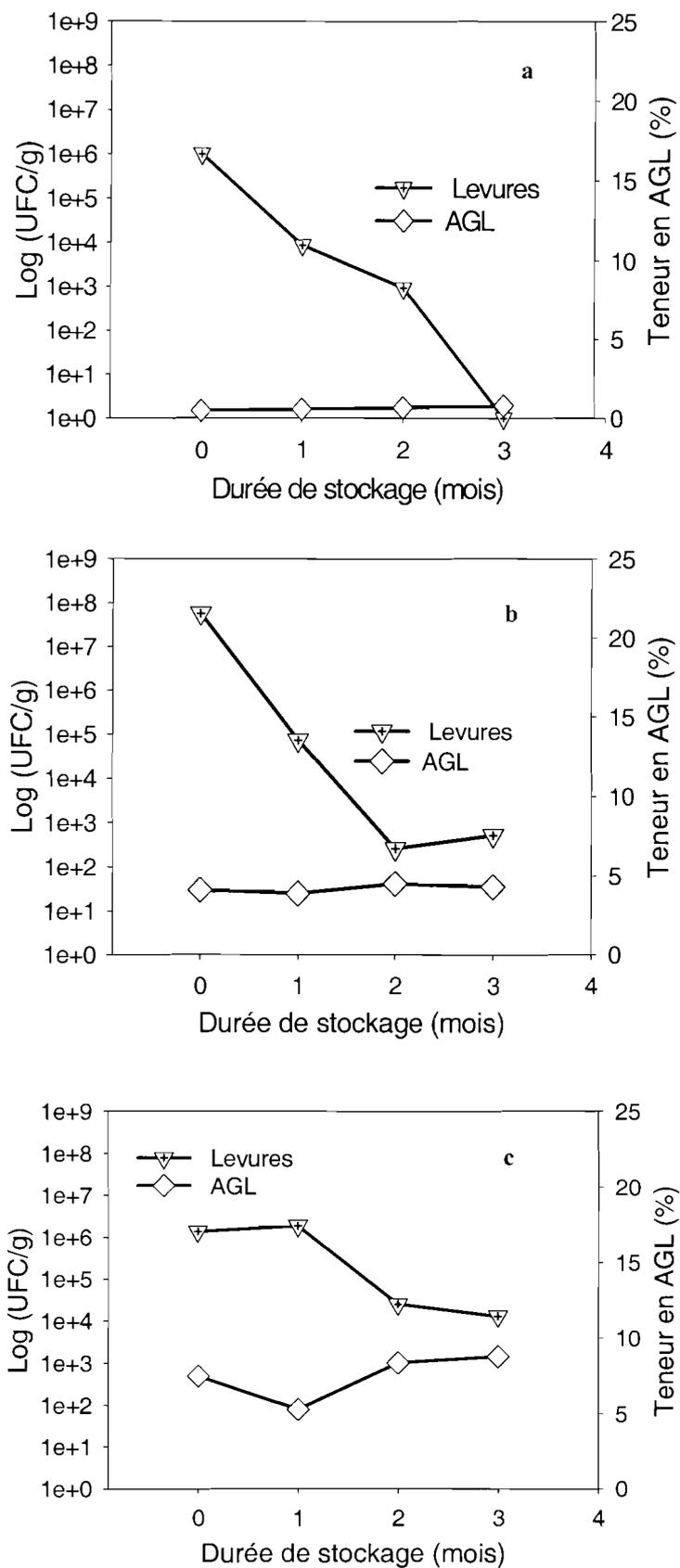


Figure 46. Evolution du nombre de levures et de la teneur en AGL des fèves saines (a), collées (b) et noires (c) durant le stockage

IV.2.- DETERMINATION DE LA NATURE DES MICROORGANISMES LIPOLYTIQUES

Les propriétés lipolytiques des microorganismes capables de produire de la lipase dot l'activité conduit à la formation des AGL ont été étudiées sur milieu Czapek additionné de rhodamine B et enrichi en substrat lipidique. Le complexe formé entre ces AGL et la rhodamine B est visionné par grâce à sa fluorescence aux rayons UV.

Aucune souche de levure n'a été déterminée car les levures isolées lors de notre étude ne sont pas lipolytiques.

Parmi les 10 souches bactériennes décelées, seulement 3 souches lipolytiques ont été déterminées par l'utilisation des tests de coloration et de la galerie API 20E spécifique pour l'identification des entérobactéries. Parmi ces bactéries lipolytiques, *Pseudomonas cepacia*, *Proteus mirabilis*, *Chrysoeomonas luteola* ont été identifiées à un seuil de probabilité de 80%. Ces souches lipolytiques ubiquistes ne sont pas dominantes parmi la flore bactérienne. Leur présence dans le cacao n'affecterait pas particulièrement la formation des AGL.

La détermination des moisissures a été effectuée par l'Institut de Mycologie de l'Université Catholique de Louvain (Belgique). Il a été identifié *Abisidia corymbifera* (Cohn) Saccardo & Trotter (fig. 47a), *Rhizopus oryzea* Went & Prinsen Geerlings (fig. 47b), *Aspergillus tubingensis* (Schober) Mosseray (fig. 47c), *Aspergillus flavus* Link : Fries (fig. 47d), *Aspergillus tamaris* Kita (fig. 47e), *Penicillium chrysogenum* Thom (fig. 47f), *Monilia sp.* (fig. 47g). La présence de ces moisissures à l'exception de *Monilia sp.* dans le cacao marchand avait été déjà signalée par la littérature (Hansen, 1975, Niles, 1981, Dharmaputra *et al.*, 1999) et dans divers autres produits végétaux stockés comme le tournesol (Guénot et Poisson, 1974), les graines d'arachide (Waliyar et Zambettakis, 1979), les céréales (Poisson *et al.*, 1981) et le café (Garay *et al.*, 1987). Ces moisissures rencontrées dans l'environnement ont dû contaminé le cacao pendant les différentes étapes de traitements post-récoltes à partir de l'air, du sol, des outils d'écabossage et de fermentation. Leur développement ultérieur a donc pu être favorisé par un mauvais séchage du cacao ou un stockage défectueux.

Toutefois il est probable que la formation des AGL du cacao se réalise sous l'action d'activités de lipases produites par les moisissures considérées plus fortes que celles d'origine bactérienne (Mossel *et al.*, 1995).

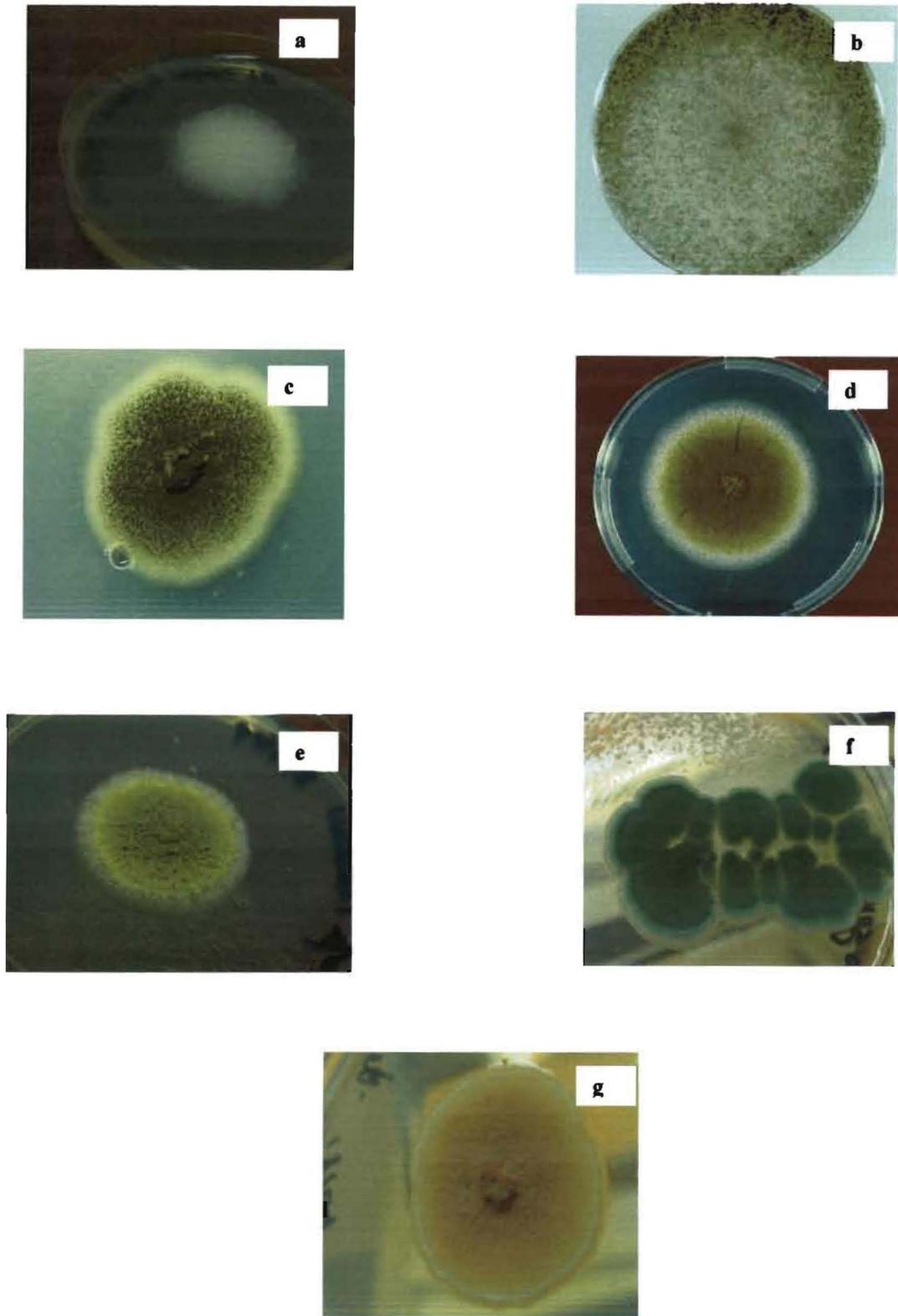


Figure 47. Culture des différentes espèces de moisissures isolées du cacao marchand sur milieu PDA : *Absidia corymbifera* (a), *Rhizopus oryzae* (b), *Aspergillus tubingensis* (c), *Aspergillus flavus* (d), *Aspergillus tamaris* (e), *Penicillium chrysogenum* (f), *Monilia* sp. (g)

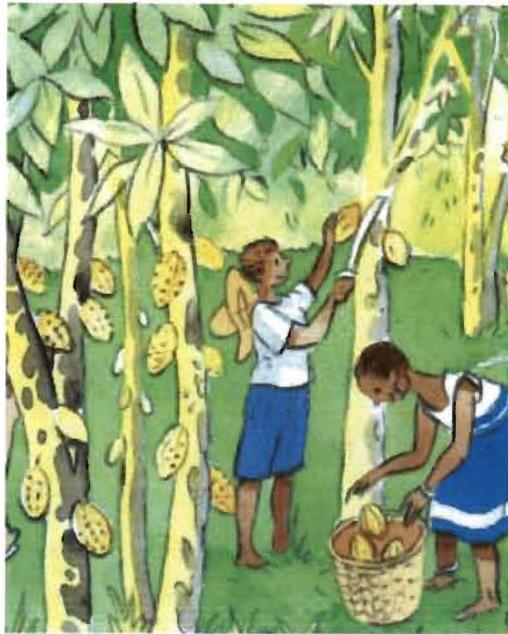


Figure 6. La récolte du cacao par des paysans africains. Source : <http://www.perso.wanadoo.fr/rene.oster/chocolat1>

I.4.2.- L'écabossage

Contrairement aux apparences, l'écabossage n'est pas une opération mineure qui ne consisterait pas qu'à ouvrir les cabosses pour en extraire les graines (Barel, 1995). L'ouverture des cabosses, encore aujourd'hui manuelle, s'effectue avec un couteau ou une machette ou encore en les frappant avec un morceau de bois ou une pierre. Bien que très répandu, l'usage d'outils tranchants est à proscrire afin de ne pas blesser les graines. Il a été conseillé durant longtemps d'écabosser le cacao immédiatement après la récolte. Cependant, différentes études (Barel, 1987 ; Mossu, 1990) ont montré que parfois la pratique d'un écabossage différé est bénéfique pour la diminution de l'acidité des fèves. La durée idéale de ce stockage varie de 5 à 6 jours selon les lieux de production (Barel, 1998). Le planteur ivoirien, par exemple, a l'habitude de stocker ses cabosses de cacao sur la plantation en tas (fig. 7) par manque de main d'œuvre pour l'écabossage (fig. 8) (Guéhi, 2002). Une fois les cabosses ouvertes, il est important de bien séparer les fèves les unes des autres non seulement mais aussi du rachis afin d'éviter l'accolement de fèves qui aboutit à la formation d'agglomérats de fèves ou grabos. En effet, la présence du rachis et les fèves collées qui en découlent empêchent une pénétration correcte de l'air dans la masse. Ceci entraîne d'importants problèmes de fermentation. De plus, ces agglomérats forment des masses compactes qui ne peuvent être séparées qu'en produisant des brisures si les fèves collées sont

IV.3.- FREQUENCE ET ABONDANCE DES DIVERSES ESPECES DE MICROORGANISMES LIPOLYTIQUES ISOLEES DU CACAO

La fréquence et l'abondance des microorganismes lipolytiques notamment des moisissures ont été déterminées dès le prélèvement des échantillons. Un intérêt tout particulier a été porté aux moisissures car leur nombre élevé dans les fèves défectueuses contenant des teneurs élevées en AGL semble être en relation la formation des AGL du cacao. Par fréquence, il faut entendre le nombre de fois où une espèce a été décelée par rapport au nombre total d'échantillons examinés. L'abondance rend compte de la quantité moyenne de germes fongiques viables polluant le produit (Moreau, 1979).

Les résultats de cette étude montrent que les Mucorales sont à la fois les plus fréquentes et abondantes. Ensuite viennent les *Aspergillus* avec *Aspergillus tubingensis* la plus fréquemment décelée et la plus abondante, suivie de *Aspergillus flavus* et de *Aspergillus tamarii*. Cette dernière semble se rencontrer occasionnellement dans les fèves cacao intactes et plus fréquemment après la formation des brisures. Les *Penicillium* représentés par *P. chrysogenum* sont très fréquents mais peu abondants dans le cacao. Enfin, *Monilia sp.* est faiblement abondante et rencontrée dans un nombre réduit d'échantillons (Tab. 15).

La difficulté de déceler *Monilia sp.* semble provenir du fait qu'elle soit un agent de la maladie de pourritures. Christensen et Kaufmann (1965) pensent que les moisissures qui attaquent les denrées alimentaires au champ tendent à céder la place aux moisissures de stocks (*Aspergillus*, *Penicillium*) pendant le stockage des produits. En fait, cette hypothèse n'est pas totalement vérifiée car selon Mossel (1995) certaines moisissures (du genre *Alternaria*) qui attaquent le végétal au champ sont capables de se développer pendant le stockage des produits.

La présence dominante des Mucorales, déjà décrite par Guénot *et al.* (1976) peut s'expliquer par le fait que le cacao est un substrat propice au développement de ces moisissures. En effet, généralement lipolytiques (Hiol, 1999), elles seraient capables de vivre au dépens de n'importe quel substrat lipidique. La présence des *Aspergillus* est expliquée par leurs caractéristiques de moisissures des stocks déjà décrites par Christensen et Kaufmann (1965) mais aussi par leurs potentialités à produire des lipases.

Les Mucorales sont donc les moisissures les plus abondantes et les plus fréquemment rencontrées dans les fèves de cacao marchand, viennent ensuite les *Aspergillus* puis les *Penicillium*.

Tableau 15. Analyse de la fréquence et de l'abondance des souches de moisissures isolées à partir de 16 échantillons de fèves de cacao marchand en provenance de Côte d'Ivoire.

Moisissures	Fréquence	Abondance
<i>Absidia corymbifera</i> (Mucorales)	++++	++++
<i>Rhizopus oryzae</i> (Mucorales)	++++	+++
<i>Aspergillus tubingensis</i>	+++	++
<i>Aspergillus flavus</i>	+++	+
<i>Aspergillus tamaris</i>	+	Non décelée
<i>Penicillium chrysogenum</i>	++++	++
<i>Monilia sp.</i>	++	+

Fréquence : +++++ très fréquentes (> 80%)
 +++ fréquentes (50 à 80%)
 ++ Occasionnelles (10 à 50%)
 + Accidentelles (< 10%)

Abondance : +++++ très abondantes (> 100000 UFC/g de cacao)
 +++ Abondantes (50 à 100000 UFC/g de cacao)
 ++ Assez abondantes (10 à 50000 UFC/g de cacao)
 + Peu abondantes (< 10000 UFC/g de cacao)

VI.4.- RELATION ENTRE LA VARIATION DE LA TENEUR EN AGL ET LE DEVELOPPEMENT DES MICROORGANISMES DANS LES FEVES DE CACAO

Le développement de microorganismes est considéré comme un facteur majeur associé à la dépréciation de la qualité des aliments au cours du stockage. Dans un certain nombre de cas, des relations ont été bien établies entre le développement des moisissures et certains types de dégradations des substrats (Poisson et Cahagnier, 1979). Dans cette étude, des essais de mise en relation entre la formation des AGL et la présence des microorganismes (bactéries, moisissures lipolytiques, flore lipolytique totale) ont été mis en œuvre par des analyses statistiques des données obtenues au cours du stockage. Une analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SAS.

Ces analyses montrent que la probabilité pour qu'il y ait une relation entre la formation des AGL et la présence de la flore lipolytique totale (bactéries et moisissures) est faible pour chaque mois de stockage considéré. Cette probabilité est également faible pour la relation entre la teneur en AGL et la présence des bactéries lipolytiques. En revanche, elle probabilité est forte lorsque l'on considère toute la durée de stockage (P=0,0003). La probabilité pour que la présence de forte teneur en AGL soit liée à celle des moisissures est significative pour chaque mois de stockage considéré individuellement et hautement significative pour toute la durée totale du stockage (P<0,0001) (Tab. 16).

Ces résultats permettent de conclure que la formation des AGL est liée à la présence des microorganismes et que l'hydrolyse des triglycérides du beurre de cacao est due en grande partie à l'action des microorganismes lipolytiques notamment les moisissures.

Ainsi la flore lipolytique totale contribue certes à la formation des AGL du cacao mais le développement des moisissures y tient une part prépondérante comme l'ont déjà soutenu Guénot *et al.* (1976). Un phénomène analogue a été déjà démontré dans l'acidification de l'huile de palme pendant le stockage des fruits de palme (Hiol, 1999), dans celle du beurre de karité pendant le stockage des amandes de karité (Jacosberg, 1977) ainsi que dans celle de l'huile de tournesol pendant le stockage des akènes de tournesol (Guénot et Poisson, 1974)

Tableau 16. Probabilités de la relation entre la teneur en AGL et la présence des microorganismes lipolytiques durant le stockage. (N=16 échantillons)

Durée de stockage (mois)	Moisissures lipolytiques	Bactéries lipolytiques	Flore lipolytique totale
Avant le stockage	P=0,0065** R ² =0,65	P =0,1182 ^{ns} R ² =0,41	P =0,3111 ^{ns} R ² = 0,27
1	P =0,0005*** R ² =0,77	P =0,0864 ^{ns} R ² =0,44	P =0,0842 ^{ns} R ² = 0,40
2	P =0,03* R ² =0,52	P =0,0029** R ² =0,69	P =0,0107* R ² = 0,61
3	P =0,0586 ^{ns} R ² =0,48	P =0,1659 ^{ns} R ² =0,36	P =0,17 ^{ns} R ² = 0,36
Pendant toute la durée de stockage	P <0,0001*** R ² =0,48	P =0,0003*** R ² =0,44	P =0,0011** R ² = 0,40

^{ns} non significatif, * peu significatif, ** significatif, *** hautement significatif

IV.5.- ETUDE DE LA CROISSANCE DES MOISSURES EN PRESENCE DU BEURRE DE CACAO ET BIOSYNTHESE DE LA LIPASE DU RHIZOPUS ORYZAE

III.5.1.- Croissance des moisissures en présence de différents substrats lipidiques.

L'étude des propriétés lipolytiques des moisissures a montré que toutes les souches de moisissures isolées du cacao sont capables de produire de la lipase. Les activités des lipases produites par les moisissures en présence de substrats lipidiques ont été comparées par l'étude de la croissance des colonies sur milieu riche en huile de colza ou en beurre de cacao. La croissance de chaque souche a été étudiée au cours du temps de culture par la mesure du diamètre de la zone de fluorescence à la lumière ultra violette à l'aide d'un pied à coulisse à partir de trois boîtes de Pétri.

Les résultats montrent que la croissance de *R. oryzae* et de *A. corymbifera* est supérieure à celle des autres moisissures que ce soit en présence de l'huile de colza ou du beurre de cacao. La croissance de *Monilia sp.* est plus forte en présence du beurre de cacao qu'en présence de l'huile de colza. Ses propriétés lipolytiques dépendent de la qualité du substrat lipidique en présence. *P. chrysogenum* pousse moins bien en présence du beurre de cacao qu'en présence de l'huile de colza. A l'inverse de *A. tamaritii*, les colonies de *Aspergillus flavus* et de *A. tubingensis* croissent plus vite en présence du beurre de cacao qu'en présence de l'huile de colza (fig. 48 et 49).

La forte croissance des espèces de *R. oryzae* et de *A. corymbifera* sur milieu enrichi en substrats lipidiques peut s'expliquer par leur appartenance aux Mucorales dont les propriétés lipolytiques sont fortes (Hiol, 1999). La fréquence, l'abondance élevées de *R. oryzae* et de *A. corymbifera* ainsi que la relation établie entre la formation des AGL du cacao et le développement des moisissures suggèrent que ces deux espèces jouent un rôle actif dans la formation des AGL. La croissance relativement lente de *P. chrysogenum* en présence du beurre de cacao et en présence de l'huile de colza démontre que cette souche dégrade mal les substrats lipidiques. De ce fait, sa présence dans les fèves ne peut être mise en relation avec l'hydrolyse du beurre de cacao. Les *Aspergillus* ont une croissance spécifique à chaque espèce. *A. flavus* et *A. tubingensis* croissant plus vite en présence du beurre de cacao qu'en présence de l'huile de colza contrairement à *A. tamaritii* semblent donc plus impliquées dans l'hydrolyse du beurre de cacao que *A. tamaritii*.

Les fortes potentialités lipolytiques de *Monilia sp.* permettent de supposer que cette moisissure joue également un rôle dans la formation des AGL du cacao. Mais ses caractéristiques de moisissure des champs ; et ses faibles abondance et fréquence permettent de supposer qu'elle jouerait beaucoup plus un rôle de facilitation pour le développement des moisissures des stocks

Au regard des fortes potentialités lipolytiques de toutes les souches de moisissures isolées des échantillons de cacao marchand à l'exception *P. chrysogenum*, il apparaît clairement que les moisissures sont à l'origine de la formation des AGL du cacao.

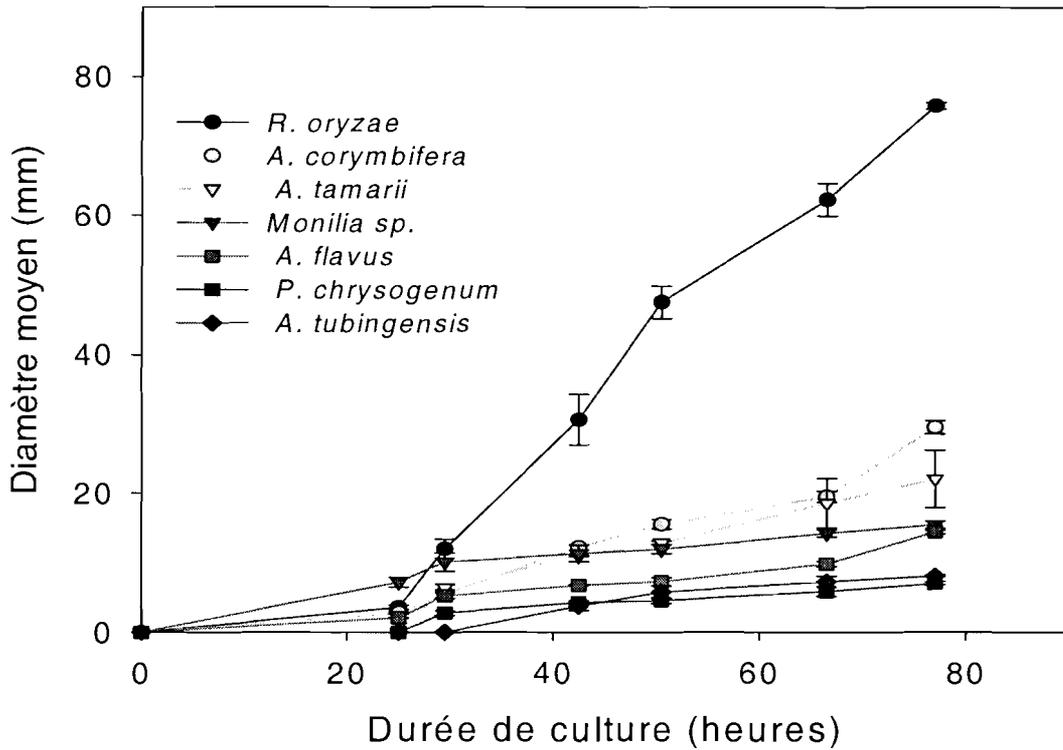


Figure 48. Croissance des moisissures isolées du cacao marchand sur milieu Czapeck en présence de l'huile de colza

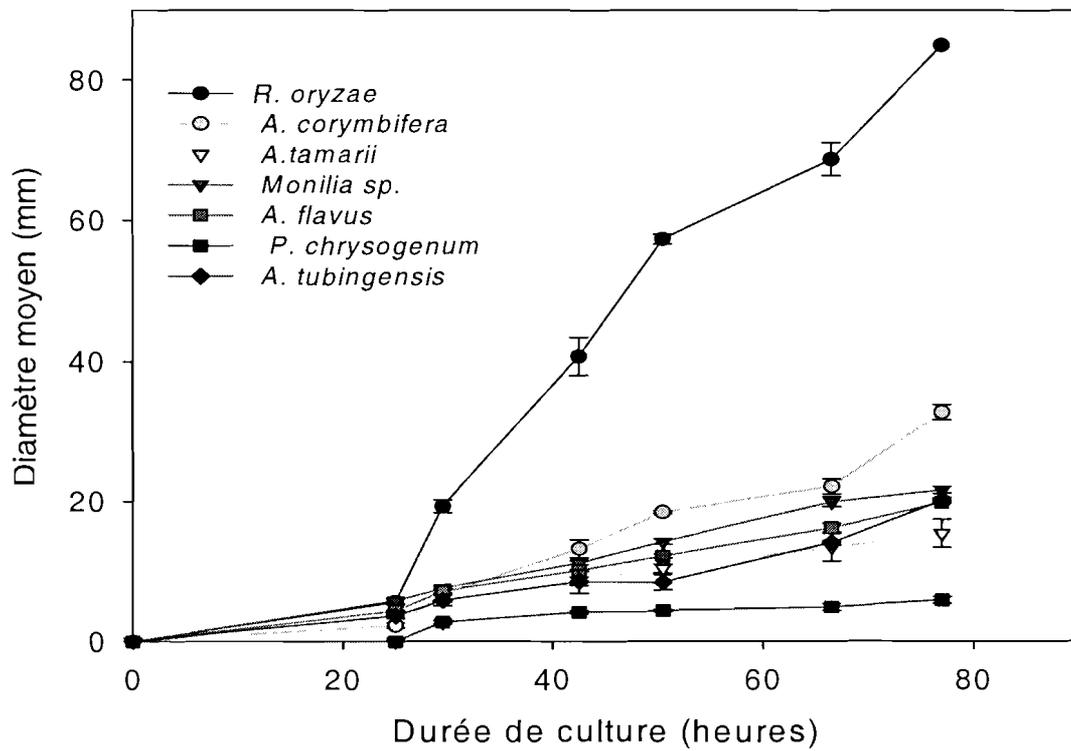


Figure 49. Croissance des moisissures isolées du cacao marchand sur milieu Czapeck en présence du beurre de cacao

IV.5.2.- Biosynthèse de la lipase pendant la croissance de la biomasse de *R. oryzae*

Dans cette partie de l'étude, la biosynthèse de la lipase de *R. oryzae* a été réalisée. Une étude partielle de ses conditions optimales de fonctionnement a été mise en œuvre. Le choix de cette moisissure a été motivé par sa dominance parmi la mycoflore isolée du cacao ainsi que par ses fortes propriétés lipolytiques par rapport à toutes les autres moisissures identifiées. L'implication des Mucorales déjà évoquée par Guénot *et al.* (1976) dans la formation des AGL du cacao a aussi orienté ce choix.

Une suspension de spores a été préparée à partir d'une jeune culture de *R. oryzae*. Un milieu liquide de pré-culture enrichi en glucose (5%) a été inoculé. Après 48 h de culture à 28°C sous agitation, le mycélium lavé aseptiquement avec de l'eau physiologique a été repiqué en milieu Czapeck liquide contenant l'huile de colza à 0,5%. Le milieu de culture a été incubé à 28°C sous agitation, les mesures de la quantité de biomasse produite et de l'activité lipasique du surnageant de culture ont été réalisées à pH 7 en présence de la trioléine à 5 mM au cours de la croissance du germe.

Les résultats de cette étude montrent une augmentation de l'activité lipasique de 0 à 1,2 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ dans la phase exponentielle de la production de la biomasse en 48-50 h de culture. Après 45 à 50 h de culture, l'activité lipasique diminue jusqu'à atteindre 0,4 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ avec l'arrêt de la croissance du germe (fig. 50).

La régression de l'activité lipasique dans le milieu de culture est liée à l'arrêt de la croissance du germe à cause soit de l'épuisement des composés nutritionnels comme l'huile de colza (source de carbone), l'extrait de levure (source d'azote), soit de la sécrétion de protéases dans le milieu de culture.

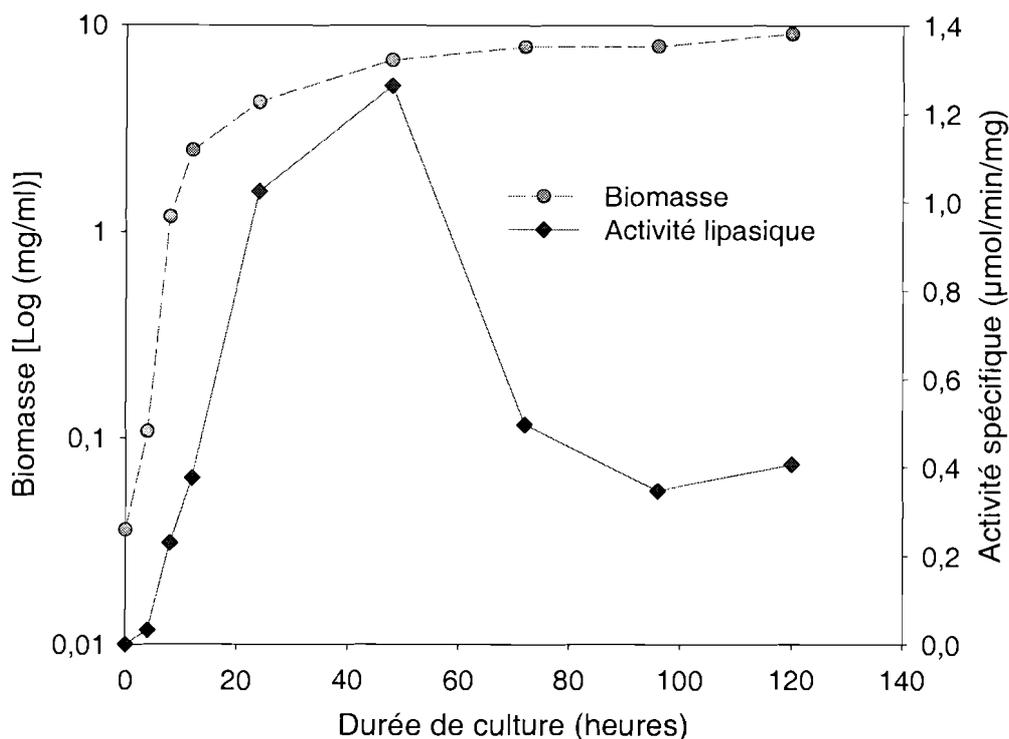


Figure 50. Mesure de l'activité lipasique et de la quantité de biomasse dans un milieu Czapeck-Dox en présence d'huile de colza à 28°C au cours de la croissance de *R. oryzae* (isolé des fèves de cacao)

IV.6.- DETERMINATION DES CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT DE L'ACTIVITE LIPASIQUE DU RHIZOPUS ORYZAE

La détermination des conditions optimales de fonctionnement de l'activité lipasique du *R. oryzae* a été réalisée sur 100 µl de surnageant de culture considéré comme l'extrait enzymatique et prélevé en phase exponentielle de la croissance du germe (30 h d'incubation). Ce volume a été complété à 900 µl par ajout de tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50 mM, pH 7) puis 100 µl d'émulsion à base de la trioléine de concentration finale dans le mélange réactionnel de 5 mM y ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 5 min.

IV.6.1.- Influence du pH

L'influence du pH a été étudiée avec deux solutions tampons : tampon citrate (50 mM, pH 2,7-7) et tampon tris/HCl (50 mM, pH 7-8,8).

L'activité lipasique du *R. oryzae* fonctionne à un pH optimal proche de 7. Cette activité est affectée par des pH inférieurs et supérieurs à pH 7 (fig. 51).

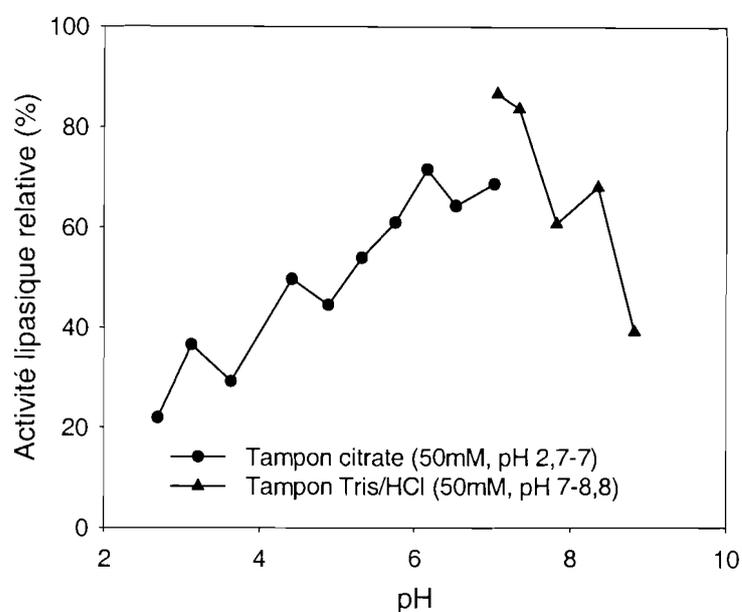


Figure 51. Influence du pH sur le fonctionnement de l'activité lipasique du *R. oryzae* isolé des fèves de cacao.

IV.6.2.- Influence de la concentration en extrait enzymatique

Cette étude a été réalisée avec des volumes croissants d'extrait enzymatique compris entre 100 et 500 μ l. Les différents volumes ont été complétés à 900 μ l par ajout de solution tampon phosphate (50 mM, pH 7).

Les résultats obtenus montrent que l'activité lipasique augmente proportionnellement avec la concentration en extrait enzymatique du milieu réactionnel (fig. 52).

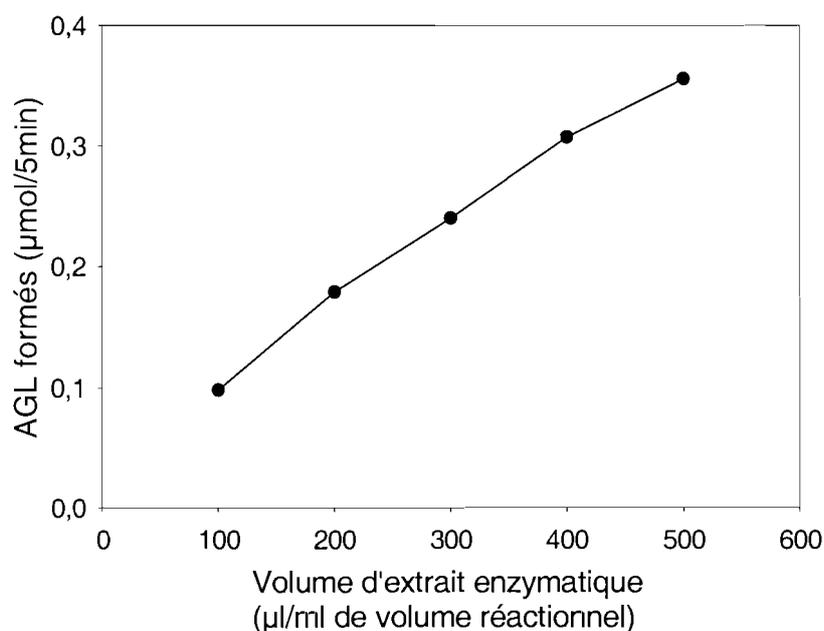


Figure 52. Influence de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité lipasique du *R. oryzae* isolé des fèves de cacao.

IV.6.3.- Influence de la nature du substrat

La lipase de *R. oryzae* hydrolyse un grand nombre de substrats : les triglycérides (trioléine, tricapryline, trioctanoïne) et les di-glycérides de synthèse, les triglycérides des matières grasses naturelles telles que l'huile d'olive (Salleh *et al.*, 1993). L'activité lipasique du *R. oryzae* en présence du beurre de cacao a été comparée à celle mesurée en présence d'autres substrats d'origine végétale comme les huiles de lin, de soja, d'olive, et de colza. Tous les substrats ont été préparés dans des émulsions à une même concentration en matière grasse (250 mg.ml⁻¹). La concentration lipidique finale dans le milieu réactionnel est de 25 mg.ml⁻¹.

Les résultats de cette étude montrent que l'activité lipasique du *R. oryzae* isolé du cacao possède une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao et l'huile de lin par rapport aux autres matières testées (fig. 53).

"L'affinité" de la lipase du *Rhizopus oryzae* pour le beurre de cacao peut être expliquée par une adaptation ou une prédisposition de la souche *R. oryzae* à utiliser le beurre de cacao comme substrat nutritionnel.

"L'affinité" pour l'huile de lin par rapport aux autres huiles testées est vraisemblablement due à la qualité de l'émulsion à base d'huile de lin plus favorable au fonctionnement de la lipase que celle des émulsions à base des huiles de soja, d'olive et de colza. L'acide gras majeur de l'huile de lin par exemple est l'acide linoléique (50-70%), alors que celui de l'huile d'olive est l'acide oléique (55 à 85%) (Ucciani, 1995). La nature et les propriétés physico-chimiques des acides gras constitutifs ne peuvent être envisagées pour expliquer cette "affinité". Certes, ces propriétés spécifiques des acides gras constitutifs majeurs des triglycérides déterminent la qualité de l'interface huile / eau dans les émulsions (Malcata *et al.*, 1992 ; Egloff *et al.*, 1995). Mais le beurre de cacao a une composition en acides gras constitutifs différente de celle de l'huile de lin. "L'affinité" de la lipase du *R. oryzae* pour ces deux types de matières grasses peut être reliée à la présence de cofacteurs indéterminée dans les deux matières grasses.

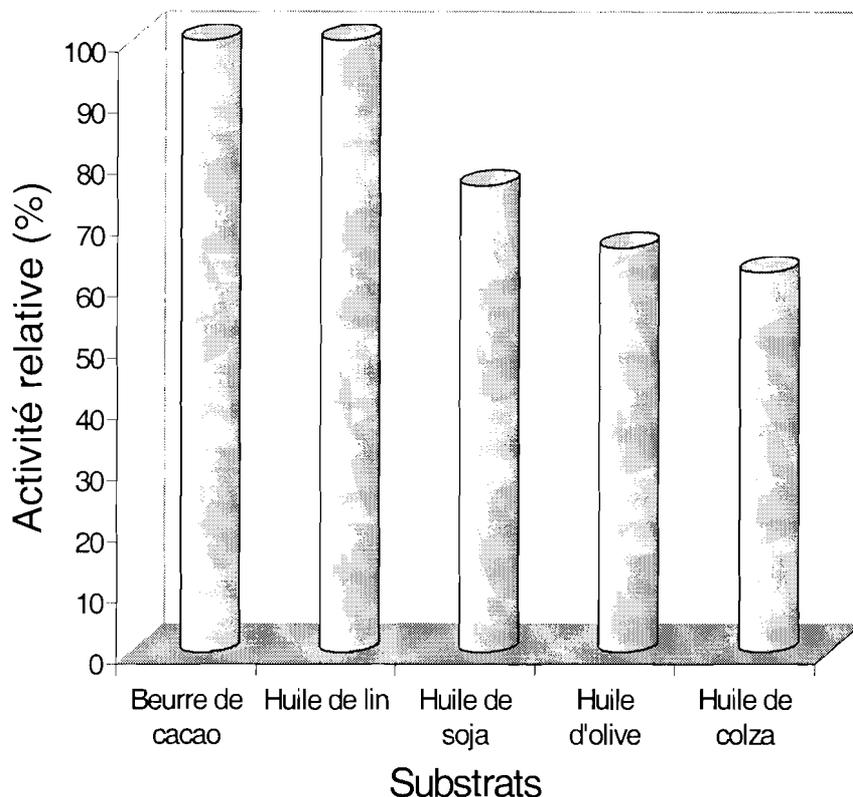


Figure 53. Influence de la nature du substrat sur l'activité lipasique du *R. oryzae* isolé des fèves de cacao

IV.6.4.- Influence de la température de réaction

Dans les conditions expérimentales utilisées, la lipase du *R. oryzae* présente une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao et l'huile de lin. Comme le beurre de cacao a un point de fusion élevé plus élevé que l'huile de lin, celle-ci a été utilisée pour étudier l'influence de la température de réaction sur l'activité lipasique. L'étude a été réalisée en incubant des mélanges réactionnels de même composition à des températures comprises entre 25 et 55°C.

Cette étude a montré que l'activité lipasique du *R. oryzae* est optimale à une température inférieure à 45°C (fig. 54). La température optimale étudiée par Essamri *et al.* (1998) et Hiol *et al.* (2000) est de 35°C. Cette différence de température optimale peut être expliquée par la méthodologie utilisée, par la différence entre les souches ou par l'origine intra ou extracellulaire entre la lipase mise en évidence et celle étudiée par Hiol *et al.* (2000).

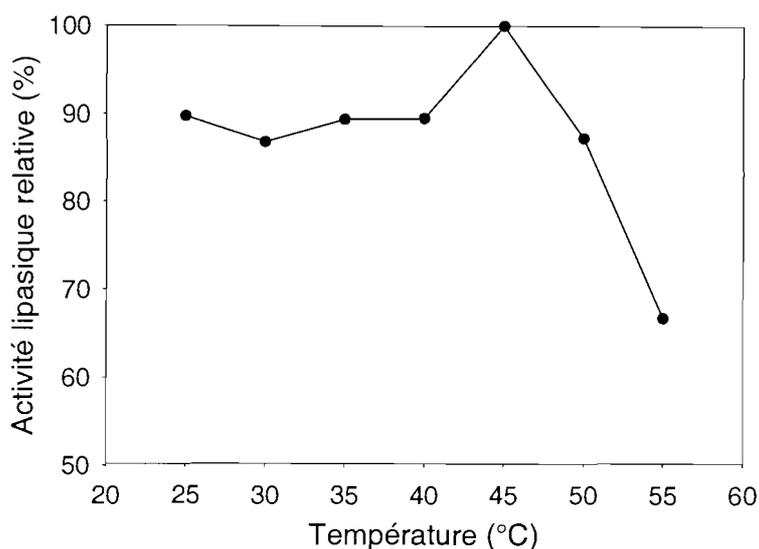


Figure 54. Influence de la température de réaction sur l'activité lipasique du *R. oryzae* isolé des fèves de cacao.

Conclusion

Les fèves saines sont moins contaminées par les microorganismes que les fèves défectueuses. Au cours du stockage, le nombre de levures diminue tandis que celui des bactéries est constant quel que soit la qualité du cacao. Le nombre des moisissures diminue progressivement dans les fèves saines alors qu'il est constant dans les fèves défectueuses. Une relation a été établie entre la formation des AGL du cacao et la flore lipolytique totale. Parmi cette flore, les moisissures jouent un rôle prépondérant. Cette mycoflore est constituée de 7 espèces de moisissures dont, par ordre d'abondance et de fréquence, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus tamarisii* et *Monilia sp.* **Ceci a permis de conclure que la formation des AGL du cacao n'est pas due à une autolyse enzymatique. Mais elle se fait plutôt sous l'action de lipases d'origine exogène notamment microbienne en combinaison avec d'autres facteurs comme la qualité des fèves de cacao, leur état physique et leurs conditions de stockage.** L'étude des propriétés lipolytiques des moisissures en présence de substrats lipidiques (huile de colza et beurre de cacao) a montré que *R. oryzae* et *A. corymbifera* ont des propriétés lipolytiques plus fortes que les autres moisissures. La biosynthèse de la lipase du *R. oryzae* a révélé une production importante de lipase pendant la phase exponentielle de croissance du germe. Cette lipase présente une bonne activité à pH 7 à 45°C et une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao et l'huile de lin par rapport à l'huile de soja, d'olive et de colza.

DISCUSSION GENERALE

Les objectifs de cette étude étaient de :

- étudier l'origine endogène ou exogène et les conditions de fonctionnement de l'activité lipasique ainsi que les facteurs impliqués dans la formation récurrente et saisonnière des AGL du cacao en provenance de la Côte d'Ivoire,

- de formuler des propositions pouvant permettre d'apporter des solutions à ce problème majeur associé aux fèves de cacao.

Les acides gras libres sont des acides carboxyliques issus généralement de l'hydrolyse des triglycérides. Chez les végétaux, cette hydrolyse peut être catalysée par une oxydation chimique ou par une activité lipasique d'origine endogène ou exogène notamment microbienne. L'oxydation chimique conduit à des acides carboxyliques à courtes chaînes aliphatiques alors que l'action enzymatique produit des acides gras à longues chaînes carbonées, des di- et mono-glycérides ainsi que du glycérol. L'activité lipasique d'origine végétale endogène intervient rarement pendant la dormance. Elle se manifeste le plus souvent pendant la germination. Dans un cas ou dans l'autre, la formation des AGL pendant le stockage des produits végétaux est un facteur néfaste pour la préservation de la qualité des matières grasses qui en dérivent.

Au cours de cette étude, les conditions expérimentales utilisées n'ont pas permis de mesurer d'activité lipasique à partir des fèves fraîches. Une faible activité lipasique a été mesurée à partir du cacao marchand. Cette activité lipasique présente deux pH optima (l'un acide et l'autre basique) et une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao par rapport aux autres substrats testés. La présence de deux pH optima reste difficile à expliquer. En effet, à l'exception de quelques rares végétaux comme le ricin (Ory *et al.*, 1962), la nigelle (Mert *et al.*, 1995) et la noix de Barbode (Abigor *et al.*, 2002) dont la lipase s'exprime pendant la dormance et à des pH acides, la lipase de la majorité des végétaux s'exprime pendant la germination et à un pH alcalin (Wanasundara *et al.*, 2001). Dans la plupart des cas, la lipase végétale intervient activement très souvent dans la mobilisation des réserves lipidiques pour la production d'énergie nécessaire à la croissance de l'embryon et à l'entretien de la jeune plante (Huang *et al.*, 1988). Contrairement aux autres graines oléagineuses encore capables de germer après le stockage, le cacao perd ses facultés germinatives après la fermentation et le séchage (Quesnel, 1965 ; Barel, 1998). Certes la présence d'autres activités enzymatiques a été signalée dans le cacao fermenté et séché (Hansen *et al.*, 1998 ; 2000 ; Yusep *et al.*, 2002), mais à notre connaissance aucune activité lipasique n'y a été signalée à ce jour. Plusieurs tentatives d'amélioration de cette activité par l'utilisation d'activateurs de lipases végétales

(Hills et Murphy, 1988), de détergents afin d'améliorer l'extraction des protéines et d'antioxydants ont échoué.

Ces observations rendent peu probable l'hypothèse de l'origine endogène de l'activité lipasique mesurée à partir du cacao et n'ont pas permis de conclure avec précision sur son origine.

A cause de l'apparition saisonnière et récurrente des fortes teneurs en AGL associée au cacao, l'influence des facteurs liés aux itinéraires techniques de préparation du cacao marchand ("génotype", degré de maturité des fruits à la cueillette, délai d'écabossage, durée de fermentation et durée de stockage) sur l'activité lipasique mesurée à partir des fèves ainsi que sur la formation des AGL a été étudiée.

Les cinétiques de l'activité lipasique en fonction de ces facteurs obtenues de cette étude sont difficilement interprétables à cause de leur évolution fluctuante due vraisemblablement à une variabilité importante des fèves du même lot de cacao. Ces cinétiques difficiles d'interprétation peuvent provenir de plusieurs facteurs dont la faible intensité de l'activité lipasique étudiée, la forte hétérogénéité des lots de cacao, un problème d'échantillonnage et probablement l'inadaptation de la méthode de dosage utilisée. De plus, les difficultés d'approvisionnement en échantillons appropriés et les faibles quantités de fèves échantillonnées n'ont pas permis un suivi rapproché des points de mesure de l'activité lipasique au cours du stockage. En effet, le degré de maturité des fruits à la cueillette est apprécié par la couleur qui reste un paramètre très subjectif. A cela s'ajoute la variabilité du degré de fermentation des fèves du centre vers la périphérie d'une même masse de cacao. Tous ces facteurs rendent particulièrement non aisée la mesure de l'activité lipasique à partir du cacao qui est un produit ayant subi de nombreuses transformations technologiques. L'activité lipasique mesurée à partir du cacao sain au cours du stockage est faible et varie peu quel que soit le facteur étudié. Par ailleurs, la teneur en AGL du cacao sain est faible et ne varie en fonction d'aucun des facteurs étudiés à l'exception de la durée de fermentation. Malgré l'effet de la durée de fermentation, aucun cacao n'est affecté par une teneur en AGL supérieure à la norme car la matière grasse ne subit pas de transformation notable pendant la fermentation du cacao (Schwan, 1998).

Les faibles teneurs en AGL du cacao sain pourraient être mises en relation avec la faible activité lipasique qui y a été mesurée. Mais son niveau comparable à celle mesurée à partir des brisures naturelles alors que celles-ci contiennent des teneurs anormalement élevées en AGL démontre le contraire. Il apparaît donc clairement que l'activité lipasique impliquée dans la formation des AGL du cacao est différente de celle mesurée à partir du cacao.

En conclusion, ni le “génotype”, ni les traitements post-récolte du cacao ne permettent l’obtention ni d’échantillons à forte teneur en AGL ni d’activité lipasique importante. Lorsque les traitements post-récolte sont contrôlés, la teneur en AGL du cacao sain est faible et évolue très peu pendant le stockage.

Ces derniers résultats ont conduit les recherches vers l’étude de l’influence de la qualité des fèves, de la formation des brisures ainsi que de la présence de la microflore lipolytique inféodée aux fèves sur l’apparition des AGL du cacao.

La mesure de la teneur en AGL a montré que seules les fèves défectueuses (fèves noires, collées, brisures naturelles) et les brisures artificielles présentent des teneurs élevées et croissantes en AGL durant le stockage. Les fèves saines contiennent une faible teneur en AGL qui évolue peu au cours du stockage.

Des teneurs excessives en AGL des fèves défectueuses par rapport à celles des fèves saines indiquent que la formation des AGL est sous la dépendance de plusieurs facteurs exogènes. Des teneurs élevées en AGL observées dans les brisures artificielles quelle que soit la qualité des fèves mettent en évidence le rôle protecteur des coques et de l’état physique intact des fèves. En effet, la décontamination des brisures artificielles de fèves noires initialement très contaminées et contenant une teneur élevée en AGL ayant provoqué l’arrêt de la formation des AGL du cacao a permis de confirmer que **la formation des AGL du cacao n’est pas due à une activité lipasique endogène. Elle est à relier à la qualité des fèves et à la présence de microorganismes inféodés aux fèves de cacao. L’action de ces microorganismes est favorisée par la perte de l’intégrité physique qui favorise une mise en contact directe entre le beurre de cacao et la lipase issue de ces microorganismes.** Un phénomène comparable a été déjà signalé par Oyeniran (1980) qui a conclu que la formation des AGL du cacao augmente avec la formation des brisures. D’autres problématiques analogues ont été développées sur l’hydrolyse de l’huile de palme pendant le stockage des fruits de palme (Hiol, 1999) et du beurre de karité pendant le stockage des amandes (Jacosberg, 1977). Dans le cas des fruits de palme, il a été montré que des activités lipasiques d’origines fongiques sont essentiellement responsables de l’acidification de l’huile de palme. Une action combinée des lipases d’origines endogène et exogène notamment microbienne (moisissures) a été mise en évidence dans l’augmentation de la teneur en AGL du beurre de karité. Dans les deux études, il a été décrit que l’action des lipases microbiennes s’intensifie lorsque :

- les traitements post-récolte des produits végétaux ont été défectueux,
- les produits ont été endommagés par des blessures ou des meurtrissures,

- les produits meurtris ou non ont été conservés dans des conditions hydriques et thermiques inappropriées favorisant le développement des moisissures.

A la lumière des observations précédentes, une étude quantitative et qualitative de la microflore lipolytique totale du cacao en cours de stockage a donc été entreprise. Cette étude a révélé la présence de bactéries, de levures et de moisissures. Les fèves saines sont évidemment moins contaminées par les différents microorganismes que les fèves défectueuses. Au cours du stockage, le nombre de levures diminue considérablement quelle que soit la qualité du cacao alors que celui des bactéries reste constant. Les moisissures disparaissent des fèves saines. Leur population reste constante dans les fèves défectueuses. Parmi ces moisissures, il a été identifié par ordre d'abondance et de fréquence *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus tamaris* et *Monilia sp.* Si la présence de levures dans le cacao est sans danger pour la qualité des fèves marchandes et peut se justifier par leur rôle dans la fermentation, le développement des bactéries et des moisissures en particulier est par contre un facteur défavorable pour la préservation de la qualité des fèves. Leur développement est favorisé par la qualité, la teneur en eau trop élevée des fèves et par des taux élevés de matières étrangères.

L'étude des propriétés lipolytiques des différents microorganismes isolés a révélé qu'aucune souche de levure n'est lipolytique. Seulement 3 des 10 souches de bactéries isolées produisent de la lipase alors que toutes les moisissures isolées ont des propriétés lipolytiques. **Par ailleurs, les analyses statistiques réalisées par le logiciel SAS ont montré que la probabilité pour que l'hydrolyse du beurre de cacao soit liée à la présence des moisissures est très significative ($P < 0,0001$). Les moisissures jouent donc un rôle prépondérant dans la formation des AGL du cacao.** Ce résultat est comparable à ceux obtenus par Guénot *et al.* (1976).

Mais en réalité quelle est la signification du nombre de moisissures présentes dans le cacao ? A cause de leur structure mycélienne, la numération des moisissures est plus difficile que celle des levures et des bactéries. Cette structure mycélienne ne permet pas de considérer les moisissures en termes d'individus (Guiraud, 1998). De plus, un faible niveau de contamination du cacao par les moisissures ne peut être considéré comme un critère de garantie absolue de la qualité du beurre de cacao. En effet, un lot de cacao peut être séché à température élevée après avoir été le siège d'une multiplication active des moisissures. Un tel traitement pourrait entraîner la destruction des germes les plus importants sur le plan lipolytique alors que les dégâts auraient été déjà commis comme l'ont remarqué Poisson et

Cahagnier (1974). L'action des germes détruits dans ce cas risque d'être ignorée car une analyse microbiologique ne donne de renseignement que sur l'état de la microflore présente au moment du prélèvement. En outre, certaines lipases microbiennes peuvent continuer d'être actives même en l'absence des germes ou des mycéliums d'où elles proviennent (Jacosberg, 1977). L'ensemble de ces observations indique clairement que les critères de compréhension du mécanisme de la formation des AGL du cacao ne doivent pas se limiter seulement à la quantité de la microflore impliquée. Ils doivent d'étendre sur les indications portant sur la nature, sur les propriétés lipolytiques et surtout sur la capacité de cette microflore de sécréter des lipases extracellulaires. Seules ces caractéristiques biochimiques et physiologiques des germes inféodés à un lot de cacao peuvent en déterminer et refléter les conditions de stockage satisfaisantes ou mauvaises et donc d'expliquer les causes des fortes teneurs en AGL relevées.

En vue de confirmer la dépendance de la formation des AGL du cacao vis à vis de l'action des moisissures, la biosynthèse et l'étude des conditions de fonctionnement de la lipase du *R. oryzae* isolé des fèves de cacao ont été réalisées. Les résultats ont montré que l'excrétion de la lipase est importante pendant la phase exponentielle de la croissance du germe. Elle régresse lorsque la croissance du germe s'arrête. L'activité de cette lipase présente un pH optimal voisin de 7, une température optimale comprise entre 45 et 50°C et possède une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao parmi les autres matières grasses testées (huiles de colza, d'olive et de soja). Cette "affinité" pour le beurre de cacao suggère une contribution à part entière du *R. oryzae* à la formation des AGL du cacao et de l'ensemble des moisissures identifiées. Le *R. oryzae* a été mis en cause comme l'une des moisissures responsables de l'hydrolyse de l'huile de palme (Hiol, 1999).

C'est le lieu de signaler que la récurrence et la saisonnalité du problème des fortes teneurs en AGL qui affectent certains lots de cacao en provenance de la Côte d'Ivoire peuvent être liées aussi à deux pratiques culturelles essentielles:

- la baisse de la main d'œuvre cacaoyère à l'approche des fêtes de fin d'année. Cette baisse est due principalement au départ en vacances des employés ou manœuvres agricoles pour la plupart étrangers .

- la diversification des activités agricoles vers la fin de la grande campagne cacaoyère faisant intervenir les cultures vivrières. En effet, le début de l'année correspond à la période de défrichement des terrains pour les cultures vivrières.

Ceci met en évidence les causes socio-économiques de l'apparition des teneurs anormalement élevées en AGL du cacao ivoirien.

*CONCLUSION, RECOMMENDATIONS ET
PERSPECTIVES*

Au regard des connaissances et des informations acquises à partir de ce travail, il ressort que la formation des AGL n'est pas due à une activité lipasique endogène au cacao. Ce phénomène est dû à l'action de lipases d'origine microbienne particulièrement des moisissures inféodées aux fèves de cacao. Le développement de ces microorganismes et l'action de leurs lipases sont favorisés par la qualité des fèves, la formation des brisures et les conditions de stockage du cacao. Des causes socio-économiques sont également associées à ce problème. Par ailleurs, d'autres facteurs indépendants du producteur peuvent aussi influencer les teneurs en AGL du cacao :

- la faible quantité d'échantillons prélevés à partir de quantités considérables de lots de cacao alors que la précision de la mesure de la teneur en AGL du cacao en dépend. Ce qui peut soit sous évaluer ou surévaluer la teneur en AGL par rapport à la teneur réelle d'un lot de cacao

- la divergence de signification et des intérêts des différents utilisateurs du cacao marchand. En effet, la teneur en AGL du cacao est différemment considérée suivant que l'on est producteur de poudre de cacao, beurrier ou chocolatier. Ceci peut amener certains producteurs de cacao à ne pas accorder d'importance à ce critère de qualité qui pourtant prend sa source dans la préparation du cacao marchand.

Les résultats obtenus de cette étude permettent de proposer une série de recommandations en vue de limiter la gravité et l'incidence des teneurs anormalement élevées en AGL du cacao ivoirien. En effet, les attentes des consommateurs de chocolat se traduisent de plus en plus en terme de qualité. Pour un pays producteurs comme la Côte d'Ivoire qui n'a pas encore les moyens locaux de transformation d'une grande partie de sa production de cacao, il est certes important de mettre l'accent sur la quantité mais il est évidemment nécessaire et urgent de privilégier la qualité. Afin d'abaisser la teneur en AGL du cacao à un niveau recommandé, un programme qualité devra être rapidement mis sur pieds par l'ensemble des opérateurs de la filière cacao. Ce programme axé sur la sensibilisation et la formation ainsi que l'assistance aux producteurs devra également impliquer tous les autres acteurs de la filière. Cette bataille pour la qualité contre le développement des moisissures doit résolument se faire par la mise en place d'une politique de traçabilité du cacao ivoirien, d'une décentralisation des différentes structures de la filière cacao plus particulièrement celles chargées du suivi et de l'amélioration de la qualité vers les zones de production et d'un système HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) dans la filière afin d'apporter les mesures correctives appropriées aux points critiques déjà identifiés. Une attention particulière doit en conséquence être accordée :

- aux conditions de préparation du cacao
- à l'apparition des fèves moisies ou issues des cabosses pourries ou de cabosses affectées par les phytopathologies
- à l'instauration à tous les niveaux de la filière d'un contrôle du taux d'humidité des lots de cacao,
- aux mélanges réalisés entre des lots de cacao défectueux et des lots sains,
- aux moyens de transport afin d'écourter le temps de séjour du cacao chez le producteur

En clair, une relation plus étroite entre une politique d'assurance qualité et le conditionnement du cacao devrait être créée en accordant aux producteurs eux-mêmes et aux coopératives reconnues en zones de production le plein contrôle de la qualité du cacao tout en leur payant une prime à la qualité. En effet, toutes les mesures techniques préconisées avant comme après la commercialisation du cacao resteront lettre morte tant que producteurs et commerçants ne seront pas responsabilisés, n'en tireront pas profit et qu'ils n'y seront pas légalement obligés.

Enfin, nous convenons évidemment avec les opérateurs de la filière et les utilisateurs du cacao que le problème des AGL du cacao ivoirien est réel mais il est naissant. Par conséquent, si aucune mesure préventive ou corrective n'est mise en œuvre dès à présent, cette situation risque de prendre de l'ampleur et les conséquences désastreuses pour le label ivoirien déjà éprouvé à l'échelle mondiale.

Nos résultats et recommandations ne peuvent prétendre qu'à une valeur d'informations et non à de solutions définitives à ce problème important de qualité qui se pose au niveau du cacao ivoirien. En effet, ces résultats suggèrent d'autres pistes de recherche intéressantes pour la compréhension et la résolution d'autres problèmes de qualité majeurs associés au cacao de Côte d'Ivoire. A cette fin, ce travail nécessite d'être poursuivi sous plusieurs angles par la mise en œuvre d'une série d'études :

- une étude régionalisée des fortes teneurs en AGL dans les principales régions productrices de cacao en Côte d'Ivoire.
- une étude conjointe de l'activité lipasique endogène et de la formation des AGL puisqu'il est à présent connu que les lots de cacao défectueux contiennent des teneurs anormalement élevées en AGL,
- une étude plus approfondie de l'influence de la méthode d'échantillonnage sur la précision de la mesure de la teneur en AGL,

- une étude du développement des moisissures en fonction des conditions de stockage du cacao,
- une étude portant sur le criblage et le mode d'action des moisissures réellement impliquées dans la formation des AGL du cacao,
- une étude des conditions de formation des fèves noires affectées par des teneur anormalement élevées en AGL parmi les différentes causes (cabosses atteintes par les maladies de la pourriture, cabosses surmatures, mise en contact des fèves avec une surface métallique lors du séchage),
- une étude des relations entre la formation des AGL et l'apparition des mycotoxines comme l'Ochratoxine A et l'aflatoxine ainsi que de goûts anormaux dans le cacao car des teneurs anormalement élevées en AGL pourraient être des marqueurs d'autres défauts de qualité,
- une étude des conditions de production de mycotoxines par les moisissures dans la masse de fèves vu que les préoccupations majeures des consommateurs de chocolat s'accroissent sur cet autre problème de qualité des aliments d'une façon générale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abigor, R.D., Uadia, P.O., Foglia, T.A., Haas, M.J., Scott, K. and Savary, B J.,** (2002). Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, n°11, 1123-1126.
- Airede, C.E. and Esuruso, O.F.,** (1987). Deterioration of shelled oil palm kernels caused by seedborn fungi. *J. Sci. Food Agric.*, 40, 293-340.
- Alibert, G., Mouloungui, Z., Grison, R., and Romestan, M.,** (2001). Libération des acides gras libres par autolyse enzymatique des triglycérides des graines oléoprotéagineuses. *OCL*, 8, n°1, 98-101.
- Anon.,** (1990). Guide to Protein Purification, (1990). *Methods Enzymol.*, Deutscher, M.P. (ed.).

B

- Barel, M.A.,** (1987). Délai d'écabossage. Influence sur les rendements et la qualité du cacao marchand et du cacao torréfié. *Café, Cacao, Thé*, 31, n°2, 141-150.
- Barel, M.A.,** (1995). Le traitement post-récolte en Afrique et en Amérique latine. Son influence sur la qualité. In : *Rencontres cacao. Les différents aspects de la qualité*. Actes du séminaire, 30 juin 1995, Montpellier, France, pp. 91-98.
- Barel, M.A.,** (1998). Première transformation du cacao. Formation de l'arôme cacao. pp. 96-115. In : Pontillon J. (ed.). Lavoisier Tec & Doc., Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. *Cacao et chocolat. Production, utilisation et caractéristiques*.
- Bastide, P.,** (1987). Evolution et métabolisme des composés phénoliques des fèves de cacao durant leur développement au cours de la croissance et de la maturation du fruit de *Theobroma cacao* L. Thèse Univ. des Sciences et Techniques du Languedoc. 147p.
- Biehl, B.,** (1996). Le traitement post-récolte en Asie : vers une amélioration de l'arôme. In : *Rencontres cacao. Les différents aspects de la qualité*. Actes du séminaire AFCC-CIRAD du 30 juin 1995, Montpellier ; CIRAD, Coll. Colloques ; 1996 ; 223p.
- Bigelis, R.,** (1992). Food enzymes. pp. 361-415. In: Finkelstein, D.B., and Ball, C. (eds.) Butterworth-Heinemann, Boston, MS. *Biotechnology of filamentous fungi. Technology and Products*.
- Boussard, B.,** (1982). Stockage et transport du cacao. *Café, Cacao, Thé*, 36, n°2, 136-144.
- Bradford, M.M.,** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

Braudeau J., (1969). Le cacaoyer. Maisonneuve et Larose. 304 p.

C

Chakrabarty, M.M., Bhattacharyya, D., and Kundu, M.K., (1969). A simple photometric method for microdetermination of fatty acids in lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**, 473-475.

Chin, A.H.G., and Nushirwan, Z., (1986). Characteristics of Malaysian cocoa butter. pp. 693-706 In: Pushparajah, E., Soon, C. P. (eds.). Kuala Lumpur: Incorporated society of planters. *Cocoa and coconuts: progress and outlook*.

Christensen, C.M., and Kaufmann H.H., (1965). Deterioration of stored grains by fungi. *Annual Rev. Phytopathol.*, **3**, 69-84.

Clément, D., (2001). Cartographie de QTL contrôlant des caractères d'intérêts chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Thèse Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Codex Alimentarius, (1994). Sugars, cocoa products and chocolate and miscellaneous products, **11**, 2nd edition. FAO/WHO.

Crespo, S., (1986). Cacao beans today with sliced and whole beans and farm illustrations. 1^{ère} édition. Publisher, Lititz, Pennsylvania. 107p.

Cros, E., et Jeanjean, N., (1998). Formation de l'arôme cacao. pp. 188-203. In : Pontillon J. (ed), Lavoisier Tec & Doc, Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. *Cacao et chocolat. Production, utilisation et caractéristiques*.

Cuatrecasas, J., (1964). Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus *Theobroma* *Contribution U.S. National Museum.*, **35**, 379-614.

D

Dagnelie, P. (1998). Statistique théorique et appliquée. Tome 2. Inférence statistique à une et à deux dimensions. Département de Boeck Université. Paris, Bruxelles. 659p.

Daviron, B., (1996). Les aspects économiques de la qualité. pp.17-27 In : *Rencontres cacao. Les différents aspects de la qualité*. Actes du séminaire, 30 juin 1995, Montpellier, France.

De Lucca, J.A., and Ory, R.L., (1987). Effects of microflora on the quality of stored rice. *Trop. Sci.* **27**, 205-214.

Dharmaputra, O.S., Amad S.M., Retnowati, I., and Wahyudi T., (1999). The occurrence of insects and moulds in stored cocoa beans at South Sulawesi. *Biotropia*, n°12, 1-18.

Dimick, P.S., (1991). Principles of cocoa butter crystallization. *The Manufac. Confec.*, **71**, n°5, 109-115.

Drosinos, E.H., and Board, R.G., (1994). Metabolic activities of *Pseudomonas* in batch cultures in extract of minced lamb. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 613-620.

E

E. D.& F.Man, (2002). Cocoa, Ltd. 11p.

Egloff, M.-P., Ransac, S., Marguet, F., Rogalska, E., Van Thilbeurgh, H., Buono, G., Cambillau, C., and Verger, R., (1995). Enzymes lipolytiques et lipolyse: Les lipases, cinétiques, spécificité et aspects structuraux. *OCL*, **2**, n°1, 52-67.

Essamri, M., Deyris, V., and Comeau, L. (1998). Optimisation of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvent. *J. Biotechnol.*, **60**, 97-103.

F

Faborde, M.O., Favier, J.F., and Ajayi, O.A., (1995). On the effects of forced air-drying on cocoa quality. *J. Food. Eng.*, **25**, 455-472.

Fadiloglu, S., and Erkmén, O., (1999). Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1936-1938.

Fossati, P., Ponti, M., Paris, P., Berti, G., and Tarenghi, G., (1992). Kinetic colorimetric assay for lipase in serum. *Clin. Chem*, **38**, 211-215.

Fowler, M.S., (1999). Cocoa Beans: from tree to factory. pp. 8-35. In: Beckett, S.T. (ed), Blackwell Sciences LTD. *Industrial chocolate manufacture and use*.

G

Gancet, C., and Guignard, C., (1986). Hydrolyse et synthèse de liaisons ester par la lipase de mycélium dévitalisé de *Rhizopus arrhizus* en milieu aqueux. *Rev. Fr. Corps gras*, **33**, 423-430

Garay, C.L., Romero, E.B., and Gonzalez, E.M., (1987). Microflora of the stored coffee and its influence on quality. ASIC, 12^e colloque, Montreux, 758-770.

Guéhi, T., (2002). Projet d'étude : « acides gras libres du cacao ». Rapport de mission en Côte d'Ivoire du 18 janvier au 10 février 2002, Cirad, n°19, 17p.

Guénot, M.-C., et Poisson, J., (1974). Evolution de la microflore et de la composition lipidique des amandes de tournesol pendant le stockage. pp.715-725. In: *Proceedings of the 6th International Sunflower Conference*, Budapest.

Guénot, M.-C., Perriot, J.-J., and Vincent, J.-C., (1976). Evolution de la microflore et des acides gras des fèves de cacao au cours du stockage: étude préliminaire. *Café, Cacao, Thé*, **30**, n°1, 53-58.

Guiraud, J.-P., (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. 652p.

H

- Hagermann, A.E.**, (1992). Tannin-protein interaction. pp. 237-247. In: Ho, C.T., Lee, C. Y., and Huang, M. T. (eds.), ACS Symposium Series 506. *Phenolic compounds in food and their effect on health I : analysis, occurrence and chemistry.*
- Hansen, A.P.**, (1975). Microbiological activity and its effect on cocoa beans. *The Manufac. Confec.*, **55**, n°9, 35-39.
- Hansen, C.E., Del Olmo, M., and Burri C.**, (1998). Enzymes activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric*, **77**, 273-281.
- Hansen, C.E., Manez, A.M., Burri C., and Bousbaine, A.**, (2000). Comparison of enzyme activities involved in flavour precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. *J.Sci. Food Agric*, **80**, 1193-1198.
- Hassanien, F.R., and Mukherjee, K.D.**, (1986). Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, n°7, 893-897.
- Henderson, J., and Osborne, D.J.**, (1991). Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm stability in vivo and in vitro. *Phytochemistry*, **30**, n° 4, 1073-1078.
- Hills, M.J., and Murphy, D.J.**, (1988). Characterization of lipases from lipid bodies and microsomal of erucic-free oilseed-rape (*Brassica napus*) cotyledons. *Biochem. J.*, **249**, 687-693.
- Hiol, A.**, (1999). Contribution à l'étude de deux lipases extracellulaires issues de souches fongiques isolées à partir du fruit de palme. Thèse, Univ. D'Aix Marseille III 121p.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., and Comeau, L.C.**, (2000). Purification and characterization of an extra cellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 421-430.
- Huang, A.H.C., Lin, Y.-H., Wang, S.-M.**, (1988). Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, n°6, 897-899.
- Huis in't Veld, J.H.J.**, (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**, 1-18.

I

- Imeson, H.C., Rood, S.B., Weselake, R.J., Zanewichn, K.P., Bullock, B.A., Stobbs, K.E., and Kocsis, M.G.**, (1993). Hormonal control of lipase activity in oilseed rape germinating. *Physiologia Plantarum*, **89**, 476-482.
- Iwai, M., and Tsujikasa, Y.**, (1984). Fungal lipase. pp. 443-469. In: Bergstran, B., and Brockman, H.C., (eds), Elsevier, Amsterdam. Lipases.

J

- Jachmanian, I., Perianova-Nemska, M., Grompone, M.-A., and Mukherjee, K.D.**, (1995). Germinating Rapeseed as Biocatalyst: Hydrolysis of exogenous and endogenous triacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2992-2996
- Jacosberg, B.**, (1977). Causes de l'acidification du beurre de karité au cours de la préparation et du stockage des manades. *Oléagineux*, **32**, 529-533.
- Jensen, R.G., Galluzzo, D.R., and Bush, V.G.**, (1990). Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases), *Biocatalysis*, **3**, 307-316.
- Jette, J.-F., and Ziomeck, E.**, (1994). Determination of lipase activity by a rhodamine-triglycérider-agarose assay. *Anal. Bioch.*, **219**, 256-260.

K

- Kallithraka, S., Bakker, J., and Cliffor, M. N.**, (2001). Interaction of (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro. *J. Sci. Food Agric*, **81**, 261-268.
- Kennedy, A.J.**, (1995). Cacao *Theobroma cacao* (Sterculiaceae). pp. 472-475. In: Longman (eds), London. *Evolution of crops*.
- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., and Morita, Y.**, (1994). Purification characterization and crystallisation of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **58**, 1007-1012.

L

- Lacey, J., Ramaskrishna, N., Hamer, A., Magan, N., and Marfleet, I.C.**, (1991). Grains fungi. pp. 120-177. In: Arora, D.K., Mukerji, K.G., and Marth, E.H. (eds), Marcel Dekker, New York. *Handbook applied mycology. Food and feeds*.
- Lanaud, C., Motamayor, J.-C., et Sounigo, O.**, (1999). Le cacaoyer. Pp. 141-174. In : Maon, P., Seguin, M., Perrier, X. et Glaszmann, J.-C (eds.) Cirad. *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*.
- Lin, Y.-H.Y., and Huang, A.H.C.**, (1983). Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedling. *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 360-369.
- Lin, Y.-H.Y., C., and Huang, A.H.C.**, (1986). Substrate specificities of lipase from germinating corn and others seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, n°1, 346-356.
- Lipp, M., and Anklam, E.**, (1998). Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate- Part A. Compositional data. *Food Chem.*, **62**, n°1, 73-79.

M

Malcata, F.X., Garcia, H.S., Hill, C.G.Jr., and Amundson, C.H., (1992). Hydrolysis of butteroil by immobilised lipase using a hollow-fiber reactor: Part I. Lipase adsorption studies. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 647-657.

Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., and Magan, N., (1998). Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moliniforme* and *Fusarium proliferatum* during colonisation of maize. *Int. J. Food Microbiol.*, **42**, 185-194.

Martin, R.A. Jr., (1987). Chocolate. *Adv. Food Res.*, **31**, 211-342.

Mert, S., Dandik, L., and Aksoy, H.A., (1995). Production of glycerides from glycerol and fatty acids by native lipase of *Nigella sativa* seed. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **50**, 333-342.

Minifie, B.W., 1980. Chocolate, cocoa confectionery, 2nd ed., Avi Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut.

Mislivec, P.B., Beuchat, L.R., and Cousin, M.A., (1992). Yeast and moulds. pp. 239-249. In: Vanderzant, C., and Splittosser, D.S. (eds). American Public Health Association, New York, 3rd ed. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*.

Misnawi, Jinap, S., Nazamid, S., and Jamilah, B., (2002). Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry*, **78**, 407-417.

Moreau, C., (1979). Moisissures des tourteaux de soja. Evolution de la mycoflore au cours du stockage. *Oléagineux*, **34**, n°1, 29-32.

Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., and Baird, R.M., (1995). The mechanism and principles of control of microbial spoilage of foods. pp.175-214. In: Wiley (ed.), England. *Essentials of the microbiology of foods: A textbook for advanced studies*.

Mossu, G., (1990). Le cacaoyer. Maisonneuve et Larose, CTA, coll. Le technicien de l'agriculture tropicale, 160p.

Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S., and Morikawa, H., (1988). Culture, conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *J. Ferment. Technol.*, **66**, 441-448.

N

Nickless, H., (1996). Cocoa butter quality. pp. 322-336. In: Selamat., J., Lian, B.C., Lai, T.K., Ishak, W.R.W. and Mansor, M. (eds.). *Proceedings of the Malaysian international cocoa conference*. 20-21 octobre Kuala Lumpur Malaysia.

Niles, E.V., (1981). Microflora of imported cocoa beans. *J. stored Prod. Res.*, **17**, 147-150.

Njoku, O.U., Ononogbu, I.C., and Eneh, F.U., (1996). Measurement of lipase activity in rubber (*Hevea brasiliens*) seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 1471-1473.

O

O'Connor, J., Perry, H.J., and Harwood, J.L., (1992). A comparison of lipase activity in various cereal grains. *J. Cereal Sci.*, **16**, 153-163.

OICC, (1996). Determination of the free fatty acid (FFA) content of cocoa fat as a measure of cocoa nib acidity. Analytical Method 42-1993.

OICC, (2000). Rapport annuel 1999-2000. 29p.

Ory, R.L., Angelo, A.J.St., and Altschul, A.M., (1962). The acid lipase of castor, properties and substrat specificity. *J. Lipid Res.*, **3**, 99-105.

Ostovar, K., and Keeney, P.G., (1973). Isolation and characterisation of microorganismes involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. *J. Food Sci.*, **38**, 11-618.

Oyeniran, J.O., (1980). The role of fungi in the deterioration of tropical stored products. Nigerian stored products research Institute (Lagos), *Occasional paper series* n°2, 9-10.

P

Patkar, S., and Björkling, F., (1994). Lipase inhibitors. pp. 207-224. In : Wooley, P., and Peterson, S.B. (eds.), Cambridge University Press, England. Lipases. *Their structure, biochemistry and application.*

Perez, R.A., Tuite, J., and Baker, K., (1982). Effect of moisture, temperature, and storage time on the subsequent storability of shelled corn. *Cereal Chem.*, **32**, 205-209.

Podlaha, O., Töregard, B., and Püschl, B., (1984). TG-type composition of 28 cocoa butters and correlation between some of the TG-type components. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **17**, 77-82.

Poisson, J., et Cahagnier, B., (1979). Développement des moisissures sur les graines en fonction de diverses caractéristiques du substrat et de la population fongique. *Techniques des Industries Céréalières*, **169**, 3-8.

Poisson, J., Richard-Molard, D., Cahagnier, B., (1981). Moisissures et qualité des céréales. *Swiss Food*, **3**, 25-28.

Pontillon, J., (1998). Le beurre de cacao et les matières grasses en chocolaterie. pp. 326-392. In : Pontillon, J. (ed.). Techniques et documentation, Lavoisier (Paris). *Cacao, chocolat, production, utilisation, caractéristiques.*

Q

Quesnel, V.C., (1965). Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. *J. Sci. Food. Agr.*, **16**, 441-449.

R

Raghavendra, M.P., and Prakash, V., (2002). Phenylboronic acid a potent inhibitor of lipase from *Oryzae sativa* L. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6037-6041.

Rajeshwara, A.N., and Prakash, V., (1995). Purification and characterization of lipase from rice (*Oryzae sativa* L.). *Nahrung*, **39**, 406-418.

Renaud, R. (1954). La qualité du cacao. Les moisissures des fèves fermentées. *Agronomie tropicale (Nogent-sur-Marne)*, **9**, n°5, 563-583.

Richardson, Y., (2001). Caractérisation des acides volatils et liposolubles de la coque de cacao et des acides gras libres du beurre de cacao. Rapport de stage. IUT de l'Université des Sciences et Techniques de Montpellier 2. Département de chimie. 65p.

Rosnitschek, I., and Theimer, R.R., (1980). Properties of a membrane-bound triglyceride lipase of rapeseed (*Brassica napus* L.) cotyledons. *Planta*, **148**, 193-198.

S

Safarik, I., (1991). Spectrophotometric assay for lipase activity utilizing immobilized triacylglycerols. *J. Biochem. Biophys Methods*, **23**, 249-253.

Sahasrabudhe, M.R., (1982). Measurement of lipase activity in single grains of Oat (*Avena sativa* L.). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 8, 354-355.

Salleh, A.B., Musani, R., Basri, M., Ampon, K., Yunus, W.M.Z., and Razk, C.N.A., (1993). Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Can. J. Microbiol.*, **39**, 978-981.

Sambanthrmurthi, R., Oo, K.-C., and Parman, S.-H., (1995). Factors affecting lipase activity in *Elaeis guineensis* mesocarp. *Plant Physiol. Biochem.*, **33**, n°3, 353-359.

Schwan, R.F., (1998). Cocoa fermented conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, n°4, 1477-1483.

Selamat, J., Hamid, M.A., Mohamed, S., and Man, C.Y., (1996). Physical and chemical characteristics of Malaysian cocoa butter. pp. 351-357. In: Selamat., J., Lian, B.C., Lai, T.K., Ishak, W.R.W. and Mansor, M. (eds.). *Proceedings of the Malaysian international cocoa conference*. 20-21 octobre Kuala Lumpur Malaysia.

Small, D.M., (1968). A classification of lipids based upon their interaction in aqueous systems. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **45**, 108-119.

Stead, D., (1986). Microbial lipases : their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy*, **53**, 491-494.

Stessels, L., (1994). Technologie post-récolte et préparation du cacao. CIRAD-CP Paris. 206 p.

T

Timms, R.E., Stewart, I.M., (1999). Cocoa butter, a unique vegetable fat. *Lipids Technol. Newslett.*, 101-107.

Tsujiyama, Y., Iwai, M., Fukumoto, J., and Okamoto, Y., (1973). Induced dormation of lipase by *Geotrichum candidum*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 837-842.

U

Ucciani, E., (1995). Nouveau dictionnaire des huiles végétales: composition en acides gras. Lavoisier Tec & Doc. Londres New York Paris. 644 p.

Uyttenbroeck, W., Hendriks, D., Vriend, G., De Baere, I., Moens, L., Scharpe, S., (1993). Molecular characteristics of extra cellular acid resistant lipase produced by *Rhizopus javanicus*. *Biol. Chem.*, **374**, 245-254.

V

Van Autryve, P., Ratomahenina, R., Riaublanc, A., Mitrani, C., Pina, M., Graille, J., and Galzy, P., (1991). Spectrophotometric assay of lipase activity using rhodamine 6G. *Oléagineux*, **46**, n°1, 29-31.

Verger, R., (1980). Enzyme kinetics of lipolysis. *Methods Enzymol.*, **64**, 341-392.

Villeneuve, F., (1982). Les composés phénoliques de la fève de cacao: *Theobroma cacao* L. Evolution au cours de la fermentation. Thèse Doct. 3^{ème} cycle Sciences Agronomiques, option phytotechnie, Montpellier, 109p.

Vincent, J.C., (1996). Quality evaluation of cocoa beans in relation to post harvest processing : acidity, weakness of aroma, off flavours and their control by sensory and chemical analyses. pp. 231-241. In: Selamat., J., Lian, B.C., Lai, T.K., Ishak, W.R.W. and Mansor, M. (eds.). *Proceedings of the Malaysian international cocoa conference*. 20-21 octobre Kuala Lumpur Malaysia.

W

Waliyar, F. et Zambettakis C., (1979). Etude de la mycoflore des gousses et des graines d'arachide au Sénégal. *Oléagineux*, **34**, n°4, 191-198.

Wanasundara, P.K.J., Wanasundara, U.N., and Shahidi, F., (2001). Lipolytic activity of enzymes from germinating seeds of sesame (*Sesamum indicum* L.). *J. Food Lipids*, **8**, 75-84.

Wilbaux, R., 1965. Les problèmes que pose le stockage du cacao. *Café, Cacao Thé*, **11**, n°1, 24-35.

Wood, G.A., and Lass, R.A., (1985). Cocoa. Logman Scientific and Technical, Essex (England), 620p.

Wright, H., (1999). Cocoa. Its botany, cultivation, chemistry and diseases. Biotch Books. 250p.

γ

Yusep, I., Jinap, S., Jamilah, B., and Nazamid, S., (2002). Influence of carboxypeptidases on free amino acid, peptide and methylpyrazine contents of under-fermented cocoa beans. *J. Sci. Food Agric*, **82**,1584-1592.

Sites Internet

<http://www.ci.refer.org>

<http://www.cirad.fr>

<http://www.fao.org>

<http://www.gerkenscacao.com>

http://www.perso.wanadoo.fr/harry.mongongnon/cacao_feves.html

<http://www.perso.wanadoo.fr/rene.oster/choclatl>

<http://www.membres.lycos.fr/saotome/cacao3.html>

http://www.nybg.or./bsci/belize/theobroma_cacao.html

Etude de l'origine et des conditions de fonctionnement de l'activité lipasique impliquée dans la formation des acides gras libres du cacao marchand.

Résumé de thèse : Les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques du beurre de cacao dépendent en partie de sa teneur en acides gras libres (AGL). Depuis quelques années, une hydrolyse du beurre de certains lots de cacao de Côte d'Ivoire est observée de façon récurrente et saisonnière. Bien que jamais réellement démontré, le rôle de lipases a été avancé. Cette étude a eu pour objectifs d'identifier et de caractériser l'activité lipasique impliquée.

Une première approche a permis la mise en évidence d'une activité lipasique avec deux pH optima : 5,2 et 7,4, et une plus grande "affinité" pour le beurre de cacao par rapport à d'autres matières grasses a été mise en évidence dans la poudre de cacao dégraissée.

Un second volet d'expérimentations a révélé que pour des cacaos sains, aucun des facteurs comme le génotype, le degré de maturité des fruits, le délai d'écabossage, la durée de fermentation et le stockage prolongé du cacao n'a permis l'obtention d'échantillons à forte teneur en AGL ni à activité lipasique importante. En revanche, les fèves défectueuses (fèves noires, collées, brisures naturelles) et les brisures artificielles contiennent des teneurs en AGL élevées croissantes pendant le stockage. Cette hydrolyse du beurre de cacao s'arrête après décontamination des fèves.

Enfin, la comparaison de la teneur en microflore lipolytique, et particulièrement en moisissures des fèves saines à celle des fèves défectueuses, montre une relation entre niveau de contamination et teneur en AGL. Les moisissures suivantes, ont été identifiées : *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus tamarisii* et *Monilia sp.*

Ce travail permet de conclure que l'hydrolyse du beurre de cacao ne provient vraisemblablement pas d'une autolyse enzymatique, mais fait plutôt intervenir une activité lipasique principalement de source microbienne en combinaison avec d'autres facteurs comme la qualité des fèves de cacao, leur intégrité physique ainsi que leurs conditions de stockage.

MOTS CLES : Cacao, technologie, stockage, moisissures, acides gras libres.

Study of the origin and the operating conditions of the lipasic activity involved in the formation of the free fatty acids in the commercial cocoa beans.

Abstract: Physical and chemical characteristics of cocoa butter depend partially on its free fatty acid contents. For several years, hydrolysis of cocoa butter of certain batches of cocoa from Côte d'Ivoire was observed. To date, although no lipase activity has been detected to our knowledge the role of lipase is strongly suspected. This survey aimed to identify and characterise lipolytic activity involved in hydrolysis of cocoa butter.

Firstly, lipase activity displaying two optimum pH values (5.2 and 7.4) was detected from defatted cocoa powder. The lipase had a greater "affinity" for cocoa butter than for some others substrates studied.

In the second experimental protocol, lipase activity and free fatty acid (FFA) content were low in healthy beans, regardless of genotype, degree of pod maturity, delay before pod opening and duration of fermentation or of storage (climatic cabinet, 27°C, 75% HR). However high and increasing FFA contents were observed in defective beans (black, clumps, naturally broken beans) and in artificially broken beans. But decontamination of the beans blocked hydrolysis triglycerids of cocoa butter.

Finally, comparison of those micro flora content, and particularly of moulds content in healthy beans to micro flora in defective beans showed that hydrolysis of cocoa butter was due to microbial lipolytic activity. According to mouldy abundance and frequency, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus tamarisii* and *Monilia sp.* were identified.

We conclude therefore that hydrolysis of cocoa butter was not due to endogenous lipolytic activity. Instead, it involved microbial lipolytic activity associated with others factors such as the quality of the beans, their physical and storage conditions.

Key words: Cocoa, technology, storage, moulds, free fatty acid.