HAL
open science

Analyse du potentiel qualitatif des cacaos de Madagascar

Alexandre Chen-Yen-Su

To cite this version:

Alexandre Chen-Yen-Su. Analyse du potentiel qualitatif des cacaos de Madagascar. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2020. Français. NNT : 2020LARE0001 . tel-02923874

HAL Id: tel-02923874

https://theses.hal.science/tel-02923874v1

Submitted on 27 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LA REUNION

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES
Spécialité : Agroalimentaire

Par

Alexandre CHEN-YEN-SU

Analyse du potentiel qualitatif des cacaos de Madagascar

Soutenue publiquement le 4 mars 2020

Composition du jury

Madame Andrée VOILLEY, Professeur Emérite - AgroSup Dijon	Présidente
Madame Angélique FONTANA, Maître de Conférences - HDR - Université de Montpellier	Rapporteur
Monsieur Jean-Jacques RAKOTOMALALA, Directeur de recherche - FOFIFA Madagascar	Examinateur
Monsieur Jean-Christophe MEILE, Docteur - CIRAD, La Réunion	Co-encadrant
Monsieur Thomas PETIT, Professeur - Université de La Réunion	Co-directeur de thèse
Monsieur Alain SHUM-CHEONG-SING, Maître de Conférences - HDR - Université de La Réunion	Directeur de thèse
Monsieur Renaud BOULANGER, Chargé de recherche - CIRAD, Montpellier	Invité

Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne - Fonds européen de développement régional (FEDER)

À mes grands-parents.

“Celui qui déplace la montagne, c'est celui qui commence à enlever les petites pierres.”

Confucius, VIe s. av. J.-C.

Remerciements

La liste est longue, les mots me manquent mais je tiens à remercier toutes les personnes, qui de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie tous ceux qui sont à l'initiative et ont accompagné ce projet dès son origine :

- Le Conseil Régional de La Réunion pour avoir financé les travaux et plus particulièrement l'Allocation Régionale de Recherche de doctorat.

- Monsieur Frédéric DESCROIX pour m'avoir fait confiance lors de mon stage de Master 2 et de m'avoir fait partager sa passion pour le cacao. Merci de m'avoir accompagné lors de mon premier séjour à Madagascar et de m'avoir présenté à la Société AKESSON'S. Merci pour sa grande disponibilité, son écoute et le soutien moral nécessaires durant ces années de thèse.

- Les Professeurs Bertrand ILLIEN et Anne BIALECKI, les directeurs successifs du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) pour leur confiance et leur aide. J'ai une pensée toute particulière à Monsieur le Professeur Bertrand ILLIEN de m'avoir accueilli dans le laboratoire et parti rejoindre les étoiles. Merci à Madame le Professeur Anne BIALECKI d'avoir permis la poursuite de ce travail.

- Mr Dominique PALLET, directeur de l'UMR Qualisud du CIRAD et Dr HDR Marc CHILLET, responsable de l'antenne Réunion de l'UMR Qualisud qui ont mis tous les moyens humains et matériels pour mener à bien ce travail.

- La société AO Madagascar pour leur partenariat et m'avoir permis d'effectuer des prélèvements de fèves de cacao dans son usine à Madagascar. Un grand merci à Monsieur Ivan STAUB, directeur d'exploitation d'AO Madagascar, de m'avoir accueilli, logé, mis du personnel à ma disposition lors de mes deux séjours à Madagascar pour que ceux-ci se passent dans de bonnes conditions. Je me rappelle encore de nos soirées au Palma Nova avec tous les « vazahas ». Cela me fait plaisir de te voir inviter à ce jury de thèse.

J'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à l'équipe de direction de la thèse :

- Mon directeur de thèse le Maître de Conférences - HDR Alain SHUM-CHEONG-SING. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir guidé, conseillé, encadré et soutenu tout au long de cette thèse. Merci pour sa disponibilité, sa patience, son écoute. Jamais je ne pourrai exprimer tout ce que vous m'avez apporté. Merci d'avoir été là dans les bons moments comme les moins bons.

- Mon co-directeur de thèse le Professeur Thomas PETIT pour son aide et son soutien tout au long de cette thèse. Il m'a fait confiance et m'a beaucoup suivi au cours de cette thèse. Merci pour son important investissement dans mon travail malgré ses nombreuses responsabilités.

- Mon co-encadrant de thèse le Docteur Jean-Christophe MEILE, qui n'a ménagé ni son temps ni son énergie pour me prodiguer aide et conseils précieux lors de la réalisation de ce travail. Je le remercie de m'avoir initié à la biologie moléculaire. Sa rigueur et ses nombreux conseils ont été précieux dans cet encadrement.

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, tout particulièrement malgré leurs multiples activités professionnelles :

- Mes rapporteurs, la Professeure Emérite Andrée VOILLEY de AgroSup Dijon et la Maître de Conférences - HDR Mme Angélique FONTANA, pour le temps consacré à examiner et évaluer ce manuscrit.
- Mon examinateur : le Directeur de recherche Jean-Jacques RAKOTOMALALA qui a également accepté d'examiner mon travail.

Cette thèse pluridisciplinaire a mobilisé nombre de personnes. Elles ont partagé leurs connaissances sans aucune hésitation et les avoir côtoyé a été d'une grande richesse. Je ne saurais oublier :

- Tous les membres de l'équipe du CIRAD Ligne-Paradis pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse et leur bonne humeur générale. J'ai eu un grand plaisir à travailler au sein de cette équipe en particulier :
  * Mme Sophie ASSEMAT pour m'avoir formé à l'analyse sensorielle notamment dans la mise en place, la conduite et son expertise dans le traitement statistique des données de l'analyse sensorielle. Ses conseils ont été très précieux et très bénéfiques.
  * Mr Fabrice DAVRIEUX pour ses explications avisées et ses conseils sur la Spectrophotométrie Proche InfraRouge.
  * Mathilde HOARAU pour son aide dans la réalisation de ce travail, son soutien technique était très important dans mes activités quotidiennes dans le laboratoire.
  * Tous les membres du panel d'analyse sensorielle ayant participé aux dégustations pour leur disponibilité, leur bonne volonté, leur sympathie et sans qui ce travail n'aurait pas abouti.

- Toute l'équipe 1 de l'UMR Qualisud à Montpellier pour le soutien qu'elle m'a apporté tout au long de mon séjour à Montpellier. Vous avez tout mis en œuvre pour que ma mission se déroule dans les meilleures conditions possibles durant ces 5 mois. Je remercie plus particulièrement :
  * Dr Renaud BOULANGER pour m'avoir permis d'effectuer les analyses de composés volatils au sein de son laboratoire et de son équipe de recherche. Merci pour ta grande disponibilité, pour tes remarques toujours justes lors des réunions du comité de thèse, d'avoir accepté d'être membre invité à ce jury de thèse.
  * Dr Marc LEBRUN d'avoir résolu tous mes problèmes concernant la chromatographie gazeuse.
  * Mme Marie-Christine LAHON, technicienne pour sa bonne humeur et son aide au laboratoire.

- Tout le personnel d'AO Madagascar pour leur accueil et l'aide pour les échantillonnages notamment Christian, Madeleine, Ismaël et Frédéric.

- Les membres du LCSNSA notamment :
  • Dr HDR Isabelle GRONDIN pour nos discussions à propos de l'analyse de données des résultats.

• Mathieu DELSAULT, Ingénieur, pour ses conseils et son aide dans le traitement statistique et l'interprétation des résultats d'ACM.
• Jean-Bernard BOYER, Technicien pour son aide dans le repiquage des souches.
• Gwendoline HOAREAU et Véronique CHARI, techniciennes au département Génie Biologique de l'IUT de St-Pierre pour leur aide.

- Dr Régis GIRARD du Laboratoire d'Informatique et de Mathématiques de l'Université de La Réunion pour sa participation aux comités de thèse.

- Les stagiaires qui ont contribué à l'avancement de ma thèse : Carole, Estelle, Hyathouni, Anaïs, Virginie, Emilie, Mélissa et Maroua.

La thèse n'étant pas un long fleuve tranquille, je ne saurais oublier ceux qui sans vraiment participer à mes activités de recherche, ont aussi fait partie de mon aventure.

- Merci aux doctorants et docteurs maintenant pour certains pour la bonne ambiance et leur joie de vivre : David, Eric, Graziella, Julien, Emmanuel, Emmanuelle, Pierre-Eric, Keshika, Charifat, Mélissa, Mahery, Elsa, Elise, Marie, Noura, Cyprien, Estelle, Bastien et Ahmed.

- Merci à ceux qui ont partagé les soirées et les séances de laser game : Didier J., Didier Ange, Magali, Laura, Moez, Lucie, Carla, Fanny, Michel Olivier.

Enfin, je remercie vivement toute ma famille. Il n'a sûrement pas été facile de comprendre ce qui se tramait derrière ces déplacements en Métropole et à Madagascar, ces réunions importantes et ces longues heures silencieuses passées devant l'écran de l'ordinateur. Plus que quiconque, vous m'avez donné votre soutien inconditionnel. En effet, je ne saurais oublier mes proches qui ont su, par tant de sacrifices, m'encourager et me soutenir durant ces 5 années. Que ce travail puisse exprimer ne serait-ce qu'un peu toute la reconnaissance que je leur dois.

- A mes parents, mes frères, merci pour votre soutien sans faille, pour votre confiance et surtout pour votre amour. Sans vous, je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout.
- A Mémé, merci d'avoir toujours été là pour moi depuis tout petit. Avec Pépé, vous nous avez permis de ne jamais manquer une occasion de nous réunir avec toute la famille. Lorsqu'arrivait la fin de l'année, je n'oublierai jamais nos bons moments à confectionner le fameux pâté créole de Pépé avec mes frères, cousins, cousines, oncles et tantes.
- Merci à tatie Yvette pour nos nombreuses sorties et son soutien.
- Merci à tatie Raymonde et tonton Camille pour les bons caris préparés lors du repas dominical suivi de parties de Scrabble.
- Enfin un grand merci à ma famille de St-Leu (ahi Ah-Syve, ahi Marie-Line, tonton Kim et tonton Ti Paul) de m'avoir hébergé et nourri et d'éviter ainsi de faire la route St-Denis => St-Pierre tous les jours lors de mes travaux au CIRAD Ligne-Paradis.
- Un grand merci à mon ami Jérôme avec qui nous avons partagé de nombreuses sorties ensemble. J'ai appris à connaître ta famille (frères, sœur, parents, cousins, cousines, tontons, …). Je les remercie aussi pour tous les bons moments passés ensemble notamment Laurent, Myriam, Pricille et Eric. En plus des personnes citées précédemment qui font partie des « Footballeurs du dimanche », j'aimerais remercier : Patrice C., Patrice C.-P., Stéphane, Pascal, Jérôme A., Alexia, Guillaume, Germain,

François, Alexandre, Mathieu, … Merci à vous tous pour m'avoir permis de m'évader et penser à autre chose que la thèse le temps d'un après-midi.
J'espère que je pourrai continuer encore longtemps à profiter de mes dimanches bien remplis : repas en famille, parties de Scrabble suivies d'un match de foot.

Avant-propos

Ce travail a donné lieu à :

• Une publication :

[1] Alexandre Chen-Yen-Su, Sophie Assemat, Fabrice Davrieux, Frédéric Descroix, Jean-Christophe Meile, Thomas Petit, Alain Shum-Cheong-Sing. L'analyse sensorielle : un outil de mesure de la qualité du cacao de l'océan Indien. *Travaux & Documents* "Perception, représentation, compréhension. 9e Forum des Jeunes Chercheurs", n°50, octobre 2016. https://hal.univ-reunion.fr/hal-02267902

• Trois présentations orales :

[1] Alexandre Chen-Yen-Su. Impact de la microflore sur la qualité des fèves de cacao de Madagascar. *Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences et Technologies*, Mai 2016, Sainte-Clotilde, Réunion. 2016. https://hal.inria.fr/LCSNSA/hal-01444917v1

[2] Alexandre Chen-Yen-Su, Sophie Assemat, Fabrice Davrieux, Frédéric Descroix, Jean-Christophe Meile, Thomas Petit, Alain Shum-Cheong-Sing. L'analyse sensorielle : un outil de mesure de la qualité du cacao de l'océan Indien. *9ème édition du Forum des Jeunes Chercheurs : Perception, représentation, compréhension*, Octobre 2016, Sainte-Clotilde, Réunion. 2016. http://hal.univ-reunion.fr/hal-01444903

[3] Alexandre Chen-Yen-Su, Elisabeth Bousquet, Mélissa Tan, Sophie Assemat, Fabrice Davrieux, Frédéric Descroix, Ivan Staub, Steve James, Emilie Vienne, Jean-Christophe Meile, Thomas Petit, Alain Shum-Cheong-Sing. Contribution des microorganismes à la qualité organoleptique du cacao malgache. *Journées QUALIREG*, Novembre 2016, Saint-Pierre, Réunion. 2016. http://hal.univ-reunion.fr/hal-01444904v1

• Une communication de vulgarisation scientifique :

[1] Keshika Mahadeo, Emmanuel Pichon, Pierre-Eric Campos, Alexandre Chen-Yen-Su. La valorisation des substances naturelles. *Journée du réSEAU des écoles associées à l'UNESCO*, 7 mai 2015, Tampon, Réunion. 2015.

Sommaire

Avant-propos **1**
Sommaire **3**
Liste des abréviations **7**

Introduction générale **9**

CHAPITRE I : Analyse de l'état de l'art **15**
1. De la fève à la production d'un chocolat de qualité **17**
1. 1. Production des fèves dans le monde 17
1. 2. Les différentes variétés de cacao cultivées pour la chocolaterie 19
1. 3. Les facteurs influençant la qualité du cacao 26
2. Une catégorie de cacao de qualité particulièrement recherchée : Les cacaos fins **33**
3. La fermentation : Un élément différenciateur entre le cacao standard et le cacao fin **36**
3. 1. Les différentes étapes et méthodes 36
3. 2. Les micro-organismes fermentaires 38
3. 2. 1. Les principales populations microbiennes 39
3. 2. 1. 1. Les levures 39
3. 2. 1. 2. Les bactéries lactiques 40
3. 2. 1. 3. Les bactéries acétiques 41
3. 2. 2. Rôle biochimique des micro-organismes du cacao 42
3. 2. 2. 1. Action au niveau de la pulpe 42
3. 2. 2. 2. Action au niveau de la fève 43
3. 2. 2. 3. Fermentations spontanées et fermentations contrôlées à l'aide de starters 44
3. 2. 3. Les composés aromatiques 46
4. La qualité des cacaos de Madagascar **48**
4. 1. Historique de la cacaoculture à Madagascar 49
4. 2. Production actuelle et commercialisation 49
4. 3. Le traitement post-récolte des fèves de cacao 50
4. 3. 1. La collecte par les acteurs post-récolte du cacao dans le Sambirano 50
4. 3. 2. La fermentation 53
4. 3. 3. Le séchage 54
4. 3. 4. La qualité du cacao marchand du Sambirano 55

CHAPITRE II : Partie expérimentale **59**
1. Matériel végétal **61**
2. Evaluation de la qualité des fèves **63**
2. 1. Analyses morphologiques des fèves 63
2. 1. 1. Le grainage 63
2. 1. 2. Le cut test 63
2. 2. L'analyse sensorielle des liqueurs de cacao 64

2. 2. 1. Protocole de fabrication des liqueurs de cacao 64
2. 2. 2. Constitution et sélection du panel 64
2. 2. 3. Préparation des séances de dégustation 65
2. 2. 4. Séances de dégustation 65
2. 2. 5. Analyse des résultats 66
3. Analyse chimique 66
3. 1. La composition chimique par la SPIR 66
3. 2. Les composés volatils par SPME 67
3. 2. 1. Extraction 67
3. 2. 2. Séparation et identification des composés 68
4. Flore microbienne vivante 69
4. 1. Isolement des flores revivifiables 69
4. 1. 1. Milieux de culture 69
4. 1. 2. Conservation des souches 69
4. 2. Identification des souches 70
4. 2. 1. Extraction de l'ADN fongique 70
4. 2. 2. Amplification d'ADN par ITS1 et ITS4 70
4. 3. Caractérisation des flores par RFLP 71
4. 3. 1. RFLP et électrophorèse 71
4. 3. 2. Choix des profils 71
4. 3. 3. Amplification d'ADN par NL1 et NL4 des souches choisies 72
4. 3. 4. Identification des séquences 73
4. 4. Analyse des composés volatils produits par des souches de levures par SPME 73
4. 4. 1. Milieux de culture 73
4. 4. 2. Extraction 74
4. 4. 3. Séparation et identification des composés 75
4. 5. Analyse des composés volatils produits par des souches de levures par extraction liquide-liquide 75
4. 5. 1. Milieux de culture 75
4. 5. 2. Extraction 75
4. 5. 3. Séparation et identification des composés 76
5. Flore microbienne totale 76
5. 1. Extraction de l'ADN fongique 76
5. 2. Vérification de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait 78
5. 3. Amplification du gène de l'ARNr 26S des levures par PCR 78
5. 4. Mélanges réactionnels et conditions de la PCR 78
5. 5. Vérification de l'amplification 79
5. 6. Electrophorèse sur gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE) 79
5. 6. 1. Composition et préparation du gel de DGGE 79
5. 6. 2. Conditions de migration électrophorétiques de la DGGE 80
5. 6. 3. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE 80

5. 7. Identification des séquences 81

CHAPITRE III : La qualité des cacaos marchands 83
1. Etude de l'origine génétique des cacaos de Madagascar selon différents critères 85
1. 1. La taille des fèves 86
1. 2. Critères biochimiques 87
2. Les critères visuels 89
2. 1. Exploitation des résultats 91
2. 2. Comparaison entre la norme ISO 2451 et la norme malgache 94
3. Qualités sensorielle et aromatique 97
3. 1. Evaluation sensorielle 97
3. 1. 1. Etablissement de la grille d'évaluation sensorielle 98
3. 1. 2. Analyse globale 99
3. 1. 3. Mise en évidence des corrélations entre descripteurs sensoriels et variétés 102
3. 2. Analyse des composés volatils 104
3. 2. 1. La composition aromatique du cacao torréfié en poudre par SPME 105
3. 2. 2. Corrélation entre la composition aromatique et l'analyse olfactive 107
3. 2. 3. Différenciation des 3 groupes de cacao 109

CHAPITRE IV : Evolution de la qualité au cours de la fermentation 121
1. Les Criollo 124
1. 1. Evolution sensorielle 124
1. 2. Evolution de la composition volatile 129
2. Les Trinitario à casse Claire 134
2. 1. Evolution sensorielle 134
2. 2. Evolution de la composition volatile 139
3. Les Trinitario à casse Foncée 142
3. 1. Evolution sensorielle 142
3. 2. Evolution de la composition volatile 148

CHAPITRE V : Etude des souches de levure isolées du cacao malgache 155
1. Flores levuriennes revivifiables 157
2. Etude de la fraction volatile élaborée au cours de la fermentation 164
3. Composés volatils des levures isolées sur les cacaos non torréfiés 172
4. Corrélation entre les souches levuriennes revivifiables et les composés volatils de la poudre de cacao 179

CHAPITRE VI : Analyse moléculaire des communautés fongiques 193
1. Analyse moléculaire de la flore fongique par DGGE 195
2. Comparaison avec les composés volatils 198

Conclusion générale et perspectives 201

Bibliographie 209

Liste des tableaux **223**
Liste des figures **225**
Annexes **227**

Liste des abréviations

2-PE : 2-phényléthanol

3-MB : 3-méthylbutan-1-ol

Ac-2-PE : Acétate de 2-phényléthyle

Ac-3-MB : Acétate de 3-méthylbutyle

ACM : Analyse des Correspondances Multiples

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADAPS : Association pour le Développement de l'Agriculture et du Paysannat du Sambirano

AEDA : Aroma Extract Dilution Analysis

ANOVA : ANalysis Of Variance

AO Madagascar : Akesson's Organic Madagascar

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

CG-SM : Chromatographe en phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

dNTPs : désoxyriboNucléotide TriPhosphate

DVB/CAR/PDMS : DiVinylBenzène/CARboxène/PolyDiMéthylSiloxane

ECT : extrait culot total

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétate

EST : extrait surnageant total

ICCO : International Cocoa Organization

IFCC : Institut Français du Café et du Cacao

IRR : Indice de Rétention Relatif

ISO : International Organization for Standardization

ITS : Internal Transcribed Spacer

LCSNSA : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments

MS : Matière Sèche

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NIST : National Institute of Standards and Technology

OAV : Odor Activity Value

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLS-DA : Partial Least Squares-Discriminant Analysis

pH : potentiel Hydrogène

ppm : partie par million

p/v : poids/volume

RCF : Relative Centrifugal Force

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm : rotation par minute

SabEtOH5 : milieu de Sabouraud avec 5 % d'éthanol absolu

SabKKOAq20 : milieu de Sabouraud avec 20 % d'extrait aqueux à pH 6 et 4 °C

SabKKOEtOH1 : milieu de Sabouraud avec 1 % d'extrait éthanolique à 30 °C

SabKKOEtOH5 : milieu de Sabouraud avec 5 % d'extrait éthanolique à 30 °C

SPIR : Spectrophotométrie Proche Infra-Rouge

SPME : Solid Phase MicroExtraction

TAE : Tris Acétate EDTA

v/v : volume/volume

Introduction générale

Avec la découverte de nouveaux territoires et le développement des échanges commerciaux, la diffusion de denrées exotiques riches en saveurs, en odeurs, en couleurs et parées de multiples propriétés dont certaines médicinales s'est développée un peu partout dans le monde. Ainsi, le tabac, le thé, le café, la canne à sucre, les épices sont rapidement devenus des matières premières fortement appréciées en Europe. Au début du XVIème siècle, les Conquistadors découvrent au Mexique la « nourriture des dieux », un breuvage à base de fèves de cacao, amer, souvent fortement épicé, inventé par les Indiens de la Méso-Amérique depuis plus de 2 600 ans. Ils offrent le breuvage à leurs divinités lors de grands rituels religieux et utilisent aussi les précieuses fèves de cacao comme monnaie. En 1502, Christophe Colomb est le premier Européen à découvrir la saveur particulière des fèves de cacaoyer mais ne l'appréciant guère, c'est Cortez qui rapporte en Europe les premières fèves en 1528 où elles deviennent (après ajout de sucre et de vanille) une boisson à la mode au sein de l'aristocratie. Avec le temps, le chocolat va passer de denrée de luxe à un produit de consommation courante. C'est en Angleterre, en 1728, que le chocolat est, pour la première fois, élaboré de manière industrielle. Les étapes industrielles pour la fabrication du chocolat sont les suivantes : la torréfaction des fèves, le décorticage, le broyage, le conchage, le tempérage, le moulage et l'enrobage. C'est au cours du XIXème siècle que naissent les grands industriels du chocolat européens : Cadbury en Angleterre, Van Houten aux Pays-Bas, Suchard, Tobler, Cailler, Lindt et Nestlé en Suisse, Menier et Poulain en France. A ce jour, coexistent les grands producteurs industriels et les artisans chocolatiers ; ces derniers se plaçant dans le créneau du haut de gamme.

Actuellement, les fèves de cacao, matière première essentielle à la confection du chocolat constituent la 3ème denrée la plus commercialisée dans le monde après le café et le sucre avec un chiffre d'affaires de 100 milliards de dollars.

Il existe plusieurs espèces de *Theobroma* et seul le *Theobroma cacao* est consommable.

4 731 000 tonnes de cacao ont été produites en 2017 dans le monde. Les deux plus gros producteurs sont le Ghana et la Côte d'Ivoire qui produisent respectivement 20 % (969 000 tonnes) et 41 % (2 200 000 tonnes) de la production mondiale (ICCO, 2019). Pour conquérir de nouveaux marchés, il est aujourd'hui nécessaire de développer des produits originaux avec notamment les cacaos fins pouvant se différencier des cacaos courants. Actuellement, l'ICCO compte 23 pays producteurs de cacao fin dont Madagascar.

Le climat des îles de l'Océan Indien est propice au développement du cacaoyer. En 1820, des cacaoyers sont introduits au Sri Lanka puis en 1890, des colons introduisent le cacaoyer à Madagascar et sur la côte Est de l'Afrique (Barel, 2016). Ce sont surtout des Criollo et des Trinitario. A La Réunion, des écrits signalent une exportation en 1804 de cinquante tonnes de fèves de cacao. En 1904, seule une tonne était encore exportée. La variété n'était pas précisée et cette culture est depuis tombée en désuétude. A Madagascar, le cacao est un des plus réputés au monde, même s'il ne représente qu'une très faible part de la production mondiale (0,2 % de la production mondiale). En effet, Madagascar produit actuellement 8000 tonnes de cacao fin mais son quota de cacao fin est de 100 %. C'est de la vallée du Sambirano, près d'Ambanja, que provient l'essentiel de cette production. La variété est essentiellement du Trinitario. Alors que ces cacaos malgaches sont très appréciés par les grands chocolatiers, les principaux acteurs de la filière utilisent des procédés de traitement post-récolte différents, pouvant conduire à une qualité hétérogène. Afin d'assurer la qualité de la filière à Madagascar et la mise en place d'une filière de production de cacao fin à La Réunion, des recherches sont actuellement menées à Madagascar et à La Réunion. Les études s'intéressent notamment au traitement post-récolte des fèves de cacao dont l'impact est particulièrement important pour la qualité des fèves et du chocolat. La littérature scientifique sur le cacao malgache est presque inexistante et ce constat renforce l'idée de développer la recherche sur ce type de cacao fin.

L'objectif de cette thèse est donc d'acquérir des connaissances sur le potentiel qualitatif du cacao de Madagascar (variétés Criollo et Trinitario) à partir d'un modèle de traitement post-récolte maîtrisé et appliqué à l'échelle industrielle par une des plus grandes sociétés exportatrices des fèves de cacaos malgaches à savoir la société AKESSON'S.

Après une présentation générale de l'état des connaissances sur les cacaos, plusieurs points concernant la qualité du cacao de Madagascar seront abordés en lien avec divers questionnements scientifiques :

- Sur la caractérisation des cacaos en fin de fermentation, séchés, prêts à l'exportation, dits « marchands » : Quels sont les critères qui conduisent à classer les cacaos de Madagascar parmi les cacaos fins ? Quelles sont les caractéristiques génétiques, morphologiques et sensorielles du cacao marchand ? Existe-t-il des molécules spécifiques pouvant caractériser le cacao de Madagascar ?

- Sur l'impact des procédés de fermentation : Quelles sont les évolutions des caractéristiques sensorielles et de la composition des composés volatils au cours de l'étape de fermentation ? Ces procédés conviennent-ils aux cacaos de Madagascar ? Des améliorations sont-elles possibles ? Les procédés traditionnels utilisés sont-ils adaptés et peuvent-ils être source d'innovations ?

- Sur le rôle des souches microbiennes présentes : Quelles sont les souches de micro-organismes identifiables et quelles sont leurs activités métaboliques potentielles associées ? Existe-t-il des souches caractéristiques voire spécifiques du cacao malgache?

A la lumière des résultats obtenus sur le cacao de Madagascar, il sera possible alors de mettre en exergue les points essentiels inhérents à sa qualité et de voir si à partir de ce modèle, il serait possible de l'étendre à de nouveaux sites de production de cacaos fins, notamment pour une éventuelle relance de la production de cacao à La Réunion.

CHAPITRE I :
Analyse de l’état de l'art

Un chocolat de qualité requiert avant tout l'utilisation de fèves de cacao de qualité. Les facteurs génétiques, les conditions de culture et le traitement post-récolte des fèves contribuent largement à l'expression organoleptique du chocolat. Les attributs sensoriels du cacao ont donné lieu à une catégorisation des fèves de cacao selon les variétés et/ou les origines. Commercialement, le cacao se distingue en deux classes de valeur marchande et d'usage différents : une qualité standard (cacao courant) destinée au secteur de la chocolaterie industrielle et une autre, gustativement supérieure, recherchée par les artisans chocolatiers, appelés aussi cacaos fins. Ce chapitre est ainsi dédié à la présentation de l'état de l'art concernant les connaissances acquises sur la qualité et la classification des cacaos, avec un intérêt particulier pour les cacaos fins.

1. De la fève à la production d'un chocolat de qualité

1. 1. Production des fèves dans le monde

Il existe trois grandes régions productrices de cacao dans le monde : l'Amérique du Sud, l'Afrique de l'Ouest et l'Asie du Sud-Est (Owusu, 2010).

La production mondiale est dominée par les cacaos de type Forastero (près de 90 %).

L'Afrique de l'Ouest produit plus de 70 % du cacao mondial qui est du type Forastero (ICCO, 2019). La Côte d'Ivoire et le Ghana produisent à eux deux 3 millions de tonnes de cacao marchand sur un total mondial de 4,7 millions de tonnes (ICCO, 2019).

En 2008, la part du cacao fin ou aromatique essentiellement de type Criollo et Trinitario dans la production mondiale totale de cacao a considérablement diminué, passant d'environ 50 % au début du 20ème siècle à un peu moins de 5 % (160 000 tonnes) par an. En 2017, la production de cacao fin reste stable et représente 5-6 % de la production mondiale de cacao (Pitipone, 2016).

L'Amérique latine et les Caraïbes fournissent environ 80 % de la production mondiale de cacao fin ou aromatique, suivie de l'Asie et de l'Océanie (18 %) et de l'Afrique (2 %). La production de Criollo est rare (moins de 2 % de la production mondiale). Les Criollo se rencontrent essentiellement en Amérique Centrale (Sud du Mexique, Belize, Honduras) et dans les pays au nord de l'Amérique du Sud (Pérou, Colombie, Venezuela). Cette variété est aussi présente dans quelques îles de l'Océan Indien comme Madagascar, les Comores, La Réunion (Tixier, 2013) et quelques régions d'Asie (Fowler, 1999; Ferrão, 2002; Thompson *et al.*, 2007).

La production de Trinitario représente environ 5 % de la production mondiale (Afoakwa, 2010). En Equateur, une population d'hybrides issus des plants de Trinitario du Venezuela s'est développée et a pris le nom de « Vénézolano » dont le but est de remplacer les plants décimés au début du siècle. Le cacao Nacional indigène a probablement contribué à cette nouvelle population dans laquelle on distingue 2 sous-groupes : le vénézélano violet aux cabosses rouges et le Vénézolano vert aux cabosses vertes. Le cacao Nacional non hybride est un cacao grand cru.

Un autre type de cacaoyer est présent en Equateur : le cacao Arriba. Il est un exemple intéressant de « cacao fin » d'origine spécifique. En 2006, la production de cacao fin de l'Equateur représentait plus de 60 % de la production mondiale de cacao fin et s'élevait à 153 000 tonnes. La réputation préexistante du cacao origine Equateur a significativement contribué à faciliter sa popularité auprès des petites marques européennes et des fabricants de chocolat. Le cacao Arriba est caractérisé par une très courte période de fermentation post-récolte et profite d'une très bonne réputation auprès des spécialistes de cacao. La longue tradition du cacao de l'Equateur est en grande partie due à des conditions idéales de production à travers la vallée du fleuve Guayas et des rives fertiles de plusieurs de ses rivières.

Le Belize a gagné sa place parmi les cacaos d'origine aromatique. Il est connu pour ses cacaos à saveur fruité/caramel unique (Criollo/Trinitario). La production totale de cacao au Belize en 2012 était d'environ 88 tonnes.

Enfin en Asie du Sud-Est et en Océanie, des plants provenant du Botanic Garden de Victoria (Cameroun) ont été transférés sur l'île de Samoa. Ceux-ci et d'autres issus du Sri Lanka et de Java ont été déplacés en Papouasie-Nouvelle-Guinée. Ils constituent une population de Trinitario aux cabosses rouges pour partie.

Selon l'ICCO, 23 pays sont des pays producteurs exportant en partie ou exclusivement du cacao fin : l'Indonésie (1 %), São Tomé-et-Principe (35 %), la République Dominicaine (40 %), le Vietnam (40 %), le Bélize (50 %), le Pérou (75 %), le Guatemala (50 %), le Honduras (50 %), le Panama (50 %), l'Equateur (75 %), la Papouasie-Nouvelle-Guinée (90 %), la Colombie (95 %), la Jamaïque (95 %), la Bolivie (100 %), le Costa Rica (100 %), l'Ile Dominique (100 %), la Grenade (100 %), le Mexique (100 %), le Nicaragua (100 %), Sainte-Lucie (100 %), Trinité-et-Tobago (100 %), le Venezuela (100 %) et Madagascar (100 %) (ICCO, 2016).

1. 2. Les différentes variétés de cacao cultivées pour la chocolaterie

Le chocolat est obtenu essentiellement à partir de fèves de cacao produites par quelques variétés seulement des 22 espèces que comprend le genre *Theobroma.*

Le cacaoyer (*Theobroma cacao*) est originaire de la forêt amazonienne. Il est aujourd'hui cultivé dans les zones équatoriales et tropicales de la planète, au climat chaud et humide. À l'état sauvage, l'arbre est de petite taille (entre 10 et 15 m), et entouré d'arbres beaucoup plus grands qui le protègent des rayons du soleil. En effet, le cacaoyer est un arbre qui a besoin d'ombrage et lorsqu'il est cultivé (généralement 5 m maximum), il est nécessaire de conserver ou de planter autour de lui des arbres de plus grande hauteur (Birlouez, 2013).

Le cacaoyer est partiellement allogame ; l'autogamie étant régie par un système d'auto-incompatibilité chez certains génotypes. Ce système d'auto-incompatibilité a été découvert par Harland en 1925 (Harland, 1925) et confirmé par Pound en 1932 (Pound, 1932).

Les fleurs sont morphologiquement peu variables. Elles sont de couleur blanche ou jaune, très petites (moins d'un centimètre) et en très grand nombre (plusieurs milliers par pied). Les fleurs du cacaoyer poussent directement sur le tronc et les branches principales. La particularité du cacaoyer est que l'arbre porte donc en même temps boutons floraux, fleurs, fruits verts et fruits mûrs. Mais seule une fleur sur 100 donnera naissance à un fruit de grande taille que l'on appelle la cabosse. Un arbre cultivé produira environ 80 cabosses au maximum par an (Birlouez, 2013).

La cabosse de forme ovale possède des caractéristiques différentes suivant la variété de cacao. Par exemple, elle est de couleur jaune ou orange à maturité pour la variété Trinitario et de couleur orange pour la variété Criollo (Tableau I). En général, elle mesure une vingtaine de centimètres de long sur une quinzaine de large (Birlouez, 2013).

Chaque cabosse contient entre 30 et 50 graines selon la variété. Le mucilage, une pulpe blanche à la saveur sucrée, entoure les graines. Les cabosses mûres ne tombent pas d'elles-mêmes sur le sol et restent accrochées au tronc (Birlouez, 2013).

En 1944, Cheesman admet l'existence d'un « berceau botanique » du *Theobroma cacao* dans le cours supérieur de l'Amazone, au pied des Andes, à partir duquel, grâce à l'intervention des hommes, se sont différenciées, au Nord, c'est-à-dire en Méso-Amérique, la variété Criollo et, au Sud, c'est-à-dire dans l'aire Amazono-Guyanaise, la variété Forastero. Les Forastero et les Criollo ont été implantés à l'ère coloniale au Venezuela, à Trinidad et aux Antilles en donnant naissance par croisement aux Trinitario. Les Trinitario associent la qualité gustative des Criollo à la robustesse et à la productivité des Forastero.

Le Tableau I regroupe de manière synthétique les différentes caractéristiques morphologiques des cabosses et des fèves de cacao des variétés Criollo, Forastero et Trinitario.

Tableau I. *Caractéristiques morphologiques des cabosses et des fèves de cacao Criollo, Forastero et Trinitario (Are et Gwynne-Jones, 1974; Wood et Lass, 1985)*

Caractéristiques	Criollo	Forastero	Trinitario
Couleur de la cabosse	Orange/jaune	Jaune	Orange
Texture de la cabosse	Sillonnée	Lisse	Variable
Forme des fèves	Dodue	Plate	Variable
Nombre de fèves par cabosse	20-30	> 30	> 30
Couleur du cotylédon	Blanc/pâle	Pâle / violet	Variable
Qualité	Aromatique	Courant	Aromatique

Le cacao Forastero

Les cacaoyers Forastero ont des cabosses lisses, parfois verruqueuses, tantôt allongées, tantôt arrondies (Amelonado), de couleur verte à jaune (Tixier, 2013). Les cacaos de type Forastero comprennent deux sous-groupes, Amelonado et Amazone, eux-mêmes subdivisés en Basse-Amazone et Haute-Amazone, en fonction de leur origine. Toutefois, il n'y a pas de différences biochimiques significatives entre ces sous-groupes du type Forastero (Tomlins *et al.*, 1993). Les fèves sont plus ou moins aplaties et de couleur violette, amères et astringentes. Ils se rencontrent surtout au Brésil et en Afrique de l'Ouest. Les cacaoyers Forastero sont très productifs et sont considérés comme moyennement résistants aux parasites et aux maladies (Lima *et al.*, 2011). La variété Amenolado est un hybride du Forastero et cultivée en Equateur. La délicatesse de son parfum et la finesse de son arôme (notes subtiles et fruitées) en font l'équivalent des meilleures fèves du monde. Il est originaire du Brésil.

Le cacao Criollo

Le nom « Criollo » a été donné par les colons espagnols et traduit comme « native » (Guerrero, 2012). Il a été domestiqué en Mésoamérique par les différentes civilisations qui y vivent, il y a plus de 3500 ans (Hirst, 2011). Cependant, cette variété est également réputée pour sa haute sensibilité aux ravageurs et aux maladies (Schmitz et Shapiro, 2012), couplée avec une structure de plante fragile et une mauvaise productivité de graine par la cabosse (Guerrero, 2012). Il a été dit que ce cultivar est « capricieux », nécessitant des conditions très spécifiques pour la croissance productive.

Les fleurs sont de couleur rose pâle. Les cacaoyers Criollo ont des cabosses de forme allongée, pointues, verruqueuses et de couleur rougeâtre. Les cabosses sont rouges avant maturité et oranges à maturité. Les graines sont dodues, rondes et de couleur blanche autrement appelées « casse claire » ou légèrement pigmentées, à l'amertume légère. Le Criollo est connu comme étant le plus fin, le plus aromatique, aux notes douces et fruitées. Il est historiquement le premier cacao cultivé, indigène du sud de l'Amérique centrale et du nord de l'Amérique du sud. Les fèves sont de couleur blanche ivoire ou de couleur pourpre très pâle, en raison d'un gène inhibiteur de l'anthocyanine (Fowler, 1999; Ferrão, 2002).

Au Mexique, le Criollo possède des cabosses généralement vertes (claires à foncées) avec quelques types de couleur rouge. Les cabosses sont de forme Angoleta ou Cundeamor (Figure 1). Il n'y a pratiquement plus de plantation pure de Criollo au Mexique sauf quelques-unes très anciennes avec quelques arbres isolés.

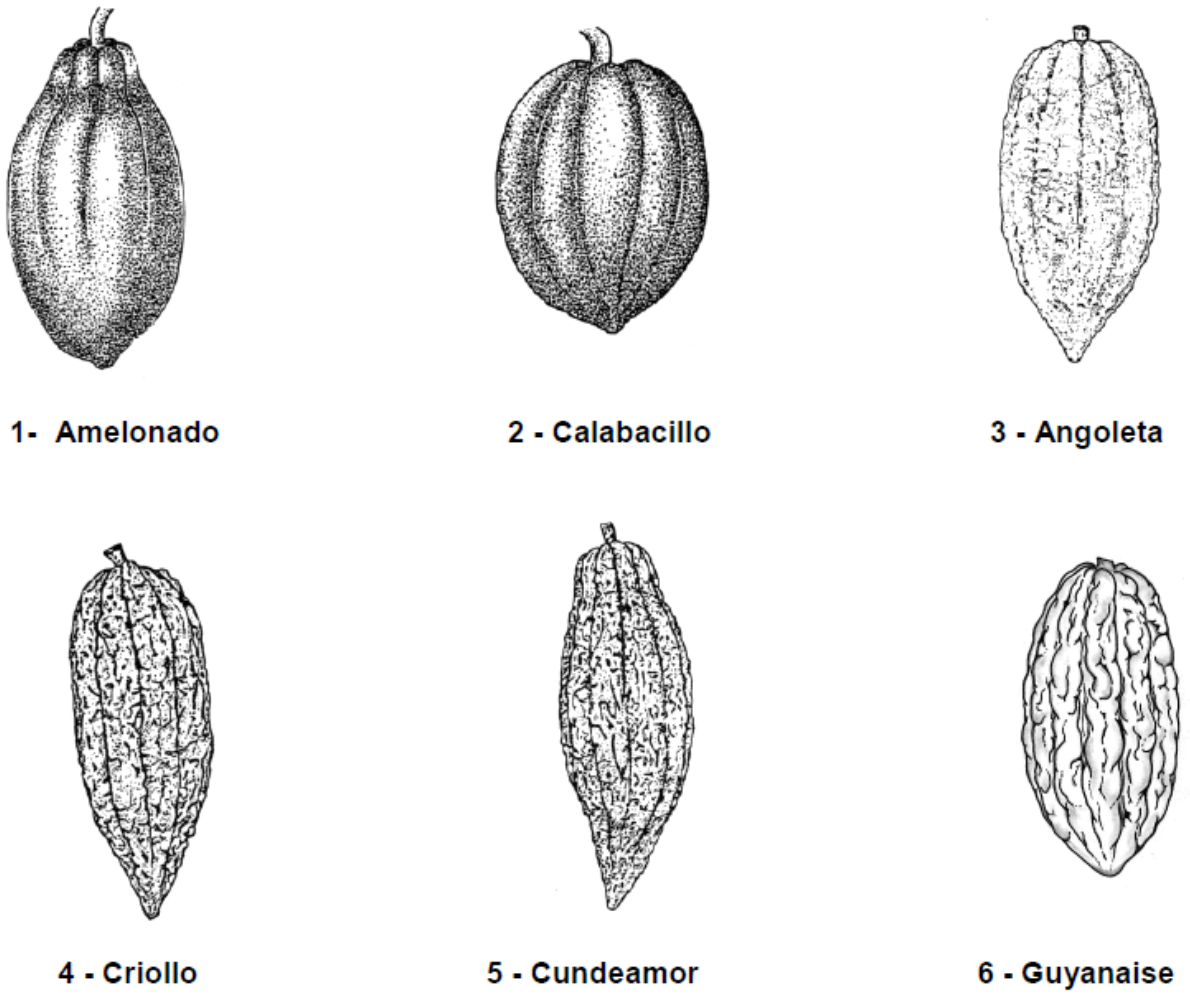


Figure 1. Les formes de cabosse (Lachenaud et Labouisse, 2019)

Au Nicaragua, le cacao Criollo Real possède des cabosses rouges intenses, de forme Cundeamor voire Angoleta.

En Colombie, le Criollo possède des cabosses de couleur verte et de forme Angoleta. Il ressemble au Criollo du Mexique dont il serait originaire.

Au Venezuela, le Criollo (ou « morado ») est présent dans les vallées du Cepe, Chuao, Choroni où il constitue la plus grande partie des plantations. Il est probablement originaire du Nicaragua, auquel il ressemble beaucoup. Les cabosses sont de forme Angoleta, verte ou rose.

Une autre variété originaire du Venezuela, le cacao « Porcelana » possède des cabosses de forme proche de l'Amelonado, de couleur rose brillant. Les cotylédons sont blancs légèrement rosés. Au Venezuela, la production de cacao Criollo tels que Porcelana, Chuao, Mérida ou Guasare sont considérés comme cacaos fins ou aromatiques (Portillo *et al.*, 2006). Les Criollo de type Chuao et Porcelana sont considérés comme des cacaos fins ou aromatiques d'excellente qualité (ICCO, 2000).

Le Criollo de Madagascar et des Comores possède des cabosses rouges de petite taille et de forme Angoleta. Il a une forme particulière avec 5 arêtes très proéminentes et le mésocarpe est inexistant. Les cotylédons sont blancs. C'est un cacao de très haute qualité et interfécond avec tous les types de cacaoyers.

Le cacao Trinitario

Les Criollo étaient très présents à Trinidad jusqu'à la vaste épidémie de *Phytophthora* au milieu du 18ème siècle. La suite n'est pas bien renseignée mais il est certain qu'en 1825, des plants vigoureux ont été introduits depuis le Venezuela. Dans ce pays à cette époque, les plantations de Criollo situées le long de la côte Nord étaient âgées et nécessitaient d'être renouvelées. Après l'épidémie, seuls quelques vieux arbres de Criollo ont survécu et le nouveau matériel provenant de Trinidad et connu sous le nom de « Trinitario » était alors très populaire. Il est probable

qu'en même temps les Amelonado identifiés au Venezuela étaient présents à l'état semi-sauvage dans l'estuaire de l'Orénoque. Le Venezuela a développé sa propre population de Trinitario qui a démarré avec l'introduction de plants provenant de Trinidad et qui ont été croisés avec les Criollo existants sur place.

Les Trinitario sont des hybrides des Criollo et des Forastero. Ils sont très polymorphes. Ils possèdent toutes les caractéristiques intermédiaires entre les variétés Criollo et Forastero (Tixier, 2013). Le type Trinitario est originaire de Trinidad et couvre tous les produits de l'hybridation naturelle et de la recombinaison des variétés Criollo et Forastero (Fowler, 1999; Ferrão, 2002). Ils sont localisés dans les Caraïbes, à Madagascar, au Sri Lanka, à Java et aussi en Papouasie-Nouvelle-Guinée. Les Trinitario sont cultivés dans tous les pays où furent autrefois cultivés les Criollo (Mexique et Amérique Centrale, Trinidad, Venezuela, Colombie…). Ils sont présents également en Afrique et le Cameroun est le premier pays où les Trinitario ont été introduits massivement.

Le cacaoyer Trinitario est connu pour être le plus productif et résistant aux maladies (Motamayor *et al.*, 2003). Les fèves sont de couleur variable, bien que rarement blanche, et les arbres montrent une sensibilité aux ravageurs et aux maladies de niveau intermédiaire entre les variétés Forastero et Criollo (Fowler, 1999; Ferrão, 2002; Bartley, 2005). Le cultivar Trinitario est connu pour avoir des caractéristiques sensorielles de chocolat et un certain type vineux de l'arôme qui n'est pas retrouvé dans d'autres variétés (Afoakwa *et al.*, 2008).

Le cacao Nacional

Le cacaoyer « Nacional » ne se développe qu'en Équateur. En effet, jusqu'au début du XXe siècle, elle est pratiquement la seule variété à être plantée (Loor Solórzano, 2007). Il possède des cabosses de grande taille qui sont vertes et très rugueuses et des graines violettes et assez grosses (Tixier, 2013). Le Nacional ne constitue qu'une infime portion de la production mondiale en cacao. Les fèves issues des cacaoyers Nacional offrent des arômes délicats qui en font un cacao fin et aromatique très apprécié. Il est probablement issu d'une population amazonienne locale ayant subie une certaine hybridation avec la variété Trinitario. Cet hybride

est considéré comme une troisième variété de fèves de cacao (Counet *et al.*, 2004; Caligiani *et al.*, 2010). Mais au fil du temps, cette variété a été classée de manière différente. Ainsi, certains auteurs l'ont considéré comme appartenant au type Forastero (Fowler, 1952; Soria, 1996), tandis que d'autres l'ont répertoriée comme étant de type Criollo (Nosti, 1953; Enriquez, 1992). Selon d'autres auteurs, les cacaos fins et aromatiques appartiendraient aux types Trinitario et Criollo (Wood et Lass, 1987). Plus récemment, des chercheurs ont démontré, en s'appuyant sur de nouvelles technologies moléculaires, que le cacao Nacional est génétiquement plus proche des Forastero que des Criollo (Lerceteau *et al.*, 1997).

La variété CCN-51 en Equateur est connue pour être un hybride entre le Nacional et le Trinitario (Beckett, 2009; Loor *et al.*, 2009). L'appellation « Arriba » fait référence à deux définitions : la première fait référence à la région d'origine de la production, tandis que la seconde renvoie aux particularités aromatiques et aux saveurs qu'elle génère (Loor Solórzano, 2007). Les fèves sont caractérisées par des notes de doux, c'est-à-dire peu acide et peu amer, développant à sa mastication une saveur florale, comparable à celle de la fleur d'oranger.

Contrairement à la classification basée sur les critères visuels, une classification selon l'origine géographique et la structure génétique des cacaoyers a été établie. Ainsi, une liste de dix groupes a été établie à savoir : Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional et Guiana (Motamayor *et al.*, 2008). Le groupe génétique correspondant au Forastero a disparu car il ne semble globalement pas être assez homogène. En effet, les premières études de diversité réalisées à l'aide de marqueurs iso-enzymatiques et moléculaires ont mis en évidence une large diversité parmi les Forastero haut-amazoniens et Forastero bas-amazoniens (Lanaud, 1986; Laurent, 1993; N'Goran *et al.*, 1994; Solorzano *et al.*, 2012). Le Forastero a donc bel et bien disparu. Cet éclairage confirme que l'appellation donnée par les espagnols désignait un « non Criollo » plutôt qu'un type de cacao à part entière (Barel, 2016).

1. 3. Les facteurs influençant la qualité du cacao

Selon plusieurs auteurs (Lima *et al.*, 2011; Saltini *et al.*, 2013; Kongor *et al.*, 2016), de nombreux facteurs peuvent influencer la qualité du cacao lors des différentes phases de traitement depuis la culture du cacaoyer jusqu'au traitement post-récolte des fèves.

Les facteurs pré-récolte

Les conditions climatiques peuvent influencer très significativement la qualité du cacao avec notamment la pluie, la température et la luminosité (Ruiz Pinargote *et al.*, 2015). Pendant la saison sèche, les cabosses contiennent généralement des fèves plus petites que celles produites lors de la saison des pluies. Il est à noter également que la teneur en matière grasse diminue pendant la saison sèche. La température peut jouer sur l'activité de fermentation de la microflore.

Clapperton (1994) a en effet démontré l'influence de l'origine génétique sur la composition aromatique des fèves de cacao quel que soit le traitement post-récolte effectué (Clapperton, 1994). Aussi, le matériel végétal influe également sur le rendement, la couleur, la taille des fèves et la teneur en beurre de cacao. Par contre, les fleurs de certains cacaoyers sont incapables de s'autoféconder : ces cacaoyers sont dits alors auto-incompatibles et une fécondation croisée entre deux arbres donnera des fruits dont les graines seront hybrides. Les pollinisateurs ont donc des effets significatifs sur la couleur et la taille des fèves.

La récolte

Les cabosses doivent être cueillies à maturité. En effet si la récolte est trop précoce, les cabosses immatures possèdent de faibles niveaux de sucre dans la pulpe et les fèves ne fermentent pas bien, ce qui produit un arôme médiocre. A l'inverse, dans les cabosses sur-maturées, les fèves peuvent germer ce qui n'est pas souhaitable (Otomfo, 2014).

Le traitement post-récolte

Plusieurs étapes sont déterminantes pour l'obtention des caractères aromatiques et sensoriels spécifiques d'un cacao de qualité : l'écabossage, la fermentation, le séchage et le stockage.

Le délai entre la récolte et l'écabossage influence la fermentation (Afoakwa *et al.*, 2014). En effet, un intervalle de 3-4 jours donnera lieu à une augmentation plus rapide de température pendant la fermentation. Aussi, de nombreuses études démontrent que le stockage post-récolte des cabosses, avant écabossage, permet la production de composés précurseurs d'arômes (Meyer *et al.*, 1989; Tomlins *et al.*, 1993; Saltini *et al.*, 2013). De plus, le délai qui sépare la récolte et l'écabossage ne doit pas dépasser 5 jours car il y a un risque de voir les fèves germer ou pourrir et apporter des goûts étrangers au cacao (Barel, 2013). On augmente également le risque de contamination par l'Ochratoxine A (Kedjebo *et al.*, 2015).

La fermentation a trois buts : débarrasser les fèves de la pulpe mucilagineuse qui les entoure ; tuer l'embryon pour empêcher toute germination et permettre aux fèves de se conserver ; provoquer des modifications biochimiques au sein des cotylédons (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015). Elle dure en général 3 à 5 jours. Une bonne fermentation est vérifiée par la couleur des fèves qui doivent être brunes ou claires lors du cut test. L'absence de fermentation ou une fermentation insuffisante conduira à des fèves ardoisées et violettes. Une bonne fermentation dépend de nombreux facteurs : la variété, la modification du ratio pulpe/fève, l'aération et la fréquence de brassage (Vincent, 1970; Senanayake *et al.*, 1997; Portillo *et al.*, 2006; Guehi *et al.*, 2010a). Il est recommandé d'effectuer 2 à 3 brassages afin d'homogénéiser la masse fermentaire de cacao. La durée de la fermentation dépend de la variété des fèves. En effet, les fèves de cacaos fins requièrent des périodes de fermentation plus courtes (Wood et Lass, 1985; Portillo *et al.*, 2006).

Aussi, il est important d'avoir un espace couvert pour assurer une protection appropriée contre la pluie, le vent et l'ensoleillement direct. De plus, la masse mise à fermenter doit être d'au moins 100 kg pour une bonne fermentation (Hernández- Hernández *et al.*, 2016). Elle ne doit pas dépasser 2000 kg pour assurer une fermentation uniforme et efficace.

Le séchage doit démarrer immédiatement après la fermentation pour éviter une sur-fermentation des fèves, ce qui provoquerait une perte d'arôme du cacao. Il est préférable de sécher les fèves directement au soleil (Bonaparte *et al.*, 1998; Zahouli *et al.*, 2010) mais il est possible d'utiliser un séchage artificiel pour compléter le séchage au soleil en fonction des conditions climatiques (Kanmogne *et al.*, 2012). Le séchage est complet lorsque la teneur en humidité est inférieure à 8 %. La durée du séchage solaire du cacao dépend de nombreux paramètres tels que les conditions climatiques, le matériau utilisé comme support de l'opération ou encore le temps d'ensoleillement (Guehi *et al.*, 2010b). L'idéal est un séchage au soleil de 6 à 10 jours (Kouakou *et al.*, 2013). Lors de l'utilisation de séchoirs artificiels, si les fèves sèchent trop rapidement à des températures élevées, le taux de perte d'eau dans les coques est supérieur au taux de migration d'acides des fèves vers les coques. Par conséquent, l'eau s'évapore et laisse la place aux acides qui se concentrent dans les cotylédons ou dans les amandes, produisant non seulement un goût excessivement acide mais inhibant également les réactions de formation de l'arôme du cacao pendant le séchage et la torréfaction ultérieurs (Jacquet *et al.*, 1980; Augier *et al.*, 1998; Guehi *et al.*, 2010c; Lasisi, 2014). De plus, un séchage excessif produit des fèves de cacao friables, qui se brisent facilement, entraînant une haute proportion de déchets. Les fèves doivent être brassées plusieurs fois par jour pour assurer un séchage uniforme.

Avant de stocker les fèves de cacao dans des sacs, un tri est réalisé afin d'éliminer toutes les fèves défectueuses (fèves plates, noires, moisies, germées ou attaquées par des insectes).

Le transport et l'entreposage

Les fèves de cacao sont transportées des pays producteurs vers les pays consommateurs en sacs ou en vrac. Il est recommandé d'entreposer les échantillons de fèves pendant un certain temps pour les faire « vieillir » avant de les transformer en liqueur (Amankwah, 2016). Un vieillissement de 6 à 12 semaines améliore la stabilité, permet d'obtenir des échantillons plus représentatifs des lots commerciaux et favorise l'expression optimale du potentiel aromatique des fèves. Les fèves doivent être entreposées dans des sacs neufs et propres à usage alimentaire,

fabriqués dans des matériaux qui laissent passer l'air comme de la toile de jute ou du coton. Il est important que tous les sacs utilisés pour entreposer les fèves soient exempts d'odeurs pour assurer que le matériel utilisé ne communique pas de goûts ou d'odeurs étrangères aux fèves durant l'entreposage. Lors du stockage, si les fèves ont été bien fermentées et séchées, il n'y a normalement pas apparition de moisissures ni d'insectes. Les fèves de cacao ayant une teneur en humidité de 8 %, sont en équilibre avec l'humidité ambiante (environ 70 %). Les fèves de cacao doivent aussi être entreposées à l'abri de la lumière du soleil et de sources de chaleur pour éviter les variations de température et la migration d'eau (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

La transformation des fèves en liqueur

La transformation des fèves en liqueur passe par plusieurs étapes :

• ***La torréfaction :***

La torréfaction consiste à griller les fèves de cacao. C'est une opération essentielle dans la transformation progressive des fèves de cacao en chocolat. Elle se pratique dans un torréfacteur. Différents appareils peuvent être utilisés pour la torréfaction : fours statiques à plateau, torréfacteurs de café à petite échelle de type rotatif, fours à chambre de laboratoire non ventilés, fours conventionnels à ventilation mécanique, fours à convection haute efficacité…

Deux variables sont importantes lors de la torréfaction et doivent être contrôlées à savoir la température et la durée. Pour cela, il est important de contrôler l'uniformité thermique dans l'ensemble du four (notamment grâce à l'utilisation d'un ventilateur) et le temps nécessaire à la récupération de la chaleur entre l'ouverture de la porte et la température de consigne.

Concernant les plateaux de torréfaction, ce sont de préférence des treillis en acier inoxydable ou en acier doux tréfilé, avec des ouvertures assez petites pour empêcher le passage des fèves mais assez grandes pour assurer un déplacement d'air optimal à travers les fèves.

Quand cela est possible, il faut charger le four avec un seul plateau à gros maillage. Les fèves doivent être étalées sur une seule couche sur toute la surface de la plaque. Il est important d'utiliser la même quantité de fèves entre les différents échantillons lors des torréfactions pour assurer un volume uniforme de charge. Si les masses sont différentes entre les échantillons, il est possible d'utiliser des fèves de remplissage pour que toutes les opérations de torréfaction s'effectuent avec une charge identique.

Les conditions de torréfaction doivent être choisies de façon à maximiser le potentiel aromatique de chaque type de fève de cacao. Ces conditions optimales varient selon la variété et sont dépendantes de la température, du temps et de la capacité de charge. A titre d'exemple pour un torréfacteur à plateau à convection, les températures préconisées sont de 120 °C pour le type Trinitario, de 130 °C pour le type Forastero et de 112 °C pour le type Criollo ; pendant 25 min pour les 3 variétés. Généralement, les échantillons de type Criollo sont torréfiés dans les mêmes conditions que le type Trinitario du fait de leur proximité génétique.

La taille des fèves et la teneur en humidité avant la torréfaction peuvent modifier les paramètres de torréfaction. En effet, il peut être nécessaire de trier les fèves pour assurer l'uniformité de leur taille avant la torréfaction.

• Le concassage et le décorticage

Le concassage et le décorticage doivent être effectués immédiatement après le refroidissement des fèves qui suit la torréfaction (généralement entre 20-60 min) pour éviter l'absorption d'odeurs et de goûts étrangers présents dans l'environnement. Le refroidissement à température ambiante peut être effectué sur une grille en hauteur ou à l'aide d'un petit ventilateur pour accélérer le refroidissement. La zone de préparation des échantillons doit avoir une odeur neutre. Des photos illustrent le matériel pouvant être utilisé pour le concassage (Figure 2) et le décorticage des fèves (Figure 3).

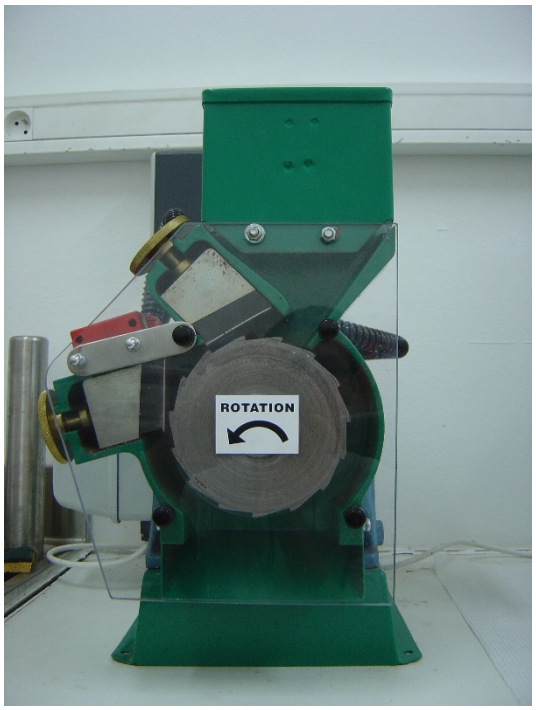


Figure 2. Broyeur pour fèves de cacao (marque Capco)

Figure 3. Catador pour séparation des coques et du grué (marque Capco)

Afin d'éliminer le maximum de coques, il est nécessaire de retirer à la main les restes de coque sur les amandes décortiquées (y compris les fragments de coque détachés et les morceaux de coque collés aux amandes décortiquées).

L'humidité ambiante et les odeurs ou goûts étrangers présents dans l'environnement étant absorbées par les amandes, il est nécessaire de les entreposer dans des récipients hermétiques ou des sachets à usage alimentaire de haute qualité avec système de fermeture. Les échantillons d'amandes se détériorent rapidement et il faut essayer, dans la mesure du possible, de les transformer en liqueur dans les 48 heures suivant la torréfaction. Si nécessaire, les échantillons d'amandes peuvent être stockés pendant un maximum de 7 jours à 10-24 °C dans des sachets fermés.

• ***Le broyage***

Le broyage est réalisé à l'aide d'un pétrin chauffé dont un modèle est illustré à la Figure 4. Il est important de chauffer légèrement les amandes (plus de 40 °C) avant le broyage. Les équipements tels que bols, mortiers et pierres des mélangeurs doivent être réchauffés pour que le beurre de cacao de l'échantillon fonde et facilite la mouture de la liqueur. La température de la masse de mouture doit rester inférieure à 55 °C. Au-dessus de cette température, les composés volatils disparaissent à une vitesse nettement supérieure.

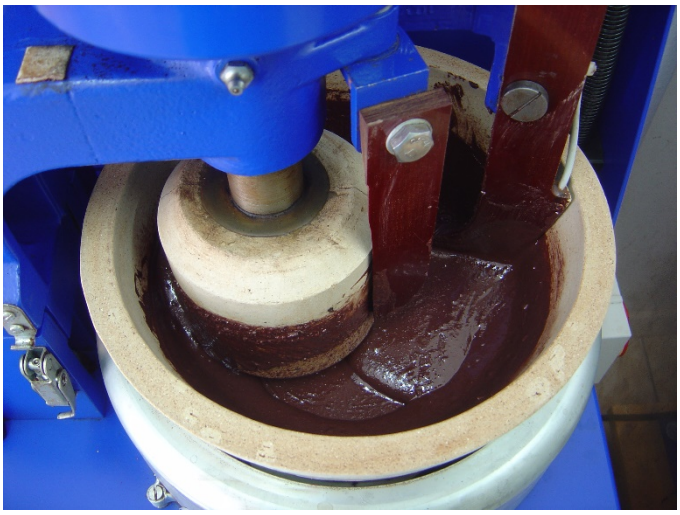


Figure 4. Pétrin pour le broyage du grué (marque Capco)

• ***Le raffinage***

Un raffineur est utilisé pour diminuer la granulosité de la liqueur de cacao. Un modèle de raffineur est illustré à la Figure 5. Quel que soit l'équipement employé pour la mouture, la taille

des particules (qui est déterminée à l'aide d'un micromètre) est un paramètre essentiel pour déterminer le point d'interruption du broyage. Une finesse de 14 à 25 microns est optimale pour une évaluation aromatique efficace car cela assure une libération optimale des composés volatils et l'absence de granulosité dans la liqueur.

Figure 5. Raffineur à 3 rouleaux (marque Exakt)

2. Une catégorie de cacao de qualité particulièrement recherchée : Les cacaos fins

Selon l'ICCO, la qualité d'un cacao fin est la combinaison de plusieurs critères tels que l'origine génétique du matériel végétal, les caractéristiques morphologiques de la plante, les caractéristiques aromatiques et biochimiques des fèves et la couleur des fèves. Les critères secondaires sont le degré de fermentation, le séchage, l'acidité, les odeurs étrangères, le pourcentage de fèves moisies et attaquées par les insectes et le taux d'impuretés.

Origine génétique

La plupart des cacaos fins et aromatiques sont issus de Criollo, Trinitario, Nacional et de quelques Amelonado, sachant qu'en fonction des terroirs de production existeront des variantes organoleptiques.

Les fèves de cacao courant proviennent de Forastero. Il existe cependant des exceptions connues à cette classification. Les cacaos Nacional en Équateur, considérés comme des cacaos de type Forastero, produisent du cacao fin ou aromatique. Il en est de même des fèves de cacao du Cameroun qui appartiennent à la variété Trinitario. Cependant, les graines sont classées parmi les fèves de cacao courant malgré une poudre de cacao à couleur caractéristique et recherchée.

Qualité des fèves selon des critères visuels

Les fèves peuvent être divisées en 4 catégories, en fonction de leur couleur : brune (entièrement fermentée) ; violette/brune ; violette (mal fermentée) ; et ardoisée (non fermentée) (Kealey *et al.*, 2004). La technique utilisée est le cut test qui consiste en une coupe longitudinale des fèves (Figure 6).

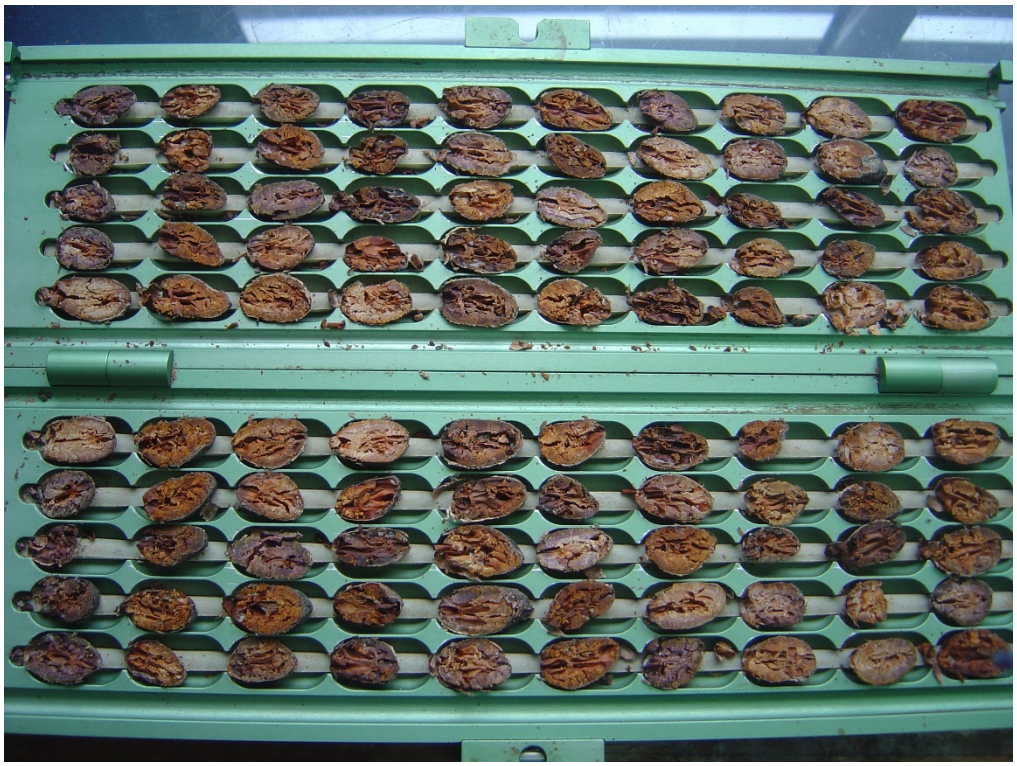


Figure 6. Coupe de 50 fèves à l'aide d'une guillotine (Magra 12, Teserba)

Qualité aromatique et gustative

Les arômes fins comprennent des notes de fruits (fruits frais, brunis et mûrs), florales, herbales, boisé, de noix et de caramel ainsi que des notes de bases de chocolat riches et équilibrées.

Les cacaos Criollo, Trinitario et Nacional sont des cacaos fins possédant des notes aromatiques différentes.

La flaveur des fèves de Criollo est décrite comme étant délicate et complexe selon les professionnels de la filière chocolat. La flaveur chocolat classique y serait ainsi légère mais de nombreuses notes secondaires de longue durée en bouche y sont présentes. Les Criollo se distinguent par leurs notes noisette et florale.

Les Trinitario se caractérisent par leurs flaveurs acide et fruité.

Le Nacional est connu pour son arôme particulier avec des notes florales et de noix fraîches. Des descripteurs sensoriels comme fruité, cru/graine/vert peuvent y être associés. Il est à signaler que la variété Nacional de l''Équateur est célèbre pour son arôme fruité de raisin (Dreosti, 2000; Counet *et al.*, 2004).

Le cacao Arriba est apprécié pour son arôme floral et une saveur douce.

3. La fermentation : Un élément différenciateur entre le cacao standard et le cacao fin

3. 1. Les différentes étapes et méthodes

La fermentation est l'étape post-récolte dont les procédés différencient le plus selon les variétés de cacao. Ces procédés ont une grande influence sur la qualité aromatique des cacaos. La fermentation spontanée se produit par inoculation de la pulpe avec des micro-organismes naturellement présents sur la surface des cabosses de cacao, sur les mains des ouvriers, sur les outils, sur les bacs de fermentation et sur les insectes (Ostovar et Keeney, 1973; Jespersen *et al.*, 2005). Pérez Piza (2009) identifie clairement deux phases dans le processus de la fermentation (Pérez Piza, 2009). Il y a une première phase anaérobie. L'ouverture des cabosses conduit à la contamination de celles-ci par une série de micro-organismes, tels que des levures qui agissent sur les sucres de la pulpe ou du mucilage, les transformant en alcool éthylique. Pendant ce processus, la chaleur est libérée, augmentant ainsi la température de la masse fermentaire. Dans la deuxième phase anaérobie, la présence d'acide lactique est détectée. Pendant la phase aérobie, la présence d'air permet aux bactéries acétiques de transformer l'alcool en acide acétique, qui pénètre dans les cotylédons et provoque la mort de l'embryon.

Néanmoins, les matériaux utilisés pour mener à bien la fermentation du cacao varient considérablement d'une région à l'autre. De nombreuses méthodes traditionnelles de fermentation du cacao telles que les procédés de fermentation sur feuilles de banane avec des

trous alignés sur le sol ou la fermentation de cacao dans les paniers furent les plus répandues. Mais ces méthodes ont depuis été nettement améliorées grâce à l'utilisation de bacs.

Au total, cinq méthodes de fermentation du cacao existent : la fermentation sur les plates-formes de séchage, la fermentation en tas, la fermentation dans des paniers, la fermentation sur des plateaux et la fermentation dans des caisses, recouvertes de feuilles de banane et mises à fermenter 5-7 jours (Lopez et Dimick, 1995; Fowler, 1999).

La fermentation en tas est la méthode de fermentation la plus simple et la plus couramment utilisée par les petits paysans. Elle est peu coûteuse et nécessite peu de matériel. Dans la fermentation en tas, les fèves fraîches sont empilées sur des feuilles de bananier. Lorsque le tas est complet, il est recouvert de feuilles. La taille des tas varie considérablement, généralement entre 25 à 200 kg. Cette méthode est utilisée dans toute l'Afrique de l'Ouest et presque exclusivement au Ghana. Pour assurer une fermentation uniforme, pour augmenter la croissance des micro-organismes utiles et pour éviter la croissance des moisissures en surface, le tas doit être brassé tous les deux jours, généralement en formant un autre tas. Cependant, cette étape de brassage est fastidieuse et certains agriculteurs ne brassent pas ou mal les fèves (Baker *et al.*, 1994).

Les fermentations en bacs sont réalisées dans de grandes caisses en bois perforées et ouvertes. Elles mesurent généralement 1 x 1 x 1 m et contiennent un peu plus d'une tonne de graines fraîches. Ce procédé est généralement utilisé dans les grandes fermes ou plantations, par exemple à Trinité-et-Tobago et en Indonésie. Les trous sont essentiels pour assurer l'écoulement du jus et permettre à l'air d'entrer dans les bacs. Le bac peut être unique ou constitué de plusieurs bacs alignés en cascade en utilisant une pente. Dans ce dernier cas, le mélange est obtenu en déplaçant simplement les fèves d'un bac plus haut à un plus bas. L'objectif est de réduire la main-d'œuvre impliquée dans le brassage des fèves. Les bacs de fermentation sont habituellement situés dans un hangar pour les protéger de la pluie. Après l'écabossage, les fèves sont placées dans le bac le plus haut. Elles sont ensuite recouvertes de feuilles de bananier ou de sacs de jute pour retenir la chaleur et empêcher les fèves à la surface de sécher. Au cours de la fermentation, les fèves sont déplacées d'un bac à l'autre pour assurer

des conditions uniformes. Cette rotation aère la masse des fèves et, par conséquent, la température chute immédiatement après le mélange et augmente ensuite à mesure que la fermentation progresse. Elle dure de quatre à cinq jours, période pendant laquelle les fèves sont mélangées toutes les 24 heures lors des changements de bac.

Au Belize, la récolte des cabosses a lieu pendant la saison sèche, à partir de décembre et continue jusqu'à mai. Une fois les cabosses ouvertes, les fèves fraîches sont placées dans des paniers ou dans des bacs en bois pour la fermentation et recouvertes par des feuilles de bananier. Après 5-7 jours, la fermentation est complète et les graines sont posées en une seule couche au soleil pour sécher lentement. Le séchage dure 5-7 jours (McKinney, 2016).

La durée de la fermentation dépend de la variété des fèves. Pour le Trinitario, le premier brassage se fera au bout de 48 heures, avec un second brassage au bout de 96 heures, et la fin de la fermentation se situe à environ 120-168 heures. Concernant la variété Criollo, la fermentation peut se limiter à 48 heures seulement, sans brassage ou avec un brassage au bout de 24 heures.

3. 2. Les micro-organismes fermentaires

L'importance de la fermentation des fèves dans le processus de développement de la qualité du chocolat est connue depuis plus de 100 ans. De nombreuses études ont justement été menées dans différents pays producteurs pour déterminer les espèces microbiennes associées à ce processus (Schwan *et al.*, 1995; Schwan et Wheals, 2004; Arana-Sánchez *et al.*, 2015; Fernández Maura *et al.*, 2016; Jamili *et al.*, 2016; Teng-Sin *et al.*, 2016; Visintin *et al.*, 2016; Koffi *et al.*, 2017; Lagos Narváez, 2017; Mota-Gutierrez *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2019; Romanens *et al.*, 2019; Serra *et al.*, 2019; Tofalo *et al.*, 2019). Il résulte de ces études que l'écologie microbienne de la fermentation des fèves de cacao est un processus complexe qui implique une succession croissante de plusieurs populations de micro-organismes associés à différentes réactions biochimiques interdépendantes.

3. 2. 1. Les principales populations microbiennes

Parmi les nombreuses espèces de micro-organismes recensées dans le cacao en cours de fermentation, on trouve principalement les levures, les bactéries lactiques et les bactéries acétiques. Dans certains cas, des espèces de *Bacillus* ainsi que d'autres bactéries et champignons filamenteux ont également été recensées (De Vuyst *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2013; Schwan *et al.*, 2015).

3. 2. 1. 1. Les levures

La microflore levurienne associée à la fermentation du cacao a été déterminée dans plusieurs études au cours du siècle dernier (Preyer-Buitenzorg, 1901; Roelofsen et Giesberger, 1947; Rombouts, 1953; Carr *et al.*, 1979; Schwan *et al.*, 1995; Ardhana et Fleet, 2003; Jespersen *et al.*, 2005). La conclusion de ces études est que la population levurienne est très hétérogène et qu'elle dépend non seulement du site de production, de la méthode de fermentation, du pays d'origine, de la saison, etc… mais également du temps de fermentation car il apparaît que les populations de levures ne sont pas les mêmes pendant le processus de transformation du cacao. Les espèces de levure telles que *Hanseniaspora* (et son anamorphe *Kloeckera*), *Saccharomyces*, *Pichia* et *Candida* sont parmi les plus fréquemment isolées de la fermentation du cacao (Schwan *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 2001; Ardhana et Fleet, 2003; Schwan et Wheals, 2004; Jespersen *et al.*, 2005).

Concernant le type de fermentation, une étude a porté sur des échantillons de cacao ghanéen prélevés à des intervalles réguliers de fermentation en tas et en bac, sur trois sites de production et à différentes périodes au cours de la saison (Nielsen *et al.*, 2005). Les levures *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida krusei* et *Pichia membranifaciens* ont été détectés dans la plupart des fermentations, suggérant un rôle important dans la fermentation du cacao ghanéen. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida zemplinina* ont quant à elles été détectées exclusivement pendant les fermentations en bac suggérant un rôle spécifique de ces levures pour ce mode de fermentation.

Dans une étude mexicaine (Arana-Sánchez *et al.*, 2015), les résultats ont montré que *Pichia kudriavzevii*, *S. cerevisiae*, *Saccharomycopsis crataegensis* et *Hanseniaspora guilliermondii* sont les levures majoritaires. Dans une autre étude, portant sur 12 échantillons de fèves de cacao

provenant de différents pays (Brésil, Equateur, Côte d'Ivoire et Malaisie), les espèces de levures les plus fréquemment rencontrées étaient *Hanseniaspora* sp., suivies de *Pichia kudriavzevii* et de *Saccharomyces cerevisiae* indépendamment de l'origine du cacao (Papalexandratou et De Vuyst, 2011). Ces résultats semblent confirmer la prévalence de ces trois familles de levures (*Hanseniaspora*, *Pichia* et *Saccharomyces*) dans le processus de maturation des fèves de cacao quel que soit son origine géographique.
De nombreuses études ont par ailleurs montré que ces dernières sont présentes dès le début de la fermentation des fèves de cacao (Steinmann, 1928; Roelofsen et Giesberger, 1947; Rombouts, 1952; Roelofsen, 1958; De Camargo *et al.*, 1963; Ostovar et Keeney, 1973; Gauthier *et al.*, 1977; Passos *et al.*, 1984; Schwan *et al.*, 1995).

Par ailleurs plusieurs travaux tendent à confirmer que la croissance et l'activité des levures joue un rôle majeur sur la qualité aromatique du cacao.
Une étude s'est particulièrement intéressée au rôle de ces levures lors de la fermentation (Ho *et al.*, 2014). Les tests sont réalisés en présence ou en absence d'un inhibiteur de levure (natamycine). Les analyses physico-chimiques ont montré que les fèves fermentées sans levures avaient des teneurs plus élevées en bactéries (coques), une production d'éthanol, d'alcools supérieurs et d'esters plus faible ; et tout au long de la fermentation une production de pyrazines inférieure dans le produit torréfié. Le cut test a révélé que les fèves fermentées sans levures étaient de couleur violette et non entièrement brune et le chocolat préparé à partir de ces fèves était plus acide et manquait de saveurs caractéristiques de chocolat. Les fèves fermentées sans inhibiteur de levure étaient quant à elles pleinement de couleur brune et ont donné du chocolat avec des descripteurs typiques qui ont été nettement préférés par les panelistes sensoriels.

Une autre étude s'est intéressée au rôle des levures dans la fermentation du cacao (Jamili *et al.*, 2016). Celle-ci indique que l'ajout d'un inoculum de levure dans la fermentation peut améliorer la qualité des fèves de cacao. Les fèves ensemencées avec les levures sont mieux fermentées que celles non ensemencées avec des levures. Cela est confirmé lors du cut test où il y a plus de fèves brunes et moins de fèves ardoisées.

3. 2. 1. 2. Les bactéries lactiques

Les souches de bactéries lactiques isolées et identifiées à partir des fèves de cacaos provenant de différents pays sont principalement les *Lactobacillus plantarum* et les *Lactobacillus*

fermentum (Ardhana et Fleet, 2003; Gálvez *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008a; Lefeber *et al.*, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2011a; Pereira *et al.*, 2012; Papalexandratou *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Hamdouche *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015).

D'autres souches de bactéries lactiques ont été isolées telles que *Lactobacillus pentosus* (Gálvez *et al.*, 2007; Papalexandratou *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2015), *Lactobacillus casei* (Moreira *et al.*, 2013), *Lactobacillus rhamnosus* (Moreira *et al.*, 2013), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Gálvez *et al.*, 2007), *Lactobacillus brevis* (Gálvez *et al.*, 2007), *Lactobacillus cellobiosus* (Ardhana et Fleet, 2003), *Fructobacillus pseudofilculneus* (Lefeber *et al.*, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2011a), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (Camu *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007; Papalexandratou *et al.*, 2011b; Papalexandratou *et al.*, 2013), *Leuconostoc pseudoficulneum* (Nielsen *et al.*, 2007), *Enterococcus casseliflavus* (Camu *et al.*, 2007) et *Pediococcoccus acidilactici* (Nielsen *et al.*, 2007). Leur présence est variable en fonction des lots étudiés et leur rôle est mitigé dans la fermentation du cacao. Des études décrivent que les bactéries lactiques mènent trois activités majeures au cours de la fermentation des fèves de cacao : (i) elles fermentent les sucres de la pulpe, principalement glucose et fructose, à l'aide principalement d'acide lactique et de moindres quantités d'éthanol et d'acide acétique, (ii) elles utilisent l'acide citrique de la pulpe pour produire principalement de l'acide lactique, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et le 2,3-butanediol et (iii) certaines espèces peuvent réduire la pulpe de fructose contenu dans la pulpe en mannitol (Camu *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008b; De Vuyst *et al.*, 2010; Lefeber *et al.*, 2011). Une autre étude montre que les fèves en présence ou en l'absence de bactéries lactiques sont entièrement fermentées, et donnent des chocolats au même profil sensoriel (Ho *et al.*, 2015).

3. 2. 1. 3. Les bactéries acétiques

Les bactéries acétiques peuvent métaboliser des sucres et des acides organiques pour produire divers composés aldéhydiques, cétoniques et d'autres produits volatils (Drysdale et Fleet, 1988) qui pourraient avoir un impact positif sur la qualité sensorielle des fèves.

La souche *Acetobacter pasteurianus* est la plus répandue dans la fermentation spontanée des fèves de cacao, probablement en raison de sa capacité à oxyder l'éthanol, le mannitol et l'acide lactique et sa tolérance aux acides et à la chaleur (Ardhana et Fleet, 2003; Camu *et al.*, 2007; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008a; Lefeber *et al.*, 2010; Lefeber *et al.*, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2011a; Papalexandratou *et al.*, 2011b;

Papalexandratou *et al.*, 2011c; Crafack *et al.*, 2013; Illeghems *et al.*, 2013; Meersman *et al.*, 2013; Papalexandratou *et al.*, 2013; Moens *et al.*, 2014). D'autres souches comme *Acetobacter syzygii* et *Acetobacter tropicalis* apparaissent également fréquemment et font parties des espèces dominantes dans le cacao (Pereira *et al.*, 2012; Crafack *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013).

D'autres bactéries acétiques minoritaires ont également été trouvées en provenance de différents pays telles que *Acetobacter lovaniensis* (Gálvez *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008a; Cleenwerck *et al.*, 2008; De Vuyst *et al.*, 2008; Hamdouche *et al.*, 2015), *Acetobacter cerivisiae* (Pereira *et al.*, 2012; Hamdouche *et al.*, 2015), *Acetobacter nitrogenifigens* (Hamdouche *et al.*, 2015), *Acetobacter ghanensis* (Camu *et al.*, 2008a; Cleenwerck *et al.*, 2008; Lefeber *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Papalexandratou *et al.*, 2013), *Acetobacter senegalensis* (Camu *et al.*, 2008a; Lefeber *et al.*, 2011; Papalexandratou *et al.*, 2011a; Papalexandratou *et al.*, 2013), *Acetobacter fabarum* (Cleenwerck *et al.*, 2008; Papalexandratou *et al.*, 2011a; Papalexandratou *et al.*, 2013), *Acetobacter peroxydans* (Papalexandratou *et al.*, 2013), *Acetobacter malorum* (Pereira *et al.*, 2012), *Acetobacter syzgii* (Nielsen *et al.*, 2007; Cleenwerck *et al.*, 2008; De Vuyst *et al.*, 2008), *Acetobacter aceti* (Ardhana et Fleet, 2003), *Gluconobacter frateurii* (Ho *et al.*, 2014), *Gluconobacter xylinum* (Hamdouche *et al.*, 2015), *Gluconobacter liquefaciens* (Moreira *et al.*, 2013) et *Gluconobacter oxydans* (Papalexandratou *et al.*, 2013).

3. 2. 2. Rôle biochimique des micro-organismes du cacao

Plusieurs rôles ont été attribués à ces micro-organismes telles que leurs actions au niveau de la pulpe, au niveau de la maturation de la fève ou encore de la biosynthèse de nouvelles molécules. Nous décrivons ci-après différents rôles comme la succession microbienne au niveau de la pulpe, les fermentations spontanées et celles contrôlées à l'aide de starters et enfin les composés volatils produits à partir de souches de levures.

3. 2. 2. 1. Action au niveau de la pulpe

La pulpe de la fève est riche en sucres fermentescibles tels que le glucose, le fructose et saccharose et présente un pH relativement faible (autour de 3,0 - 3,5 unités) en raison principalement de la présence d'acide citrique. Ces conditions sont favorables pour la croissance

des levures et des bactéries lactiques. En effet, la teneur élevée en sucre, le pH faible et la faible pression en oxygène favorisent la croissance en semi-anaérobiose des levures (Thompson *et al.*, 2001). Ces conditions particulières favorisent la fermentation alcoolique et la croissance séquentielle des levures fermentaires de type *Kloeckera* (et sa forme imparfaite *Hanseniaspora*), *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* et *Pichia*. Ces conditions favorisent également la croissance de bactéries lactiques telles que *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* qui fermentent également les sucres de la pulpe et métabolisent l'acide citrique. De fait, ces bactéries sont plutôt considérées comme indésirables par rapport au développement des autres formes de micro-organismes à savoir les levures et les bactéries acétiques. Ces dernières, principalement *Acetobacter* et *Gluconobacter* métabolisent l'acide acétique à travers l'oxydation de l'éthanol produit par les levures.

3. 2. 2. 2. Action au niveau de la fève

Lors de la fermentation, l'augmentation de la température s'accompagne de la dégradation des sucres de la pulpe des fèves par les levures et les bactéries lactiques. Les acides organiques vont alors migrer dans les cotylédons et l'acidification combinée à l'effet de la chaleur conduira à une dégradation rapide des protéines de stockage et des glucides par des enzymes dérivées de la graine et favorisera la production de peptides, d'acides aminés libres et de sucres réducteurs qui sont les précurseurs d'arôme du chocolat. En outre, les composés phénoliques subissent des réactions de brunissement ayant pour résultat une diminution de l'astringence et la formation de la couleur brune typique. Enfin, les acides organiques produits lors de la fermentation sont responsables de la saveur acide basique du cacao brut (Schwan et Wheals, 2004; Afoakwa *et al.*, 2008).

La fermentation implique donc deux phénomènes distincts mais inter-dépendants : 1) l'activité microbienne qui favorise l'élimination de la pulpe mucilagineuse des fèves de cacao et qui déclenche 2) les réactions biochimiques responsables de la modification de la composition chimique des fèves, et plus précisément dans les cotylédons (Biehl et Voigt, 1982; Portillo *et al.*, 2006). Au cours de la fermentation, il y a une migration de l'acide acétique produit par les bactéries acétiques de la pulpe vers la fève ce qui entraîne la mort de l'embryon végétal.
Une fois ouvertes les cabosses sont contaminées par une série de micro-organismes, en particulier les levures qui agissent sur les sucres de la pulpe (ou le mucilage) et les transformant en alcool éthylique. Pendant ce processus qui se déroule en conditions semi-anaérobie, de la

chaleur est libérée générant une augmentation de la température du lot de graines. Dans cette phase anaérobie, la présence d'acide lactique est également détectée et ce dernier sera converti en acide butyrique. Le rôle des bactéries lactiques lors de la fermentation est donc assez controversé. Pour certains, elles sont responsables de l'assimilation d'acide citrique, la production d'acide lactique et la conversion du fructose en mannitol (Ho *et al.*, 2013). Pour d'autres, elles n'influent pas la fermentation. Par exemple, les travaux de Pereira et collaborateurs font un état des lieux de la recherche sur la fermentation du cacao (Pereira *et al.*, 2016) et montrent que les bactéries lactiques n'ont pas de rôle essentiel dans la fermentation du cacao. De même, dans une étude sur du cacao australien (Ho *et al.*, 2018), l'ensemencement des fèves par des bactéries lactiques et acétiques semble indiquer que ces dernières ne sont pas essentielles au bon déroulement de la fermentation. De plus, l'acide lactique peut nuire à la qualité des fèves de cacao et du chocolat, entraînant une baisse excessive de l'acidité. En effet, la production en excès d'acide lactique non-volatile par les bactéries lactiques et sa migration dans les fèves peut contribuer à la forte acidité des fèves de cacao de certaines régions et à la diminution de la qualité de chocolat (Jinap, 1994). Pendant la phase aérobie, générée par le brassage quotidien des fèves, les bactéries acétiques vont transformer l'alcool en acide acétique qui va pénétrer dans les cotylédons et provoquer la mort de l'embryon végétal. Ce processus va en effet provoquer des réactions enzymatiques endogènes dans la fève qui vont générer des précurseurs d'arôme du chocolat, qui se développeront pleinement lors de la torréfaction de la fève fermentée (Ho *et al.*, 2013). L'acide acétique est ensuite oxydé en dioxyde de carbone et en eau. Les bactéries acétiques jouent donc un rôle important pendant la fermentation du cacao car les principaux produits obtenus à partir de l'éthanol, et en particulier l'acétate, sont les principaux ingrédients du développement des composés aromatiques souhaités pour le cacao (Adler *et al.*, 2014).

3. 2. 2. 3. Fermentations spontanées et fermentations contrôlées à l'aide de starters

La fermentation spontanée se produit naturellement par contact de la pulpe du fruit avec des micro-organismes présents dans l'environnement par exemple à la surface des cabosses de cacao, à l'intérieur des caisses de fermentation, sur les mains des manipulateurs, sur les outils utilisés pour l'écabossage, sur les insectes en contact avec les fèves (Roelofsen, 1958; Ostovar et Keeney, 1973; Jespersen *et al.*, 2005). La propagation et l'homogénéisation de ces flores sur

la matière première sera par ailleurs favorisé par un brassage régulier des fèves en cours de fermentation.

La fermentation demeure un processus catalysé par des micro-organismes et il est particulièrement difficile à contrôler. De fait, la qualité marchande du cacao produit par fermentation spontanée reste donc relativement variable et aléatoire (Ban Koffi *et al.*, 2013). Une meilleure connaissance des mécanismes d'intervention de chacune des flores microbiennes devrait permettre de mieux comprendre les étapes de la fermentation, ainsi que les marqueurs (positifs ou négatifs) de qualité du produit fini.

Dans une étude portant sur le cacao indien, Sandhya et collaborateurs ont montré que l'ajout d'un consortium de micro-organismes composé de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, d'une souche de *Lactobacillus plantarum* et d'une souche de *Acetobacter aceti* pouvait conduire à un cacao de bonne qualité en caisses de fermentation avec des fèves de couleur brune et des teneurs faibles en acide lactique, en polyphénols et en alcaloïdes (Sandhya *et al.*, 2016). Cet inoculum permet également de réduire à 3 jours le temps de fermentation optimal, contre 5 à 7 jours dans le cas d'une fermentation naturelle. Dans une autre étude sur du cacao malaisien (Papalexandratou *et al.*, 2013), un mélange de *Hanseniaspora opuntiae* (et/ou de *Saccharomyces cerevisiae*), de *Lactobacillus fermentum* et *Acetobacter pasteurianus* serait l'inoculum idéal pour contrôler la fermentation des fèves de cacao.

Ainsi, la fermentation naturelle serait de plus en plus délaissée au profit de la fermentation contrôlée à l'aide de starters microbiens, principalement chez les industriels, afin d'obtenir un produit spécifique (De Vuyst et Weckx, 2016; Menezes *et al.*, 2016) et de diminuer le temps de fermentation par rapport à la fermentation naturelle (Cempaka *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2014; Jamili *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2016; Sandhya *et al.*, 2016). Une étude menée par Crafack et collaborateurs a montré des différences importantes au niveau des composés volatils et de l'analyse sensorielle de cacaos produits en tas et en plateau à l'aide de souches microbiennes sélectionnées par rapport au cacao fermenté de manière naturelle (Crafack *et al.*, 2013). En effet, les cacaos ensemencés à l'aide de starters ont une plus forte intensité de doux, de fruité et d'arôme de cacao tandis que ceux issus de la fermentation spontanée sont plus amers, acides et astringents (Crafack *et al.*, 2013). Une autre étude a montré des différences uniquement sur le profil sensoriel (Crafack *et al.*, 2014).

De nombreuses autres études antérieures ont montré l'impact positif de l'ajout de starters sur la fermentation des fèves de cacao (Sanchez *et al.*, 1985; Samah *et al.*, 1992; Samah *et al.*, 1993; Buamah *et al.*, 1997; Schwan, 1998; Dzogbefia *et al.*, 1999; Leal Jr *et al.*, 2008).

La fermentation du cacao étant l'une des étapes-clés du traitement post-récolte, d'autres études sur d'autres paramètres impliqués dans la fermentation ont été menées, toujours en relation avec la qualité des fèves : impact du stockage des fèves avant la mise en fermentation (Torres *et al.*, 2004; Afoakwa *et al.*, 2011; Afoakwa *et al.*, 2014) ; impact du type de fermentation comme le séchage sur claies en bois, la comparaison de fermentations en bac en bois, en bac plastique et en tas, la comparaison de fermentations en caisse, sur feuilles de bananier et sur bâche plastique (Nogales *et al.*, 2006; Guehi *et al.*, 2010d; Ban Koffi *et al.*, 2013) ; impact du nombre de brassage (Senanayake *et al.*, 1997; Puziah *et al.*, 1998; Liendo, 2015).

3. 2. 3. Les composés aromatiques

Les composés volatils détectés au niveau olfactif ou gustatif sur les cacaos ou chocolats proviennent de 3 catégories d'arômes (Barel, 2016) :
- l'arôme de constitution qui est présent dans la fève fraîche et typique de l'origine variétale de certains cacaos,
- l'arôme fermentaire qui apparaît pendant la fermentation des fèves par les micro-organismes,
- et l'arôme thermique qui apparaît après l'étape de la torréfaction.

La production des composés volatils par des souches de levures et leurs notes olfactives associées sont présentés dans le Tableau II.

Tableau II. *Composés volatils produits par des souches de levures et leurs notes olfactives associées*

Levures isolées	Notes	Composés volatils					
		Ester	Acide	Alcool	Aldéhyde	Cétone	Hétérocycle
Hanseniospora guilliermondii	Floral	- Acétate de 2-phényléthyle [6,7]		- 2-méthylbutan-1-ol [6,7]			
Kluyveromyces marxianus	Floral	- Acétate de 2-phényléthyle [3]					
		- Isovalérate d'éthylphényle [3]					
	Fruité	- Acétate d'isoamyle [3]					
	Pop-corn						- 2-acétyl-1-pyrroline [10]
Pichia kudriavzevii	Floral	- Acétate d'éthylphényle [1,5]		- 2-phényléthanol [4,5]			
	Fruité	- Acétate d'éthyle [4,5,9]			- Acétaldéhyde [9]	- Nonan-2-one [4]	
		- Acétate d'isoamyle [4,5,11]				- Pentan-2-one [4]	
		- Acétate d'isobutyle [5,11]					
		- Hexanoate d'éthyle [5]					
		- Octanoate d'éthyle [5]					
		- Décanoate d'éthyle [5]					
	Chocolat			- 3-méthylbutanol [5]			
				- Isopentanol [4]			
	Végétal			- Pentan-2-ol [4]			
	Indésirable			- Ethanol [2,4,5,9,12]			
				- Isobutanol [5]			
	Beurre					- 2,3-butadione [9]	
	Non déterminé	- Acétate d'hexyle [9]		- 2-méthylbutanol [5]			- 3-phénylfurane [5]
		- n-butyl acétate [9]					
		- Propanoate d'éthyle [5]					
		- Propanoate d'isoamyle [5]					
Pichia galeiformis	Floral			- 2-phényléthanol [5]			
Pichia manshurica	Floral			- 2-phényléthanol [4]			
	Fruité					- Nonan-2-one [4]	
						- Pentan-2-one [4]	
	Chocolat			- Isopentanol [4]			
	Végétal			- Pentan-2-ol [4]			
	Indésirable			- Ethanol [4,8]			
	Non déterminé	- Benzoate d'isoamyle [4]					
Saccharomyces cerevisiae	Floral	- Acétate d'éthylphényle [13]		- 2-phényléthanol [13]			
	Fruité	- Acétate d'éthyle [13]			- Acétaldéhyde [13]		
		- Acétate d'isoamyle [13]					
		- Hexanoate d'éthyle [13]					
		- Octanoate d'éthyle [13]					
		- Décanoate d'éthyle [13]					
	Beurre					- 2,3-butadione [13]	
						- Acétoïne [13]	
	Indésirable		- Acide acétique [13]				
Wickerhamomyces anomalus	Floral	- Acétate d'éthylphényle [5]		- 2-phényléthanol [5]			
	Fruité	- Acétate d'éthyle [5]					
		- Acétate d'isoamyle [5]					
		- Acétate d'isobutyle [5]					
		- Hexanoate d'éthyle [5]					
		- Octanoate d'éthyle [5]					
		- Décanoate d'éthyle [5]					
	Chocolat			- 3-méthylbutanol [5]			
	Indésirable		- Acide acétique [5]	- Ethanol [5]			
				- Isobutanol [5]			
	Non déterminé	- Propanoate d'éthyle [5]		- 2-méthylbutanol [5]			

[1] Annan N. T., Poll L., Sefa-Dedeh S., Plahar W. A. and Jakobsen M. (2003). "Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough." *Journal of Applied Microbiology* **94**: 462-474.

[2] Chamnipa N., Thanonkeo S., Klanrit P. and Thanonkeo P. (2018). "The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production." *Brazilian Journal of Microbiology* **49**: 378-391.

[3] Fabre C. E., Duviau V. J., Blanc P. J. and Goma G. (1995). "Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*." *Biotechnology Letters* **17**(11): 1207-1212.

[4] Hamdouche Y. (2015). Discrimination des procédés de transformation post-récolte du Cacao et du Café par analyse globale de l'écologie microbienne. Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques ; Ecole doctorale Sciences des Procédés - Sciences des Aliments ; Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie. Montpellier, Montpellier SupAgro. **Thèse de Doctorat**.

[5] Koné K. M., Guéhi T. S., Durand N., Ban-Koffi L., Berthiot L., Fontana Tachon A., Brou K., Boulanger R. and Montet D. (2016). "Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation." *Food Research International* **89**: 910-917.

[6] Moreira N., Mendes F., Guedes de Pinho P., Hogg T. and Vasconcelos I. (2008). "Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must." *International Journal of Food Microbiology* **124**: 231-238.
[7] Moreira N., Pina C., Mendes F., Couto J. A., Hogg T. and Vasconcelos I. (2011). "Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications." *Food Control* **22**: 662-667.
[8] Papalexandratou Z., Falony G., Romanens E., Jimenez J. C., Amores F., Daniel H.-M. and De Vuyst L. (2011). "Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations." *Applied and Environmental Microbiology* **77**(21): 7698-7714.
[9] Pereira G. V. M., Alvarez J. P., Neto D. P. C., Soccol V. T., Tanobe V. O. A., Rogez H., Góes-Neto A. and Soccol C. R. (2017). "Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans." *LWT - Food Science and Technology* **84**: 290-297.
[10] Rungsardthong V. and Noomhoom A. (2005). "Production of 2-acetyl-1-pyrroline by microbial cultures." *Flavour and Fragrance Journal* **20**: 710-714.
[11] Saerens S. and Swiegers J. H. (2016). Enhancement of cocoa quality and flavor by using *Pichia kluyveri* yeast starter culture for cocoa fermentation.
[12] Tolieng V., Kunthiphun S., Savarajara A. and Tanasupawat S. (2018). "Diversity of yeasts and their ethanol production at high temperature." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **8**(2): 136-142.
[13] Patrignani F., Chinnici F., Serrazanetti D. I., Vernocchi P., Ndagijimana M., Riponi C. and Lanciotti R. (2016). "Production of volatile and sulfur compounds by 10 *Saccharomyces cerevisiae* strains inoculated in Trebbiano must." *Frontiers in Microbiology* **7**(243).

Les travaux de Ho et collaborateurs suggère que la croissance des bactéries lactiques et des bactéries acétiques ne serait pas essentielle à la fermentation des fèves de cacao au niveau de l'aspect aromatique (Ho *et al.*, 2018). Cette étude vient confirmer les résultats d'une étude antérieure qui tendent à démontrer que les bactéries lactiques ne sont pas essentielles à la fermentation du cacao au niveau des activités enzymatiques (Ho *et al.*, 2015). Ces études sont en contradiction avec les travaux de Forsyth et Quesnel qui indiquent que les bactéries acétiques jouent un rôle clé dans la formation de la saveur du chocolat (Forsyth et Quesnel, 1963). Globalement ces travaux ont tendance à montrer que des 3 principaux groupes de micro-organismes retrouvés sur les fèves de cacao, seules les levures auraient un rôle déterminant dans la fermentation du cacao au niveau de la qualité aromatique, tandis que les bactéries acétiques auraient un rôle secondaire, voire négatif sur la qualité en ce qui concerne les bactéries lactiques.

4. La qualité des cacaos de Madagascar

Depuis quelques années, des pays comme le Vietnam, les Philippines, l'Indonésie, … ont exprimé leur intérêt pour faire partie des pays producteurs de fèves de cacao de qualité.

Néanmoins, le cercle des pays producteurs 100 % cacao fin reste restreint. Madagascar est l'un des derniers pays admis par l'ICCO à en faire partie (ICCO, 2016). Cependant, la tradition cacaoyère est ancienne.

4. 1. Historique de la cacaoculture à Madagascar

Le cacao est introduit à Madagascar en 1890 par des colons anglais (Barel, 2016). Pendant la période de la colonisation, la cacaoculture y a été établie afin d'alimenter en cacao le marché européen. Pendant cette période, Madagascar exportait plus de 120 tonnes de cacao par an et la grande majorité de cette production venait des plantations coloniales du pays. Ainsi la variété Criollo fut introduite vers le début du 20ème siècle (Rakotomaharo, 1973). Vers les années 1920, la variété Forastero fut introduite à son tour pour remédier au manque de productivité et à la sensibilité du Criollo face aux maladies. En 1958, l'IFCC (Institut Français du Café et du Cacao) a démarré à des recherches sur les plants de cacaoyers et a pu obtenir la troisième variété, le Trinitario qu'elle a obtenu par croisement du Criollo et du Forastero. Cette nouvelle espèce très productive domine actuellement la plantation cacaoyère du Sambirano. En effet, pour conserver la spécificité du cacao malgache, des programmes de sélection et d'amélioration génétique par des croisements et des sélections ont été mis en œuvre dès le début de l'année 1962 par l'IFCC à Ambanja. C'est au sein de cette station de recherche qu'ont été créées les variétés hybrides de Trinitario.

4. 2. Production actuelle et commercialisation

La culture du cacao à Madagascar génère une production de 8 000 tonnes de fèves par an mais ne représente que 0,2 % de la production mondiale. Les régions Diana et Sava, au nord de la grande île, sont les fiefs de cette production, principalement autour d'Ambanja et dans la vallée du Sambirano.

Le district d'Ambanja assure les 97 % de la production nationale de cacao (OMEF, 2008). Le reste est assuré par les districts d'Ambilobe, de Sambava et d'Antalaha. La

production de cacao malgache a connu une augmentation passant de 100 à 7 799 tonnes de 1914 à 2008.

La production de cacao marchand est principalement exportée sous forme de fèves mais quelques sociétés transforment les fèves de cacao directement à Madagascar. Par exemple, la Société d'Exploitation de CAcao de MADagascar (SECAMAD) située à Diego-Suarez produit de la masse de cacao. Les sociétés Robert et Cinagra produisent également du chocolat destiné principalement au marché local pour la première, tandis que les tablettes sont présentes dans différents points de vente dans le monde pour la seconde. La société Akesson's Organic Madagascar (AO) qui dispose de 5 fermes situées à Menavava, Madirofolo, Bejofo, Ambolikapiky et à Ampahakabe est aussi un producteur de cacao marchand.

Actuellement, les principaux pays importateurs du cacao malgache sont les Pays-Bas, la France, l'Allemagne, la Turquie et l'Espagne.

4. 3. Le traitement post-récolte des fèves de cacao

4. 3. 1. La collecte par les acteurs post-récolte du cacao dans le Sambirano

A Madagascar, à part quelques exploitants industriels comme ceux cités précédemment, l'essentiel de la production du cacao est produit par des structures artisanales. Les plantations paysannes sont faites en ayant recours à la main d'œuvre familiale pour la majeure partie et représentent les 2/3 de la production locale. La culture du cacao tient une place prépondérante dans la vie des petits producteurs car elle assure une source financière régulière.

Selon une étude de Bousquet (2013), 3 structures d'exploitation existent donc à Madagascar à savoir :

- les groupes industriels, notamment AO Madagascar
- les producteurs membres de coopératives (ADAPS : Association pour le Développement de l'Agriculture et du Paysannat du Sambirano)
- les producteurs indépendants

Les acteurs de la filière cacao sont nombreux dans le district d'Ambanja. Entre les producteurs et les sociétés exportatrices, de nombreux intermédiaires interviennent dans la filière du cacao. Les fèves fraîches ou séchées sont vendues par les producteurs aux petits, moyens ou grands collecteurs suivant la quantité de fèves disponible (Bousquet, 2013). Les paysans producteurs qui négocient directement avec les exportateurs sont rares, alors que les coopératives et certaines sociétés productrices négocient directement avec les exportateurs ou réalisent eux même directement l'exportation (Rahaingosambatra, 2014) (Figure 7).

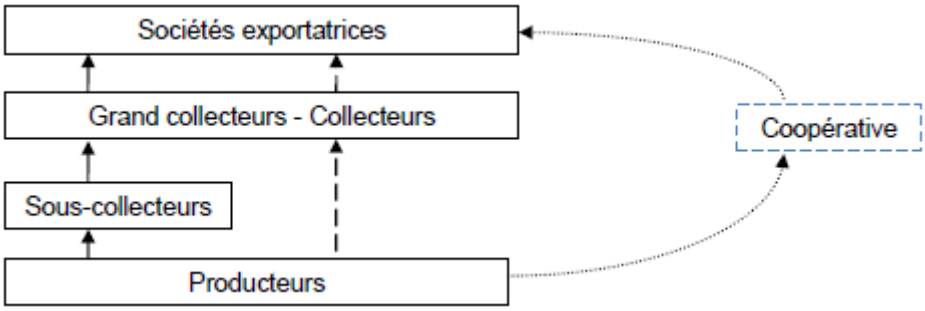


Figure 7. Organisation de la collecte de cacao dans le Sambirano

Généralement, les producteurs vendent les fèves de cacao fraîches ou fermentées, non triées et peu séchées. Les sous-collecteurs achètent des fèves fraîches aux producteurs pour les revendre ensuite. Quant aux petits et moyens collecteurs, ils effectuent les étapes de fermentation et de séchage partiel et revendent les fèves. Les grands collecteurs achètent des fèves fraîches ou sèches, effectuent la fermentation pour les fèves fraîches, font le séchage des fèves fermentées ou mal séchées, éliminent les fèves à défaut lors du tri et stockent les fèves de cacao marchand (Bousquet, 2013). Dans le Haut Sambirano, les producteurs vendent soit leurs fèves fermentées et séchées aux grands collecteurs soit leurs fèves fraîches à des petits ou moyens collecteurs qui effectueront l'étape de fermentation et de séchage. Les procédés de fermentation sont essentiellement réalisés dans des sacs mais dans le cas de certaines coopératives, la fermentation peut également se faire dans un bac unique ou dans des bacs en cascade. Dans le Bas Sambirano, le Sud, l'Ouest et la périphérie d'Ambanja, les conditions de circulation permettent un accès rapide aux sociétés exportatrices. Ainsi, les producteurs privilégient la vente des fèves fraîches et préfèrent laisser les étapes post-récolte aux collecteurs ou aux sociétés exportatrices afin de se consacrer pleinement à la récolte et à l'écabossage (Bousquet, 2013).

- Les collecteurs

Les jours de marché sont proclamés et instaurés dans chaque Fokontany (subdivision d'une commune). Ces jours correspondent à la récolte, à la collecte et à la commercialisation des fèves fraîches. Mais il est à noter que la vente du cacao marchand se présente encore sous une véritable anarchie. Au sein de la filière cacao, plusieurs acteurs intermédiaires intervenant dans l'activité de collecte se distinguent. Ces derniers fixent eux-mêmes les prix et se soucient peu de la qualité (Ranaivoson, 2009).

Le cacao est acheté sous deux formes au niveau des producteurs : cacao frais et cacao sec. Le cacao frais provient de l'ouverture de cabosses et les fèves issues sont non fermentées tandis que le cacao sec provient de fèves fermentées et séchées. Le cacao sec concerne surtout les surplus de production qui ne sont pas vendus frais pour subvenir aux besoins quotidiens. La transformation des fèves fraîches achetées aux producteurs est assurée par les collecteurs. Puis le cacao marchand est livré aux sociétés exportatrices.

- Les coopératives

La vente en coopérative constitue une autre alternative de commercialisation. La coopérative effectue directement des contrats d'achats avec les sociétés exportatrices. Pour les cacaos secs, les membres de bureau de la coopérative et le responsable de collecte de la société définissent ensemble les périodes de livraison et les quotas selon la capacité des producteurs membres. De même, pour le cacao frais, les collecteurs de la société descendent en brousse pour recueillir la production. Cette descente peut cependant être interrompue du fait de l'enclavement de la zone en période de fortes pluies. Généralement, les membres de la coopérative répartissent leur production selon leur quantité. Seul le surplus de production vendu frais est livré à la coopérative.

Pour sortir du marché traditionnel et pour inciter les producteurs à fournir des produits de qualité, les coopératives de l'ADAPS réalisent des contrats d'achat avec certains opérateurs économiques dont Millot et Ramaex. Ils achètent les produits à un prix relativement plus élevé que celui du marché, du fait de la récupération des marges saisies par les intermédiaires. Et ils attribuent une prime pour les produits de qualité supérieure et de qualité standard. Les primes sont perçues trimestriellement avec Millot et semestriellement en mi-juin et en mi-décembre avec Ramaex. Le montant des primes de l'année 2008 s'élève à 124 Ar/kg (≈ 0,05 €/kg) pour

le cacao frais avec Millot et 210 Ar/kg (≈ 0,08 €/kg) de cacao sec supérieur avec Ramaex (Ranaivoson, 2009).

4. 3. 2. La fermentation

Selon l'étude sur la caractérisation des cacaos dans la vallée du Sambirano (Bousquet, 2013), 3 types de fermentation existent dans cette zone :

• Une fermentation dans des sacs en polypropylène, utilisée par 55 % des coopératives et par la majorité des petits et moyens collecteurs et producteurs individuels
• Une fermentation dans des bacs en bois, utilisée par certains moyens collecteurs et 40 % des coopératives
• Une fermentation dans des bacs en bois en cascade (3 ou 4 rangées de bacs les uns en dessous des autres), utilisée principalement par les grandes sociétés et certaines coopératives (environ 5 %).

La fermentation en sac est réalisée lorsque le volume de fèves est peu important (60 kg environ) car la contenance du sac est limitée. Le cacao obtenu à l'issue de ce type de fermentation est principalement du cacao standard. Cela est expliqué par la fermentation courte (3 jours) mais il est possible qu'elle dure 4 ou 5 jours avec un brassage au bout de 3 jours. Le séchage est partiel et se fait au soleil (aires cimentées, bâches en plastique ou tapis en natte tressée). Le séchage dure en moyenne 3 jours avec une exposition moyenne de 8 heures/jour. Pendant la nuit, les différents lots de cacao sont stockés dans des sacs en polypropylène et entreposés dans un endroit couvert.

La fermentation en bacs cloisonnés est adaptée aux volumes intermédiaires (300 à 400 kg environ). Elle présente l'avantage de traiter un volume supérieur à 60 kg tout en nécessitant moins de place que les bacs en cascade.

Le procédé de fermentation en bac en cascade est utilisé lorsqu'il faut traiter de gros volumes de fèves fraîches car ce procédé permet de fermenter un gros volume de fèves simultanément. Les cabosses sont récoltées et écabossées le même jour. La fermentation débute lorsque les fèves sont introduites dans le 1er bac et dure 6 jours. Les bacs de fermentation ont une

contenance maximale de 1500 kg et sont constitués de planches de bois de ravenale (*Ravenala madagascariensis*) entre lesquelles les jus de fermentation s'écoulent. Des sacs de jute propres sont posés sur le dessus des fèves afin de conserver une chaleur dans la masse fermentaire. La société AO Madagascar possède 4 bacs en cascade. Après 48 h de fermentation dans le 1er bac, les fèves sont brassées et basculées dans le 2ème bac situé plus bas. Après 48 h de fermentation dans le 2ème bac, les fèves sont brassées et basculées dans le 3ème bac situé plus bas. Après 24 h de fermentation dans le 3ème bac, les fèves sont brassées et basculées dans le 4ème et dernier bac situé en bas. Au bout de 24 h de fermentation dans le 4ème bac, les fèves sont retirées du dernier bac et mises à sécher.

4. 3. 3. Le séchage

Le séchage peut différer selon les sociétés (AO Madagascar, Millot, …). Par exemple pour la société AO Madagascar, le procédé consiste à arrêter la fermentation et permet d'abaisser la teneur en eau pour un bon stockage des fèves. Chez AO Madagascar, une fois les fèves fermentées, le séchage débute par une exposition au soleil des fèves fermentées sur une aire cimentée pendant 3 h pour stopper la fermentation et éliminer une partie de l'eau. Pendant cette période, un brassage des fèves à l'aide de râteaux en bois est réalisé en permanence pour un séchage uniforme des fèves. Au bout de 3 h au soleil, les fèves sont ramassées et étalées dans un endroit cimenté, couvert et aéré pour éviter une évaporation d'eau trop rapide. Le jour suivant, les fèves sont étalées sur des tiroirs en bois mobiles qui sont exposés au soleil pendant 8 h puis rentrés sous un hangar jusqu'au lendemain. Les fèves sont brassées toutes les 45 min à l'aide de râteaux en bois. Après 3 jours d'exposition des tiroirs soit 24 h au soleil, les fèves sont étalées de nouveau 8 h/jour sur aire cimentée. Les fèves d'un même lot sont ensuite mises dans un sac en polypropylène stocké dans un hangar jusqu'au lendemain. Le séchage s'arrête lorsque l'hygrométrie est inférieure à 8 %. La durée de séchage dépend évidemment des conditions climatiques mais demande en général de 8 à 15 jours.

En cas de pluie importante, le séchage artificiel est pratiqué, en mettant les fèves sous air chaud, dans le séchoir, cela ne prend alors que 15 à 36 h. Les fèves sont étalées sur une plaque de tôle perforée et chauffée par un foyer à bois. Les fèves sont fréquemment remuées.

Pour la société Millot, le séchage des fèves lavées pendant 3 h environ est réalisé sur une aire de séchage cimentée. Suivant le cacao marchand voulu, 2 procédés sont utilisés :

- un séchage sur tiroir en bois (fèves bio) : ce tiroir permet de sécher leur produit biologique après un passage sur le séchage en ciment pour les fèves lavées ou non. Les fèves vont rester sur ce tiroir jusqu'à ce qu'elles soient sèches, en remuant les fèves toutes les heures.
- un séchage sur claie en bois (fèves conventionnelles) qui a le même fonctionnement que le tiroir mais à la différence que celle-ci est fixe.

Comme pour AO Madagascar, lors du premier jour de séchage, les fèves sont exposées 3 ou 4 h sur une aire cimentée puis mises à l'abri ou dans un endroit ombragé. Le séchage se fait au soleil pendant 9 h ou en ombrage dans un hangar bien aéré.

4. 3. 4. La qualité du cacao marchand du Sambirano

Globalement, le cacao malgache est classé en 3 catégories, le cacao de qualité supérieure, le cacao de qualité standard et le cacao de mauvaise qualité (Tableau III). Cette classification est interne aux producteurs de fèves à Madagascar.

Le cacao de qualité supérieure est essentiellement produit par les sociétés exportatrices disposant de fermes et de matériels de transformation. Quelques coopératives contractuelles contribuent également dans la production de cacao de qualité, mais dans une moindre mesure.

Tableau III. *Critères de classification des cacaos*

Classe de cacao	Caractéristiques du produit
Cacao supérieur	- Cacao sec, d'humidité inférieure ou égale à 7 % - Fèves violettes : inférieur ou égal à 7 % - Fèves ardoisées : inférieur ou égal à 3 % - Fèves défectueuses (fèves plates, brisure, fèves germées) : inférieur à 3 % - Fèves attaquées par des insectes : inférieur ou égal à 3 % - Fèves moisies : inférieur ou égal à 3 % - Grainages : de 90 à 100 fèves par 100 grammes
Cacao lavé supérieur	Même préparation et qualité que le supérieur mais les fèves sont lavées dans un bassin avant le séchage
Cacao standard	- Cacao bien sec, d'humidité inférieure ou égale à 8 % - Fèves violettes : plus de 7 % - Fèves ardoisées : inférieur ou égal à 3 % - Fèves défectueuses (fèves plates, brisure, fèves germées, fèves attaquées par des insectes) : inférieur ou égal à 3 % - Fèves moisies : inférieur ou égal à 3 % - Grainages : inférieur ou égal à 100 fèves par 100 grammes

Spécifiquement dans la zone du Sambirano, le cacao marchand est classé sous deux catégories commerciales : le cacao de qualité moindre, appelé « standard », qui veut dire une fermentation de courte durée, pas de tri, un séchage insuffisant et le cacao de qualité supérieure, appelé « supérieur ». Dans ce cas, les cabosses sont récoltées à maturité, les fèves sont séparées du rachis et celles qui sont pourries sont triées et 5 à 6 jours de fermentation avec des brassages réguliers. La plupart des lieux de transformation génère un cacao standard. Les transformateurs privilégient bien souvent la production de cacao standard par nécessité. En effet, le cacao standard nécessite un temps de préparation plus court que le cacao supérieur et donc une rentrée d'argent plus rapide (Bousquet, 2013; Rahaingosambatra, 2014).

Chez AO Madagascar, les fèves sèches sont triées manuellement. Les fèves plates, cassées et pourries sont isolées et jetées. Une fois les fèves triées, elles sont mises en sacs de jute de 70 kg. On parle alors de cacao marchand. Les sacs sont placés dans un entrepôt aéré.

La reconnaissance des qualités du cacao de Madagascar est indiscutable pour les professionnels de la chocolaterie. Cependant, comme pour la majeure partie des cacaos fins, des questionnements scientifiques posés dans l'introduction générale restent en suspens.

CHAPITRE II :
Partie expérimentale

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé lors de cette étude est constitué d'échantillons de fèves de cacao provenant de Madagascar.

Les fèves de cacao utilisées ont été collectées à Madagascar à Ambanja dans la zone du Sambirano (région nord-ouest de Madagascar) au cours de deux récoltes (janvier/février et octobre/novembre 2015). Le prélèvement des échantillons a été réalisé auprès d'un industriel producteur de fèves marchandes de cacao et de chocolat (AKESSON'S). Ces échantillons de cacao ont été prélevés pour être les plus représentatifs de la diversité : diversité génétique de la zone (Criollo, Trinitario à casse Claire, Trinitario à casse Foncée) et cinétiques des temps de fermentation.

Lors des deux récoltes réalisées à Madagascar, les cabosses récoltées ont été écabossées puis les fèves récupérées ont été fermentées dans des bacs en bois en cascade (Figure 8).

Figure 8. Fermentation des fèves dans des bacs en cascade

Suivant la variété, des brassages ont été effectués : 2 pour la variété Criollo (48 et 72 h) et 3 pour la variété Trinitario (48, 96 et 120 h). Le prélèvement pour les échantillons est de 5 kg de fèves fraîches de cacao (pour obtenir environ 1,5 kg de fèves sèches) pris en une fois au centre du contenant. Ils sont prélevés en début, en fin de fermentation et à tous les brassages pour la première récolte (0, 48, 72 et 96 heures de fermentation pour la variété Criollo et 0, 48, 96, 120 et 144 heures de fermentation pour la variété Trinitario). Les prélèvements effectués lors de la récolte de janvier 2015 sont en rouge et ceux de la récolte d'octobre 2015 en bleu (Tableau IV). Pour chaque variété et temps de fermentation, 3 batch ont été réalisés soit 9 lots d'échantillons par récolte. Au total 99 échantillons ont été prélevés.

Tableau IV. *Résumé des échantillons prélevés à Madagascar*

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Criollo	X X	X	X X	X X	X X		
Trinitario à casse Claire	X X	X	X X	X	X X	X X	X X
Trinitario à casse Foncée	X X	X	X X	X	X X	X X	X X

Le prélèvement est toujours effectué au centre du bac, pour éviter les variations dues à la localisation des fèves. Concernant les fèves fraîches utilisées pour la mise au point d'un milieu cacaoté, elles sont de la variété Trinitario, prélevées en décembre 2015 et conservées à - 20 °C. Les fermentations ont été effectuées à l'usine avec une température variant entre 24 et 35 °C. Après chaque prélèvement, le cacao est séché au soleil jusqu'à atteindre une hygrométrie inférieure à 8 % (Figure 9). Le temps de séchage est variable suivant les échantillons allant de 3 à 17 jours. Le séchage des fèves en sortie de bac de fermentation se fait sur une aire cimentée pendant 5 h puis étalement sous un abri jusqu'au lendemain matin. Les jours suivant les fèves sont étalées au soleil de 7 à 16 h. Les fèves sont brassées régulièrement (toutes les 45 minutes) au cours du séchage. A la fin de chaque jour de séchage, les fèves de chaque échantillon sont emballées séparément dans des sachets en polyéthylène pour la nuit.

Figure 9. Séchage des fèves sur aire cimentée

A Madagascar, des prélèvements de fèves avec mucilage ont été réalisés d'une part pour les isolements des souches présentes sur les fèves sur des boîtes de Pétri et d'autres part pour étudier la microflore totale par PCR-DGGE. Dans ce dernier cas, les échantillons sont mis au congélateur dans des tubes Falcon contenant de l'eau peptonnée stérile et du glycérol (≥ 99,0 %, Sigma Aldrich).

Les échantillons de Madagascar ont été transportés par bateau puis par avion dans des glacières refroidies avec des pains de glace jusqu'à La Réunion puis stockés dans un local à

l'abri de la lumière et de l'humidité pour les fèves sèches, en chambre froide pour les boîtes de Pétri (6 °C) et au congélateur pour les tubes Falcon (- 80 °C).

2. Evaluation de la qualité des fèves

2. 1. Analyses morphologiques des fèves

2. 1. 1. Le grainage

300 fèves de chaque échantillon sont pesées à l'aide d'une balance électronique (± 0,01 g, Ohaus). Le poids total des fèves est ensuite calculé et le nombre de fèves pour 100 g est exprimé selon la formule suivante :

$$Nombre\ de\ fèves\ pour\ 100\ g\ = \frac{3 \text{ X } 100 \text{ X } 100}{\text{Poids de 300 fèves entières (g)}}$$

Avec :

100 = nombre de fèves

100 = poids (g)

2. 1. 2. Le cut test

Une coupe longitudinale des fèves est effectuée à l'aide d'une guillotine (Magra 12, Teserba) de capacité de 50 fèves de cacao prises aléatoirement dans le lot échantillonné. Six coupes de 50 fèves sont réalisées afin d'obtenir 300 fèves coupées au total. A chaque coupe, les fèves sont comptabilisées selon les catégories suivantes : moisies, ardoisées, mitées, germées, plates, violettes, claires et brunes.

2. 2. L'analyse sensorielle des liqueurs de cacao

2. 2. 1. Protocole de fabrication des liqueurs de cacao

La préparation de l'étuve ventilée (WiseVen®) pour la torréfaction se déroule de la manière suivante. Il faut régler la température à 125 °C et préchauffer les grilles dans l'étuve. Une fois la température voulue atteinte, la grille du haut est retirée et posée sur la paillasse (plaque de marbre). La moitié des fèves entières est étalée en monocouche sur la grille puis celle-ci est remise dans l'étuve. Ensuite, la grille du milieu est retirée et le même procédé est réalisé avec la moitié restante. Il faut compter environ 5 min pour atteindre de nouveau 125 °C. Les fèves sont laissées 25 min dans l'étuve. Les grilles contenant les fèves sont ensuite retirées de l'étuve et posées sur la paillasse le temps que les fèves refroidissent.

Un broyage grossier des fèves est effectué grâce à un concasseur (Capco) par 2 passages successifs.

Une séparation entre la coque et le cotylédon est réalisée. Les fèves broyées sont versées petit à petit dans un catador (Capco) lors de 2 passages successifs. Les coques restantes sont éliminées manuellement.

L'étape suivante est la fabrication de la liqueur de cacao. Le pétrin (Capco) est mis en route et il faut attendre qu'il chauffe (45 °C). Les cotylédons de cacao sont versés au fur et à mesure pour éviter tout débordement. Il faut compter au total 1 h pour obtenir une liqueur.

La dernière étape est le raffinage. La liqueur de cacao est récupérée dans le pétrin à l'aide d'une spatule et mise au fur et à mesure dans un raffineur (Exakt). Les paramètres de celui-ci sont : espacement à 4 en entrée (rouleau arrière), à 2 en sortie (rouleau avant) et à vitesse 6 afin d'obtenir un raffinage à 18 µm.

Le produit est récupéré avec une spatule et étalé dans un moule en plastique pour obtenir des tablettes. Ensuite, le moule est mis au réfrigérateur jusqu'à ce que les tablettes deviennent dures avant démoulage. Les tablettes sont conservées au réfrigérateur à 16 °C dans du papier aluminium.

2. 2. 2. Constitution et sélection du panel

Un jury de 10 personnes a été constitué au départ. Il comprend 5 hommes et 5 femmes. La moyenne d'âge est de 50 ans. Dans un premier temps, les dégustateurs sont formés à

l'identification des saveurs élémentaires avec différentes solutions aqueuses : sucrée, amère, salée, acide et astringente. Les solutions sont dégustées à différents seuils de concentration pour évaluer la sensibilité des dégustateurs à ces attributs. Dans un second temps, les dégustateurs sont confrontés à différentes liqueurs caractérisées par différents descripteurs.

2. 2. 3. Préparation des séances de dégustation

Pour la campagne de Madagascar de janvier 2015, un plan d'expérience issu du logiciel XL Stat (Addinsoft, Paris, France) module Sensory spécifique aux traitements de données sensorielles a été réalisé pour 10 juges, 33 liqueurs de cacao et 3 répétitions pour chaque liqueur. Le logiciel génère un code à 3 lettres pour chaque liqueur et un ordre bien précis de dégustation des liqueurs par série de 4 et pour 3 répétitions de chaque liqueur. 6 séances de dégustation ont eu lieu afin de faire déguster les 33 liqueurs de cacao en 3 répétitions (16 échantillons à déguster par séance et 17 pour les trois dernières séances).

Pour la campagne de Madagascar d'octobre 2015, 9 séances de dégustation ont eu lieu afin de faire déguster les 57 liqueurs de cacao en 3 répétitions (16 échantillons à déguster par séance).

4 à 5 carrés de liqueur sont mis dans des vials en verre (Pyrex, France) avec une étiquette du code de la liqueur sur le bouchon.

2. 2. 4. Séances de dégustation

Quelques recommandations sont à respecter avant la séance de dégustation :

- Les dégustateurs ne doivent pas fumer, boire d'alcool ou de café, manger des aliments susceptibles d'altérer le sens du goût ni effectuer d'exercices soutenus et prolongés pendant les 60 min précédant une séance de dégustation.
- L'utilisation de parfum doit être évité par les dégustateurs et par toute personne participant à l'aménagement de la salle de dégustation ou à la manipulation des échantillons. Il convient de se laver les mains avec un savon non parfumé avant la dégustation.
- Toute personne malade ne doit participer à la séance de dégustation et la reporter.
- Les dégustateurs ne doivent pas parler entre eux avant que tout le monde n'ait terminé sa dégustation.

Les vials sont mis dans des bains chauffants à une température de 48 °C (température optimale pour ressentir les différents arômes) 45 minutes avant la dégustation. Les juges sont disposés dans des box munis de cloison entre chaque juge. Chaque box est équipé d'une lumière artificielle, d'un lavabo, d'une feuille de vocabulaire avec différents descripteurs, d'une tablette numérique pour remplir les feuilles d'analyse sensorielle où sont notés les produits à déguster. Il faut prendre un peu de liqueur de cacao sur une petite touillette en plastique, la sentir ou mettre dans la bouche. Dans ce dernier cas, les différents attributs formant le profil aromatique apparaissent en trois étapes : notes aromatiques initiales, notes aromatiques intermédiaires et notes aromatiques finales ou résiduelles. Les dégustateurs doivent observer que certains arômes apparaissent ou disparaissent très rapidement ou sont facilement masqués, tandis que d'autres peuvent persister plus longtemps, avec différents arrière-goûts. Les juges doivent compléter la feuille en donnant une note allant de 0 à 10 (nombre entier et unique ; le score le plus élevé indiquant l'intensité aromatique la plus forte) pour chaque descripteur et chaque échantillon. De l'eau et des biscottes sont à la disposition des juges pour un retour à un palais neutre entre les différents produits. La salle est climatisée.

2. 2. 5. Analyse des résultats

Les tests statistiques et les analyses de données mis en œuvre pour le traitement des résultats sont réalisés par le logiciel XL Stat (Addinsoft, Paris, France).

3. Analyse chimique

3. 1. La composition chimique par la SPIR

50 g de fèves de cacao non torréfiées, fermentées ou non fermentées des 99 échantillons sont décortiquées à l'aide d'un scalpel. Elles sont ensuite plongées dans de l'azote liquide afin de les refroidir et durcir pour faciliter le broyage. Après évaporation totale de l'azote liquide, les fèves sont broyées à l'aide d'un moulin (Ika+Moulinex). Les poudres sont conservées à - 80 °C dans des sachets en aluminium.

Lorsque tous les échantillons sont sous forme de poudre, l'analyse au SPIR est réalisée. L'appareil de mesure utilisé est un spectrophotomètre avec mono chromoteur à réseau holographique (Foss modèle 6500, Nanterre). Environ 3 g de poudre sont déposés dans des mini coupelles équipées d'une fenêtre en quartz. Les poudres ainsi préparées sont mesurées en réflectance diffuse pour les longueurs d'onde comprises entre 400 nm et 2500 nm, avec un pas de 2 nm. Le spectre d'absorption est exprimé sous la forme de Log (1/R) ou R est la réflectance à chaque longueur d'onde. Cela a permis d'obtenir la teneur en caféine et en théobromine.

3. 2. Les composés volatils par SPME

3. 2. 1. Extraction

Les composés volatils de la poudre de cacao ont été extraits par la méthode SPME avec une fibre grise en silice recouverte de divinylbenzène/carboxène/polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), d'épaisseur 50/30 µm de la marque Supelco. Les fibres ont été conditionnées comme le préconise le fournisseur (270 °C pendant 1 h).

Afin de s'assurer du bon état de fonctionnement de la fibre au cours de la campagne d'analyses, des solutions témoins de butan-1-ol ont été préparées. Dans des vials de 10 mL, sertis par un bouchon septum en Teflon butyl, 0,9 mL d'eau ultrapure (Milli-Q®) et 100 µL d'une solution de butan-1-ol à 200 $mg.L^{-1}$ ont été mélangées. Les mélanges (solution de butan-1-ol diluée) sont conservés à - 80 °C et à intervalles réguliers, la solution de butan-1-ol diluée est soumise à l'extraction par fibre SPME et la réponse chromatographique observée.

Pour l'extraction des molécules, la procédure est la suivante :

- Prélèvement de 2 g de poudre de cacao (torréfié ou non) placée dans un vial hermétique de 10 mL,
- Ajout de 100 µL d'étalon interne (solution de butan-1-ol dilué dans du méthanol à 200 $mg.L^{-1}$),
- Ajout de 1 mL d'eau ultrapure,
- Sertissage du vial par un bouchon septum en Teflon butyl,
- Le vial est placé dans un four chromatographique à 50 °C pendant 10 min,
- La fibre SPME est introduite dans l'espace de tête du vial toujours positionné dans une enceinte chauffée à 50 °C pendant 45 min. La fibre est alors poussée hors de l'aiguille

directement dans l'espace de tête. Au bout de ces 45 min, la fibre est rétractée dans l'aiguille, retirée du dispositif puis désorbée dans l'injecteur du chromatographe.

3. 2. 2. Séparation et identification des composés

Les composants piégés sur la fibre sont désorbés (1 min) dans l'injecteur en mode splitless (250 °C) d'un chromatographe à phase gazeuse (6890 GC, Agilent Technologies) couplé à un spectromètre de masse (5973 MS, Agilent Technologies). Deux colonnes de polarité différente sont utilisées pour la séparation des composés volatils.

Les composés volatils sont séparés par une colonne capillaire en silice fondue à phase stationnaire greffée polaire de type DB-WAX (Supelco), de longueur 30 m, de diamètre interne 0,25 mm, d'épaisseur de film 0,25 µm. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 mL/min. Le four du CG est en isotherme durant les 5 premières minutes à 40 °C et le pas de programmation est de 2 °C/min, jusqu'à atteindre 150 °C et enfin une augmentation de 10 °C/min pour atteindre 240 °C. Les composants sont fragmentés par impact électronique (70 eV) et le spectre de masse de ces molécules est enregistré.

La colonne apolaire est de type SPB-5 (Supelco) de longueur 60 m, de diamètre interne 320 µm, d'épaisseur de film 0,25 µm. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium à un débit de 1 mL/min. La température de l'injecteur est de 250 °C. Le four du GC est en isotherme durant les 4 premières minutes à 40 °C puis le pas de programmation est de 2 °C/min, jusqu'à atteindre 150 °C et enfin une augmentation de 10 °C /min pour atteindre 240 °C.

Les indices de rétention relatifs de chacun des composés ont été calculés à partir d'une table de n-alcanes de C_8 à C_{20} pour la colonne polaire et C_6 à C_{28} pour la colonne apolaire.
L'identification des composés a ensuite été réalisée par comparaison :
- des spectres de masse avec ceux de deux bases de données commerciales (NISTO2.L et wiley7n.l)
- de la valeur de leurs indices de rétention calculés, à ceux de la littérature.

4. Flore microbienne vivante

4. 1. Isolement des flores revivifiables

4. 1. 1. Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé est la gélose de Sabouraud avec Chloramphénicol (Biorad). La préparation consiste à mélanger 65 g de poudre de milieu avec 1 L d'eau distillée. Ce milieu a été coulé et mis dans des boîtes de Pétri stérilement pour être utilisées à Madagascar sur le terrain. Les boîtes ont été utilisées pour isoler et propager les souches de levure isolées sur les fèves de cacao de Madagascar. Trois fèves de cacao sont prélevées stérilement dans le bac de fermentation et mises dans un sac stérile (Stomacher) qui est refermé avec un clip. A proximité de la flamme d'un bec Bunsen, 9 mL d'eau physiologique stérile (NaCl 0,6 % w/v) sont ajoutés dans le sac stérile. L'ensemble est malaxé manuellement pendant 5 min. 0,1 mL de la solution est prélevé et déposé sur la boîte de Pétri contenant le milieu de culture Sabouraud avec Chloramphénicol. Un râteau stérile permet d'étaler de façon homogène la solution dans la boîte jusqu'au séchage et un film plastique (Parafilm) est mis sur le côté de la boîte pour empêcher les contaminations externes. Les boîtes sont ensuite incubées sur une table en bois à température ambiante (approximativement entre 20 et 30 °C). Après 48 h d'incubation, les boîtes de Pétri sont conservées au réfrigérateur jusqu'au transport à La Réunion. Au laboratoire à La Réunion, deux repiquages successifs sont effectués sur de la gélose de Sabouraud avec Chloramphénicol (Biorad) afin d'avoir des souches pures avant archivage et congélation à - 80 °C.

4. 1. 2. Conservation des souches

Les colonies d'une culture fraîche de chaque isolat ont été ensemencées aseptiquement dans des cryotubes. L'ensemble des clones purifiés est conservé à - 80 °C dans de l'eau distillée additionnée de 10 % (v/v) de glycérol (Sigma Aldrich), de 4 % (p/v) de glucose et de 0,5 % (p/v) d'extrait de levure (Sigma Aldrich).

4. 2. Identification des souches

4. 2. 1. Extraction de l'ADN fongique

200 µL d'eau milliQ stérile sont déposés dans un tube Eppendorf de 2 mL. Une colonie est remise en suspension à l'aide d'une oëse. Le tube est centrifugé 10 min à 13 000 rpm puis le surnageant est éliminé. 100 µL d'eau milliQ sont ajoutés puis le tube est agité au vortex pour remettre les cellules en suspension. Le tube est ensuite traité aux micro-ondes à 1000 W pendant 1 min puis directement replacé dans la glace pendant 10 min. Enfin, le tube est centrifugé 10 min à 13 000 rpm et le surnageant contenant l'ADN est récupéré pour les étapes suivantes.

4. 2. 2. Amplification d'ADN par ITS1 et ITS4

La région ITS est amplifiée par le couple d'amorces ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGC, Thermoscientific) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC, Thermoscientific).

Les réactions d'amplification par PCR sont réalisées pour un volume total de 50 µL contenant 0,5 µL d'ITS1 (100 µM), 0,5 µL d'ITS4 (100 µM), 1 µL de dNTPs (10 mM, Fermentas), 2 µL de $MgCl_2$ (25 mM, Fermentas), 5 µL de Taq buffer (10 X, Fermentas), 0,5 µL Taq polymerase (1 U/µL, Fermentas), 30,5 µL d'eau « nuclease free » (Fermentas) et 10 µL d'ADN extrait.

L'amplification a été réalisée comme suit (Tableau V) : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min, puis 35 cycles incluant une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, puis une hybridation à 60 °C pendant 40 s et une élongation à 72 °C pendant 1 min 30 s. L'élongation finale a été réalisée à 72 °C pendant 7 min.

Tableau V. *Conditions des réactions de la PCR pour les ADN fongiques avant la RFLP*

Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	Stop
1 cycle	35 cycles			1 cycle	-
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	16 °C
4 minutes	1 minute	40 secondes	1 minute 30 secondes	7 minutes	-

4. 3. Caractérisation des flores par RFLP

4. 3. 1. RFLP et électrophorèse

Une digestion enzymatique est réalisée sur les produits de PCR ITS afin de définir les profils pour chaque souche. Le mélange réactionnel est constitué de : 2 µL de tampon buffer R, 7 µL d'eau « nuclease free » (Fermentas), 1 µL d'enzyme *Hae*III (10 U/µL, Thermoscientific) ou *Hinf*I (10 U/µL, Thermoscientific). Dans un tube Eppendorf, 10 µL du produit de PCR ITS1-ITS4 est mis en présence de 10 µL de mélange réactionnel. Le tube est alors incubé 4 h dans un bain-marie à 37 °C.

10 µL de produit de digestion enzymatique de PCR sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose. Un marqueur de taille moléculaire de 100 pb (0,1 µg/µL, Thermoscientific) est soumis à une tension de 50 volts pendant 40 min pour une migration par électrophorèse.

4. 3. 2. Choix des profils

Seuls certains profils sont sélectionnés pour la suite des analyses car le séquençage à un coût financier et il n'est pas possible de séquencer tous les profils. Pour cela, les tailles des fragments obtenus lors de la digestion enzymatique par *Hae*III et *Hinf*I sont comparées entre elles et les profils de restriction différents sont sélectionnés. La taille de chaque fragment d'ADN est calculée avec la distance mesurée du puits jusqu'à la bande d'ADN de chaque échantillon en

cm. La distance du puits jusqu'aux bandes du marqueur moléculaire est mesurée en cm pour réaliser un graphique de la distance (en cm) en fonction du logarithme de la taille du marqueur moléculaire en paire de base (=log(pb)) afin d'obtenir l'équation de la courbe de tendance linéaire du type log(pb) = a × distance + b. Cette équation permet de passer d'une distance en centimètre des échantillons au log de la distance. Enfin, en passant par la puissance de 10 (l'inverse du logarithme), le log de la distance permet de passer à la taille des fragments en paire de base. Les profils sont comparés sur les différents gels et seuls les profils différents sont retenus.

4. 3. 3. Amplification d'ADN par NL1 et NL4 des souches choisies

Une amplification par PCR est réalisée avec le couple d'amorces NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG, Thermoscientific) et NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG, Thermoscientific).

Les réactions d'amplification par PCR sont réalisées pour un volume total de 50 µL contenant 0,5 µL de NL1 (100 µM), 0,5 µL de NL4 (100 µM), 1 µL de dNTPs (10 mM, Fermentas), 2 µL de $MgCl_2$ (25 mM, Fermentas), 5 µL de Taq buffer (10 X, Fermentas), 0,5 µL Taq polymerase (1 U/µL, Fermentas), 30,5 µL d'eau « nuclease free » (Fermentas) et 10 µL d'ADN extrait.

L'amplification a été réalisée comme suit (Tableau VI) : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min, puis 35 cycles incluant une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, puis une hybridation à 60 °C pendant 40 s et une élongation à 72 °C pendant 1 min 30 s. L'élongation finale a été réalisée à 72 °C pendant 7 min.

Tableau VI. *Conditions des réactions de la PCR pour les ADN fongiques avant le séquençage*

Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	Stop
1 cycle	35 cycles			1 cycle	-
95 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	16 °C
5 minutes	1 minute	40 secondes	1 minute 30 secondes	7 minutes	-

Une migration sur gel d'agarose (2,2 %) est réalisée afin de vérifier la présence des fragments d'ADN de 600 pb avant l'envoi des échantillons au laboratoire réalisant le séquençage.

4. 3. 4. Identification des séquences

Le séquençage est effectué par Eurofins (Allemagne). Les chromatogrammes issus du séquençage sont comparés à la base de données en ligne de BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Les isolats des souches identifiées par BLASTN permettent l'identification de certains isolats dont la taille des séquences sont identiques lors de la digestion par les enzymes de restriction c'est-à-dire les profils similaires avec les fragments de même taille.

4. 4. Analyse des composés volatils produits par des souches de levures par SPME

4. 4. 1. Milieux de culture

La mise en place d'un milieu de culture élaboré à partir de cacao de Madagascar qui soit optimal pour la culture de levures et la production de composés volatils par celles-ci est étudiée.

Les échantillons de fèves fraîches sont lyophilisés (Laconco, Freezone 2.5) pendant 48 h puis broyés à l'aide d'un blender (Retsch GM 200) pour obtenir une poudre fine.

La poudre de cacao a été extraite à l'aide de 3 solvants : de l'éthanol absolu, une solution aqueuse à pH 6 (préparée à l'aide de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4 1M), et un mélange de 50 % d'éthanol absolu et 50 % de solution aqueuse à pH 6. Pour chaque solvant, l'extraction a été réalisée à 30 °C et à 4 °C en triplicata. Pour ce faire, 0,400 g de poudre de fève de cacao ont été introduits dans 10 mL de solvant et mis sous agitation pendant 2 h. Pour les extractions à 30 °C, les solutions ont été placées dans une étuve (Infors HT, Multitron Standard) à 30 °C sous agitation orbitale alors que pour les extractions à 4 °C, elles ont été placées sous agitation magnétique (Herdoplh instrument, MR1000) à l'intérieure d'une chambre froide. Les extraits ont ensuite été centrifugés (Heraeus™ Primo™/Primo R Centrifuge) à 2000 rpm pendant 20 minutes et le surnageant (l'extrait) a été récupéré puis filtré sur papier Whatman n°1. Le filtrat

a ensuite été stérilisé par filtration sur filtre Sartorius stérile (0,2 µm) et le résidu solide étalé dans des boîtes de Pétri vides puis exposé à des rayons UV pendant 40 min. La poudre stérile a ensuite été réintroduite dans le filtrat dans des conditions opératoires stériles. Ces extraits sont intitulés selon le type de solvant utilisé pour l'extraction : Eeth-30 (extrait éthanolique à 30 °C) et Eaq6-4 (extrait aqueux à pH 6 et 4 °C).

En plus d'un milieu de Sabouraud simple (Sab, Merck), un milieu de Sabouraud ajouté de 5 % d'EtOH absolu (SabEtOH5), un milieu de Sabouraud ajouté de 5 % d'Eeth-30 (SabKKOEtOH5), un milieu Sabouraud ajouté de 1 % d'Eeth-30 (SabKKOEtOH1) et un milieu de Sabouraud ajouté de 20 % d'Eaq6-4 (SabKKOAq20) ont été préparés. Ces milieux ont été réalisés en introduisant les extraits stériles directement dans du milieu de Sabouraud en surfusion. L'ensemble des milieux a ensuite été dispersé par volume de 5 mL dans des tubes en verre stériles de façon à obtenir des géloses inclinées.

4. 4. 2. Extraction

Pour chaque souche, une œse (10 µL) de souches de levure a été prélevée puis ensemencée en surface sur les 5 milieux de culture (Sab, SabEtOH5, SabKKOEtOH5, SabKKOEtOH1 et SabKKOAq20). Les tubes ont ensuite été incubés pendant 24 h à 28 °C et scellés avant ré-incubation pendant 24 h à 28 °C.

Au bout des dernières 24 h d'incubation, 5 µL d'octan-1-ol (1 g/L dans du dichlorométhane) ont été ajoutés aux tubes scellés comme étalon interne puis les espaces de tête résultantes des cultures inclinées ont été soumises à une micro-extraction en phase solide (SPME) à l'aide d'une fibre de 2 cm recouverte de 50/30 µm de divinylbenzène/carboxène/polydiméthylsiloxane fixée à une base de silice fondue (Supelco). Les fibres ont alors été exposées à l'espace de tête pendant 15 min à 30 °C avant insertion pendant 15 min dans le port d'injection d'un chromatographe gazeux couplé à un spectromètre de masse à 270 ° C (CG/SM, Agilent technologies 6890N Network GC system) afin de réaliser une désorption thermique des métabolites sur la fibre SPME.

4. 4. 3. Séparation et identification des composés

Les métabolites ont ensuite été séparés à l'aide d'un chromatographe gazeux (Agilent technologies 6890N ; Network GC System) couplé à un spectromètre de masse (Agilent technologies 5973 Network, Mass Selective detector) fonctionnant en impact électronique (70 eV). La colonne utilisée est de type SPB5 (Supelco, 60 m de longueur X 0,32 mm de diamètre interne X 0,25 µm d'épaisseur de film) avec un débit de gaz vecteur (He) fixé à 0,8 mL/min. La programmation de température du four est la suivante : 2 min à 45 °C puis un pas de programmation de 4 °C/min jusqu'à 230 °C suivi enfin d'un isotherme à 230 °C pendant 20 min. L'identification des composés a été basée sur la comparaison de leurs spectres de masse avec ceux disponibles dans les banques de données commerciales (de NIST et de Wiley).

4. 5. Analyse des composés volatils produits par des souches de levures par extraction liquide-liquide

Les manipulations réalisées dans cette section ont été faites en triplicata uniquement sur 2 souches de levures : *Hanseniaspora opuntiae* et *Torulaspora delbrueckii*.

4. 5. 1. Milieux de culture

30 mL de 2 milieux de culture bouillon ont été préparés : un milieu de Sabouraud bouillon simple (Merck) et un milieu de Sabouraud bouillon ajouté de 1 % d'Eeth-30 (SabKKOEtOH1). Chaque souche a été ensemencée dans les 2 milieux puis mise à incuber sous agitation (2000 rpm) à 27 °C pendant 96 h. A titre de contrôle, des milieux Sab et SabKKOEtOH1 non ensemencées ont également été mis à incuber.

4. 5. 2. Extraction

Après incubation, les tubes ont été laissés au repos à température ambiante pendant 2 h afin de pouvoir séparer la poudre de cacao du milieu liquide (S1) pour les milieux concernés (SabKKOEtOH1). Pour rincer la poudre, 10 mL d'eau distillée y ont été rajoutés. Après une période de séparation à température ambiante (5 min) le surnageant S2 a été rajouté à S1. Le mélange S1+S2 a ensuite été centrifugé (Heraeus™ Primo™/Primo R Centrifuge) (500 rpm,

20 min) afin de séparer les souches de levures (culot) du milieu liquide (S3). S3 a ensuite été extrait 3 fois avec 4 mL de dichlorométhane (DCM) (SDS, P02910A21) suivi d'une centrifugation (20 min, 2000 rpm) afin de récupérer l'extrait surnageant total (EST). Le culot a quant à lui été séché pendant 24 h à 105 °C avant d'être pesé. Le culot sec a été soumis à un traitement ultrason (Digital Ultrasonic Cleaner CD-4820) pendant 360 s avant d'être extrait 3 fois avec 4 mL de dichlorométhane (DCM) (SDS, P02910A21) suivi d'une centrifugation (20 min, 2000 rpm) afin de récupérer l'extrait culot total (ECT).
La quantité suffisante de DCM pour obtenir un volume total de 20 mL a ensuite été rajoutée aux EST et ECT. Les solutions obtenues ont ensuite été stockées à 4 °C jusqu'à l'analyse en CG-SM.

4. 5. 3. Séparation et identification des composés

5 mL des solutions d'extrait surnageant total (EST) et d'extrait culot total (ECT) ont été concentrés 10 fois sous flux d'azote et 50 µL d'octan-1-ol (10 g/L dans du dichlorométhane) y ont été rajoutés. 0,1 µL des extraits concentrés obtenus a ensuite été directement injecté en CG-SM et les composés ont été identifiés selon les mêmes conditions opératoires présentées en section 4. 4. 3.

5. Flore microbienne totale

La technique de biologie moléculaire utilisée est la PCR-DGGE.

5. 1. Extraction de l'ADN fongique

Une extraction des ADN totaux à partir des fèves de cacao est réalisée. Pour récupérer les micro-organismes présents sur les fèves, 5 fèves (fèves +/- pulpe) sont prélevées dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 5 mL d'eau peptonnée stérile. 5 mL de glycérol (Sigma Aldrich) sont ajoutés. Les tubes sont agités manuellement pour homogénéiser puis congelés jusqu'à son transport à La Réunion.

Après les avoir sortis du congélateur à La Réunion, les échantillons des tubes Falcon sont homogénéisés par agitation manuelle. 1,8 mL de solution est déposé dans un tube Eppendorf de 2 mL par échantillon pour réaliser la lyse cellulaire. L'extraction de l'ADN des souches microbiennes a été faite à l'aide du kit FAST DNA®SPIN KIT utilisant le système FastPrep®. Les tubes sont centrifugés à 12 000 RCF pendant 5 minutes puis le surnageant est éliminé. Une solution appropriée d'1 mL de CLS – Y (Cell Lysis Solution) (Thermo Fisher Scientific) par échantillon est ajoutée pour réaliser la lyse cellulaire. Le mélange obtenu est transvasé dans un tube spécifique SPIN KIT contenant une bille en céramique et des billes fines. Le mélange est homogénéisé dans l'appareil FastPrep® pendant 40 secondes à une vitesse de 6 m/s. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 10 minutes pour séparer le culot du surnageant. Le surnageant (environ 800 µL) est transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL et un volume équivalent (800 µL) de matrice de liaison (binding matrix) est ajouté. Les tubes sont retournés à plusieurs reprises afin de mélanger le contenu des tubes. Les tubes sont incubés sur le rotateur à température ambiante durant 5 minutes avec une agitation douce. La moitié (800 µL) de la suspension est transférée dans une colonne à filtre (SPINTM Filter) et centrifugée à 14 000 g durant 1 minute. Le filtrat est jeté et la deuxième partie de la solution est rajoutée dans la colonne. Après une autre étape de centrifugation comme précédemment, le surnageant a été écarté. S'il y a encore du liquide dans le filtre, les tubes sont de nouveau centrifugés à 14 000 RCF pendant 1 min. Comme pour certains échantillons il y a encore du liquide dans le filtre, la solution est resuspendue dans le filtre puis transvasée dans une nouvelle colonne à filtre. Après une autre étape de centrifugation comme précédemment, le surnageant a été écarté. 500 µL de solution de lavage SEWS – M sont ajoutés puis le culot est resuspendu doucement en utilisant la pointe de la pipette automatique. Les tubes sont centrifugés à 14 000 g durant 1 minute puis le contenu des tubes de récupération est vidé et replacé. Sans ajouter de liquide, les tubes sont centrifugés une seconde fois à 14 000 g durant 2 minutes pour être sûr que tout l'éthanol de la solution de lavage SEWS – M a bien été éliminé. Les tubes de récupération sont remplacés par des nouveaux tubes Eppendorf propres. L'ADN est élué en remettant en suspension dans la colonne filtrée la matrice de liaison (binding matrix) à laquelle est liée l'ADN à l'aide de 100 µL de DES. Les tubes sont fermés et incubés pendant 5 min à 55 °C, sur un bloc chauffant. Les tubes sont centrifugés à 14 000 RCF pendant 1 min pour récupérer l'ADN élué dans les tubes propres. Les colonnes sont jetées. L'ADN extrait se trouve au fond du tube. Les tubes sont stockés à 4 °C jusqu'à analyse.

5. 2. Vérification de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait

La quantification et la pureté de l'ADN extrait ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible du type Nanodrop 8000. Cet appareil mesure l'absorbance (A) ou la densité optique (DO) en lumière ultraviolette de l'échantillon. La concentration en ADN a été déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un blanc. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un ratio entre l'absorbance à 260 nm et 280 nm. Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 donne une estimation du degré de pureté des acides nucléiques de l'extrait. Les ratios A260/A280 des préparations pures d'ADN ont des valeurs comprises entre 1,8 et 2. Le ratio A260/A230 correspond aux ratios acides nucléiques/inhibiteurs PCR et doit être compris entre 1,6 et 1,8.

5. 3. Amplification du gène de l'ARNr 26S des levures par PCR

C'est la région ITS (espace interne transcrit) d'environ 500 pb qui est amplifié. L'ITS est amplifié par le couple d'amorces ITS1/ITS4 (ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3' ; ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

5. 4. Mélanges réactionnels et conditions de la PCR

Les réactions d'amplification par PCR sont réalisées dans des micro-plaques pour un volume total de 50 µL par puits contenant 0,3 µL de chaque amorce (0,6 µM), 1 µL de deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) (10 mM), 4 µL de $MgCl_2$, 10 µL de Tampon 5X Green Go Taq, 0,25 µL de Go Taq G2 Flexi ADN polymerase (1,25 U/µL), 29,15 µL d'eau MilliQ et 5 µL d'ADN extrait.

L'amplification a été réalisée selon le protocole présenté dans le Tableau VII : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 min, puis 35 cycles incluant une dénaturation à 95 °C pendant 15 s,

puis une hybridation à 52 °C pendant 30 s et une élongation à 72 °C pendant 30 s. L'élongation finale a été réalisée à 72 °C pendant 5 min.

Tableau VII. *Conditions des réactions de la PCR pour les ADN fongiques avant DGGE*

Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	Stop
1 cycle	35 cycles			1 cycle	-
95 °C	95 °C	52 °C	72 °C	72 °C	16 °C
2 minutes	15 secondes	30 secondes	30 secondes	5 minutes	-

5. 5. Vérification de l'amplification

Les produits PCR obtenus ont été vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 2 % (p/v) dans un tampon TAE 1X. 5 µL de la solution d'ADN amplifié sont versés dans chaque puits. Les échantillons d'ADN des échantillons, des témoins positifs et négatifs et du marqueur de taille moléculaire (100 pb) ont été séparés par électrophorèse avec une tension de 120 volts pendant 1 h 30.

5. 6. Electrophorèse sur gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)

5. 6. 1. Composition et préparation du gel de DGGE

Les fragments d'ADNr ont été analysés par DGGE dans un gel à 8 % d'acrylamide/bisacrylamide contenant un gradient d'agents dénaturants qui s'étend de 40 à 70 %. Les solutions 1 et 2 sont préparées dans deux flacons distincts (Tableau VIII) puis 17 mL de chaque solution sont versés dans les compartiments 1 et 2. A chaque solution dénaturante, 50 µL d'ammonium persulfate (APS) et 50 µL de TEMED (Tétraméthyléthylènediamine) sont ajoutés. Le gel est coulé à l'aide d'une aiguille placée entre deux plaques de verre. Une pompe péristaltique permet le transfert des solutions dénaturantes jusqu'aux plaques de verre. Un peigne est posé sur le gel afin de former des puits. Le gel d'acrylamide est laissé au repos pour polymériser.

Tableau VIII. *Solutions dénaturantes à 70 % (solution 1) et à 40 % (solution 2)*

Réactifs	Quantité solution dénaturante à 70 %	Quantité solution dénaturante à 40 %
40 % Acrylamide/Bis	20 mL	20 mL
50 X TAE	2 mL	2 mL
Formamide	28 mL	16 mL
Urée	29,4 g	16,8 g
Eau distillée	Qsp 100 mL	Qsp 100 mL

5. 6. 2. Conditions de migration électrophorétiques de la DGGE

L'insert est placé dans la cuve d'électrophorèse puis celle-ci est réglée à la température de 60 °C. 30 µL d'échantillon sont déposés par puits au moyen d'une micropipette. L'électrophorèse a été réalisée en 3 périodes successives et dure 16 h, à 20 V pendant 10 min puis à 80 V pendant 16 h et enfin à 10 V pendant 1 min. Une fois la migration terminée, le gel est retiré délicatement des plaques de verre et immergé dans une solution de BET pendant 30 min. Ensuite, le gel est observé sur UV.

5. 6. 3. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE

Les bandes visibles d'intérêt sont extraites du gel placé sur la table à UV à l'aide d'un scalpel. Chacune des bandes est placée dans un tube Eppendorf. L'ADN de chaque bande est élué dans 100 µL du tampon TE (Tris EDTA) à 4 °C pendant une nuit, afin de dialyser l'ADN de la bande de polyacrylamide. 100 µL de la solution sont transvasés dans un nouveau tube Eppendorf en faisant attention à ne pas récupérer la bande de polyacrylamide. A cela est ajouté 10 µL d'acétate de sodium (3 M) puis 1 µL de glycogène puis l'ensemble est mélangé. 300 µL d'éthanol absolu sont ensuite rajoutés. Les tubes sont centrifugés à 4 °C durant 30 min à 14 000 g. Le surnageant est éliminé en faisant bien attention à ne pas décrocher le culot et 500 µL d'éthanol 70 % sont ajoutés au culot. Après, une centrifugation à 14 000 g du nouveau mélange est effectuée. Après élimination de l'éthanol, le culot retenu est séché sous la hotte. Ensuite, 20

µL de TE sont ajoutés dans chaque tube puis les tubes sont vortexés. Les tubes sont conservés à - 20 °C jusqu'à analyse.

Une amplification et un gel sont réalisés de nouveau pour vérifier la pureté de l'ADN. Le couple d'amorces utilisé est ITS1/ITS4. Les quantités du mix pour la PCR sont les mêmes que précédemment.
Par contre, les conditions des réactions de la PCR sont différentes (Tableau IX). L'amplification a été réalisée comme suit : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 min, puis 40 cycles incluant une dénaturation à 95 °C pendant 15 s, puis une hybridation à 55 °C pendant 30 s et une élongation à 72 °C pendant 45 s. L'élongation finale a été réalisée à 72 °C pendant 5 min.

Tableau IX. *Conditions des réactions de la PCR après DGGE*

Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	Stop
1 cycle	40 cycles			1 cycle	-
95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
2 minutes	15 secondes	30 secondes	45 secondes	5 minutes	-

Les produits PCR obtenus ont été vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 2 % (p/v) dans un tampon TAE 1X. 5 µL de la solution d'ADN amplifié sont versés dans chaque puits. Les témoins positifs et négatifs ainsi qu'un marqueur de taille moléculaire de 100 pb ont été tous soumis à une tension de 120 V pendant 1 h 30 en vue d'une migration en électrophorèse. Les bandes visibles de forte intensité sont envoyées pour séquençage chez GATC Biotech (Allemagne).

5. 7. Identification des séquences

Les séquences des ADNr 26S obtenues sont comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site du NCBI grâce au programme BLAST afin d'identifier les séquences de souches connues les plus proches. Les séquences présentant un pourcentage d'identité d'au moins 98 % sont retenues.

CHAPITRE III :
La qualité des cacaos marchands

Introduction

Les cacaos marchands sont les fèves de cacao fermentées et séchées prêtes à la vente. C'est à partir de la qualité de ces cacaos marchands que l'ICCO décide de classer les fèves en 2 catégories : le cacao fin ou le cacao courant. Selon l'ICCO, les cacaos sont classés prioritairement suivant les critères génétiques et sensoriels. Il nous a donc paru essentiel tout d'abord d'identifier les agents déterminants qui ont permis le classement du cacao malgache parmi les cacaos fins.

Dans cette partie, nous avons choisi d'étudier les échantillons malgaches en fin de fermentation issus des 2 campagnes de collecte (échantillons fermenté 96 h pour les Criollo et 144 h pour les Trinitario) soit 18 échantillons. Ces échantillons de cacao ont été prélevés pour être les plus représentatifs possibles de la diversité génétique de la zone (Criollo, Trinitario à casse Claire, Trinitario à casse Foncée). Pour chaque variété, trois prélèvements à partir de trois bacs en fin de fermentation ont été réalisés soit 9 lots d'échantillon par campagne de collecte.

1. Etude de l'origine génétique des cacaos de Madagascar selon différents critères

Les cacaos fins sont supposés être issus essentiellement des variétés Criollo et Trinitario. La variété de cacao peut être déterminée non seulement par l'analyse génétique de l'ADN chloroplastique mais aussi par la mise en œuvre de méthodes simples et rapides basées sur des critères physiques ou chimiques.

1. 1. La taille des fèves

La taille des fèves est un des premiers critères. Le grainage est utilisé pour déterminer la taille des fèves. Selon le rapport de la Fédération du Commerce du Cacao, suivant la variété du cacao, les fèves peuvent être génétiquement petites (Criollo) ou grosses (Trinitario) (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

Le poids d'une fève de cacao doit être au moins de 1,0 g. Les fèves qui sont plus petites à cette norme ont une coque proportionnellement supérieure et donc une amande plus petite (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

Généralement, un nombre de fèves inférieur ou égal à 100 pour 100 g est conforme à la norme. Entre 101 et 110 fèves incluses pour 100 g, les fèves sont dites moyennes. Entre 111 et 120 fèves incluses pour 100 g, les fèves sont dites petites. Supérieur à 120 fèves pour 100 g, les fèves sont dites très petites.

Dans notre cas, les échantillons de Trinitario ont des fèves conformes à la norme tandis que ceux de Criollo ont des fèves de taille moyenne (Tableau X). Les fèves de Criollo sont donc de plus petite taille que celles des variétés Trinitario. Les échantillons de Trinitario à casse Foncée ont un nombre de fèves pour 100 g plus faible que celui des Criollo car ils sont génétiquement plus proches des cacaos Forastero donc des fèves de grosse taille. Il est à noter que le nombre de fève pour 100 g des Trinitario à casse Claire se situe entre celui de Criollo et Trinitario à casse Foncée. En effet, le Trinitario est un hybride entre le Criollo et le Forastero et le Trinitario à casse Claire est plutôt à tendance Criollo donc des fèves de plus petite taille que le Trinitario à casse Foncée.

Le test statistique de Tukey confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre les 2 variétés de Trinitario (Tableau X). Il classe les échantillons en 2 groupes : d'un côté la variété Criollo et de l'autre les variétés Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée.

Tableau X. *Nombre de fève pour 100 g des 18 échantillons de cacao par variété*

Modalité	Moyennes (Nombre fèves/100g)	Groupes	
criollo	101	A	
Trinitario à casse Claire	87		B
Trinitario à casse Foncée	83		B

1. 2. Critères biochimiques

La spectrophotométrie proche infrarouge (SPIR) est une méthode rapide et non destructive permettant l'analyse et la quantification d'un nombre important de molécules dans les aliments : l'eau dans les aliments (Büning-Pfaue, 2003), les oligo-éléments dans les légumineuses (Cozzolino et Moron, 2004), les acides aminés dans le riz brun (Zhang *et al.*, 2011), les acides gras de la viande d'agneau (Guy *et al.*, 2011), la teneur en caroténoïdes, en cyanure et en matière sèche de la racine de manioc frais (Sánchez *et al.*, 2014). Cette technique permet aussi de distinguer les origines géographiques ou variétales : la discrimination des vins de riz chinois d'origine géographique différente (Yu *et al.*, 2007), l'identification de l'origine du bar européen (Xiccato *et al.*, 2004) ou celle des filets de tilapia d'exportation chinoise (Liu *et al.*, 2015a), la discrimination des variétés de cacao (Davrieux *et al.*, 2009; Barbin *et al.*, 2018).

La SPIR permet de caractériser génétiquement les variétés de cacao notamment par le ratio théobromine/caféine. Les valeurs pour le ratio théobromine/caféine selon les groupes génétiques du cacao se situent entre 10-15 (Forastero), 5-10 (Trinitario) et 1-2 (Criollo) (Hasing, 2004). Le Tableau XI donne les valeurs du ratio théobromine/caféine que nous avons mesuré pour les 18 échantillons de fèves de cacao en fin de fermentation.

Tableau XI. *Ratio théobromine/caféine des 18 échantillons de cacao*

Code	Teneur en caféine (%/matière sèche)	Teneur en théobromine (%/matière sèche)	Ratio théobromine/ caféine
217-ci-96	0,34	0,67	1,99
221-ci-96	0,38	0,65	1,69
225-ci-96	0,39	0,72	1,85
230-tc-144	0,35	0,63	1,80
235-tc-144	0,27	0,58	2,18
240-tc-144	0,33	0,54	1,62
245-tf-144	0,32	0,63	1,94
250-tf-144	0,27	0,47	1,70
255-tf-144	0,30	0,50	1,68
5-ci-96	0,58	0,89	1,55
10-ci-96	0,55	1,02	1,84
15-ci-96	0,54	0,99	1,83
22-tc-144	0,46	0,88	1,93
29-tc-144	0,46	0,81	1,76
36-tc-144	0,43	0,71	1,65
43-tf-144	0,42	0,89	2,11
50-tf-144	0,48	0,74	1,54
57-tf-144	0,46	0,73	1,60

Les ratio théobromine/caféine des 18 échantillons varient de 1,54 à 2,18 (Tableau XI). Ces résultats sont en accord avec la littérature. De plus, à l'aide de la base de données du CIRAD qui comprend différents échantillons de fèves de cacao de diverses origines géographiques, nous avons pu vérifier que les ratios théobromine/caféine des 18 échantillons de cacao se situent bien dans la zone des cacaos de Madagascar qui sont situés dans la zone des cacaos fins (Figure 10).

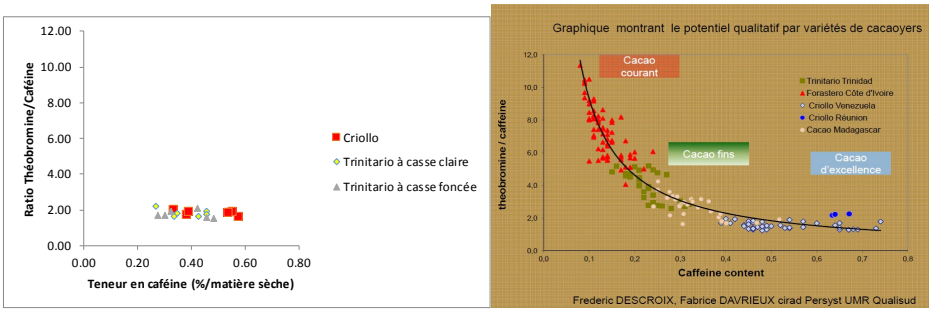


Figure 10. Comparaison des 18 échantillons de Madagascar par rapport aux variétés de cacao grâce au ratio théobromine/caféine

2. Les critères visuels

Le cut test (ou épreuve à la coupe) est une autre méthode pour déterminer la qualité du cacao sur le marché mondial. Il permet non seulement d'estimer la couleur des fèves, la bonne ou mauvaise fermentation, la présence ou non d'odeurs parasites mais aussi la variété des fèves de cacao. Il est basé sur une observation visuelle des fèves coupées et une évaluation du nombre de fèves défectueuses. Il présente les avantages d'être facile, rapide et nécessite peu de matériel. Une coupe longitudinale des fèves est effectuée à l'aide d'une guillotine (Magra 12, Teserba) de capacité de 50 fèves de cacao prises aléatoirement dans le lot échantillonné. La norme ISO 1114 (1977) stipule une coupe de 300 fèves. La démarche est la suivante : 50 fèves sont placées dans le plateau et sont coupées à l'aide de la guillotine. Puis, une évaluation olfactive globale de l'ensemble des fèves coupées est réalisée pour vérifier l'absence d'odeurs parasites. Ensuite, le décompte des fèves selon la couleur et l'aspect des fèves est réalisé. L'opération est répétée 6 fois afin de pouvoir observer 300 fèves selon les recommandations de la norme ISO 1114. La Figure 11 montre l'intérieur des fèves avec les couleurs qui sont les plus fréquemment rencontrées : ardoisées, violettes, brunes et claires. Les fèves brunes indiquent une bonne fermentation des fèves et une appartenance à la variété Trinitario/Forastero selon l'intensité de la teinte foncée et la présence de stries plus claires. De même, les fèves claires indiquent une bonne fermentation des fèves mais sont caractéristiques de la variété génétique des échantillons (Criollo).

Figure 11. Couleur des fèves au cut test

La norme ISO 2451 (2017) annule et remplace les normes ISO 2451 (2014), ISO 1114 (1977) et ISO 2291 (1980). Selon l'ISO, il y a 9 catégories de défauts de fèves, y compris les défauts qui peuvent être attribués à une fermentation déficiente (fèves ardoisées et violettes) ou qui peuvent indiquer des niveaux élevés d'acides gras libres, un arôme déficient et/ou d'autres contaminants (crabots, fèves brisées, fèves à l'odeur de fumée, fèves moisies, fèves germées, fèves plates, fèves mitées attaquées par des insectes/infestées). Les fèves ardoisées sont les

fèves de texture compacte ou non, dont les cotylédons sont de couleur ardoisée sur la moitié ou plus de la surface de la coupe longitudinale (pas de fermentation). Les fèves violettes possèdent des cotylédons dont la couleur est violette sur la moitié ou plus de la surface de la coupe longitudinale (fermentation insuffisante). Les fèves moisies sont les fèves montrant en coupe longitudinale, un développement de moisissures visibles à l'œil nu (mauvais séchage, mauvais stockage). Les fèves germées sont des fèves dont la radicule a percé le tégument ou présentant un orifice dû au passage, puis à la chute de la radicule. Les fèves plates sont des fèves réduites au seul tégument de la graine c'est-à-dire dont les cotylédons sont absents ou fortement atrophiés. Les fèves mitées renferment des insectes ou des larves d'insectes, ou bien présentent des signes de dommages causés par des insectes.

Cependant, seulement 5 de ces catégories sont utilisées dans les normes de qualité ISO 2451 sur les spécifications des fèves de cacao : les fèves moisies, ardoisées, attaquées par des insectes, germées et plates. Les lots de fèves de cacao sont classés en trois catégories marchandes : grade 1, grade 2 et hors norme selon leurs proportions en fèves moisies, ardoisées ou défectueuses (germées, mitées, pourries, noires, endommagées, brisées, avec brisures ou coques, plates, à odeur de fumée, à odeur étrangère). Les pourcentages pour la classification interne des pays producteurs des fèves fermentées en grade 1 ou 2 (norme ISO 2451) sont présentés dans le Tableau XII.

Tableau XII. *Classification interne des fèves fermentées de cacao selon les pays producteurs (norme ISO 2451)*

Catégorie	Pourcentage de fèves		
	Moisies	Ardoisées	Attaquées par les insectes, germées ou plates
1	≤ 3	≤ 3	≤ 3
2	≤ 4	≤ 8	≤ 6

Une classification internationale commerciale des fèves fermentées en bonne fermentation et fermentation acceptable existe et est donnée au Tableau XIII.

Tableau XIII. *Classification internationale des fèves fermentées de cacao (norme ISO 2451)*

Catégorie	Pourcentage de fèves	
	Ardoisées	Moisies et/ou mitées
Bonne fermentation	< 5	< 5
Fermentation acceptable	< 10	< 10

2. 1. Exploitation des résultats

Parmi les 18 échantillons analysés de cacao en fin de fermentation (6 Criollo, 6 Trinintario à casse Claire et 6 Trinitario à casse Foncée), nous n'avons pas trouvé de fèves moisies, mitées et germées ; et quasiment pas de fèves ardoisées. Par contre, il y a présence de fèves plates. Cette forte présence peut s'expliquer par le fait que les échantillons sont fermentés et séchés mais pas triés.

Les résultats pour chacun des 18 échantillons sont présentés dans le Tableau XIV. Pour l'ensemble des 18 échantillons, le taux de fèves violettes varie de 0 à 3,7 %. Le taux de fèves claires varie de 0,3 à 5 % sauf pour la variété Criollo (6,7 à 40,3 %). Le taux de fèves brunes varie de 87,7 à 98,3 % sauf pour la variété Criollo. En additionnant l'ensemble, le taux de fèves brunes et claires atteint des valeurs comprises entre 92 et 100 %.

Tableau XIV. *Pourcentages des fèves violettes, claires, brunes et plates des 18 échantillons de cacao*

Variété	Code	Récolte	Violettes	Claires	Brunes	Plates
Criollo	217-ci-96	1	0,7	15,7	78,6	5,0
Criollo	221-ci-96	1	0,7	9,0	83,0	7,3
Criollo	225-ci-96	1	0,0	6,7	87,3	6,0
Trinitario à casse Claire	230-tc-144	1	0,7	3,0	96,0	0,3
Trinitario à casse Claire	235-tc-144	1	0,3	0,3	98,4	1,0
Trinitario à casse Claire	240-tc-144	1	0,0	4,3	95,7	0,0
Trinitario à casse Foncée	245-tf-144	1	3,0	1,3	95,3	0,0
Trinitario à casse Foncée	250-tf-144	1	3,7	3,0	93,3	0,0
Trinitario à casse Foncée	255-tf-144	1	3,0	3,7	93,3	0,0
Criollo	5-ci-96	2	2,0	34,7	59,3	4,0
Criollo	10-ci-96	2	1,3	40,3	53,7	4,7
Criollo	15-ci-96	2	2,0	38,7	55,0	4,0
Trinitario à casse Claire	22-tc-144	2	0,3	5,0	88,7	6,0
Trinitario à casse Claire	29-tc-144	2	0,0	4,7	87,6	7,7
Trinitario à casse Claire	36-tc-144	2	0,0	3,3	90,7	6,0
Trinitario à casse Foncée	43-tf-144	2	0,0	2,3	90,0	7,7
Trinitario à casse Foncée	50-tf-144	2	0,0	2,0	95,0	3,0
Trinitario à casse Foncée	57-tf-144	2	0,3	2,3	91,0	6,4

Le Tableau XV regroupe les résultats des cut tests selon les différentes variétés de cacao.

Tableau XV. *Moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires, brunes et plates pour les deux campagnes pour les 3 variétés de cacao*

Variété	Violettes	Claires	Brunes	Plates
Criollo	1,1 ± 0,7	24,2 ± 14,1	69,5 ± 13,8	5,2 ± 1,2
Trinitario à casse Claire	0,2 ± 0,2	3,4 ± 1,6	92,8 ± 4,0	3,5 ± 3,1
Trinitario à casse Foncée	1,7 ± 1,6	2,4 ± 0,7	93,0 ± 2,1	2,8 ± 3,2

Plus les échantillons ont un taux élevé de fèves brunes ou claires, plus les fèves sont bien fermentées. Par contre, les fèves dites « mauvaises » sont celles : ardoisées, violettes, brisées, plates, germées, moisies, mitées. Nos échantillons sont considérés globalement comme bien fermentés.

Il n'y a ni odeur étrangère, ni de fumée, ni de moisissure sur les fèves coupées. En effet, certaines moisissures peuvent provoquer la formation de mycotoxines qui sont néfastes pour la santé. L'absence de moisissure souligne une fois de plus la bonne fermentation et le bon séchage des fèves. L'absence d'odeur de fumée est importante puisque certains échantillons ont été séchés au séchoir artificiel et la présence d'odeur de fumée dans le cacao post-récolte se retrouve lors de la transformation en chocolat.

Une analyse statistique ANOVA a été réalisée pour vérifier l'homogénéité des lots entre 2 campagnes de récolte pour une même variété. Le Tableau XVI résume les résultats du test de Tukey à 5 %. Les résultats montrent une différence significative entre les Criollo de la première campagne et ceux de la deuxième campagne (faiblement significative pour les fèves violettes et très significative pour les fèves claires et brunes). Le pourcentage plus élevé de fèves violettes pour la deuxième campagne est peut être dû à une moins bonne fermentation des fèves. Une raison qui pourrait expliquer cette différence est la masse de fèves mise à fermenter, beaucoup plus faible lors de la deuxième campagne par rapport à la première (80 kg de fèves fraîches lors de la première campagne contre 53 kg lors de la deuxième campagne). Néanmoins la somme des pourcentages des fèves claires et brunes pour les 2 campagnes donne une valeur similaire (≈ 93 %) confirmant la bonne fermentation des fèves.

Tableau XVI. *Différences significatives des moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires et brunes au seuil de risque 5 % entre les deux campagnes des échantillons de Criollo*

	Violettes	Claires	Brunes
Criollo (01/2015)	0,444 b	10,444 b	83,000 a
Criollo (10/2015)	1,778 a	37,889 a	56,000 b
Pr > F	0,013	0,001	0,001
Significatif	Oui	Oui	Oui

Pour les échantillons de Trinitario à casse Claire, il n'y a pas de différence significative pour les fèves violettes et claires. Par contre, il y a une différence significative pour les fèves brunes. Il y a un peu moins de fèves à casse claire lors de la première campagne (Tableau XVII). L'addition des pourcentages des fèves claires et brunes pour les 2 campagnes donne des valeurs importantes de 99,22 % et 93,33 % ce qui confirme la bonne fermentation des fèves. La différence des pourcentages est due à une teneur en fèves défectueuses plus importante pour la deuxième campagne.

Tableau XVII. *Différences significatives des moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires et brunes au seuil de risque 5 % entre les deux campagnes des échantillons de Trinitario à casse Claire*

	Violettes	Claires	Brunes
Trinitario à casse Claire (01/2015)	0,333 a	2,556 a	96,667 a
Trinitario à casse Claire (10/2015)	0,111 a	4,333 a	89,000 b
Pr > F	0,374	0,238	0,003
Significatif	Non	Non	Oui

Pour les échantillons de Trinitario à casse Foncée, il n'y a pas de différence significative pour les fèves ardoisées, claires et brunes. Néanmoins, il y a une différence significative pour les fèves violettes. L'addition des pourcentages des fèves claires et brunes pour les 2 campagnes donne des valeurs importantes de 96,67 % et 94,22 % ce qui confirme la bonne fermentation des fèves (Tableau XVIII).

Tableau XVIII. *Différences significatives des moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires et brunes au seuil de risque 5 % entre les deux campagnes des échantillons de Trinitario à casse Foncée*

	Ardoisées	Violettes	Claires	Brunes
Trinitario à casse Foncée (01/2015)	0,111 a	3,222 a	2,667 a	94,000 a
Trinitario à casse Foncée (10/2015)	0,000 a	0,111 b	2,222 a	92,000 a
Pr > F	0,374	0,000	0,561	0,296
Significatif	Non	Oui	Non	Non

En résumé, le taux de fèves bien fermentées est élevé et quasi identique d'une campagne de récolte à une autre. Cependant, une répartition différente peut s'observer entre les fèves claires et les fèves brunes selon les variétés et les campagnes de récolte.
Il est également intéressant de noter que les tests de Tukey effectués précédemment (voir les Tableaux XVI, XVII et XVIII) montrent que les pourcentages de fèves claires sont plus importants pour les Criollo que pour les Trinitario. Ils confirment ainsi la différence variétale entre les fèves de cacao marchand.

2. 2. Comparaison entre la norme ISO 2451 et la norme malgache

Selon la norme ISO 2451, il y a 7 échantillons de grade 1 (les 6 échantillons Trinitario de la première campagne de Madagascar et 1 échantillon Trinitario à casse Foncée de la deuxième campagne), 7 échantillons de grade 2 (2 échantillons de Criollo de la première campagne, les 3 échantillons Criollo et 2 échantillons Trinitario à casse Claire de la deuxième campagne) et 4 échantillons hors grade (1 Criollo de la première campagne, 1 échantillon Trinitario à casse Claire et 2 échantillons Trinitario à casse Foncée de la deuxième campagne) (Tableau XIX).

Tableau XIX. *Grade des 18 échantillons selon la norme ISO 2451*

Code	Moisies	Ardoisées	Attaquées par les insectes, germées ou plates	
217-ci-96	Grade 1	Grade 1	5,0 %	Grade 2
221-ci-96	Grade 1	Grade 1	7,3 %	
225-ci-96	Grade 1	Grade 1	6,0 %	Grade 2
230-tc-144	Grade 1	Grade 1	0,3 %	Grade 1
235-tc-144	Grade 1	Grade 1	1,0 %	Grade 1
240-tc-144	Grade 1	Grade 1	0,0 %	Grade 1
245-tf-144	Grade 1	Grade 1	0,0 %	Grade 1
250-tf-144	Grade 1	Grade 1	0,0 %	Grade 1
255-tf-144	Grade 1	Grade 1	0,0 %	Grade 1
5-ci-96	Grade 1	Grade 1	4,0 %	Grade 2
10-ci-96	Grade 1	Grade 1	4,7 %	Grade 2
15-ci-96	Grade 1	Grade 1	4,0 %	Grade 2
22-tc-144	Grade 1	Grade 1	6,0 %	Grade 2
29-tc-144	Grade 1	Grade 1	7,7 %	
36-tc-144	Grade 1	Grade 1	6,0 %	Grade 2
43-tf-144	Grade 1	Grade 1	7,7 %	
50-tf-144	Grade 1	Grade 1	3,0 %	Grade 1
57-tf-144	Grade 1	Grade 1	6,4 %	

A Madagascar, une autre classification est effectuée avant l'exportation du cacao pour des analyses. Ces contrôles sont effectués à la demande des importateurs, des exportateurs et des transformateurs. Le cacao malgache est alors classé en cacao standard et supérieur. Les pourcentages des différents critères sont présentés dans le Tableau XX.

Tableau XX. *Classification des fèves de cacao marchand à Madagascar*

Classification	Standard	Supérieur
Calibre (nombre de fèves par 100 g de fèves)	> 100	90 à 100
Fèves défectueuses (plates, brisées et germées)	-	< 3 %
Fèves défectueuses (plates, brisées, germées et mitées)	≤ 3 %	-
Fèves violettes	> 7 %	≤ 7 %
Fèves ardoisées	≤ 3 %	≤ 3 %
Fèves moisies	≤ 3 %	≤ 3 %
Féves mitées	-	≤ 3 %

Selon la classification, il y a donc 7 échantillons de grade supérieur (les 6 échantillons de Trinitario de la première campagne et 1 échantillon de Trinitario à casse Foncée de la deuxième campagne) et 11 échantillons de grade standard (Tableau XXI).

Tableau XXI. *Grade des 18 échantillons selon la classification de Madagascar*

	Violettes	Ardoisées	Défectueuses (plates, brisées, germées)		Mitées	Moisies	Grainage		Catégorie
217-ci-96	supérieur	supérieur	5,0 %	standard	supérieur	supérieur	103	standard	**standard**
221-ci-96	supérieur	supérieur	7,3 %	standard	supérieur	supérieur	113	standard	**standard**
225-ci-96	supérieur	supérieur	6,0 %	standard	supérieur	supérieur	114	standard	**standard**
230-tc-144	supérieur	supérieur	0,3 %	supérieur	supérieur	supérieur	84	supérieur	**supérieur**
235-tc-144	supérieur	supérieur	1,0 %	supérieur	supérieur	supérieur	95	supérieur	**supérieur**
240-tc-144	supérieur	supérieur	0,0 %	supérieur	supérieur	supérieur	85	supérieur	**supérieur**
245-tf-144	supérieur	supérieur	0,0 %	supérieur	supérieur	supérieur	81	supérieur	**supérieur**
250-tf-144	supérieur	supérieur	0,0 %	supérieur	supérieur	supérieur	83	supérieur	**supérieur**
255-tf-144	supérieur	supérieur	0,0 %	supérieur	supérieur	supérieur	83	supérieur	**supérieur**
5-ci-96	supérieur	supérieur	4,0 %	standard	supérieur	supérieur	93	supérieur	**standard**
10-ci-96	supérieur	supérieur	4,7 %	standard	supérieur	supérieur	92	supérieur	**standard**
15-ci-96	supérieur	supérieur	4,0 %	standard	supérieur	supérieur	92	supérieur	**standard**
22-tc-144	supérieur	supérieur	6,0 %	standard	supérieur	supérieur	86	supérieur	**standard**
29-tc-144	supérieur	supérieur	7,7 %	standard	supérieur	supérieur	82	supérieur	**standard**
36-tc-144	supérieur	supérieur	6,0 %	standard	supérieur	supérieur	90	supérieur	**standard**
43-tf-144	supérieur	supérieur	7,7 %	standard	supérieur	supérieur	86	supérieur	**standard**
50-tf-144	supérieur	supérieur	3,0 %	supérieur	supérieur	supérieur	81	supérieur	**supérieur**
57-tf-144	supérieur	supérieur	6,4 %	standard	supérieur	supérieur	88	supérieur	**standard**

Il est à noter que les échantillons de grade 1 (norme ISO 2451) sont tous classés dans la catégorie supérieure et tous les grades 2 sont classés dans la catégorie standard. Si le tri avait bien été effectué, le taux de fèves plates serait faible et les échantillons seraient probablement tous classés de grade 1 et supérieur (sauf les 3 échantillons de Criollo de la première campagne qui sont de petite taille donc standard).

Actuellement, les acteurs de la filière cacao à Madagascar souhaitent la mise en place d'une nouvelle classification qualitative plus exigeante des fèves marchandes destinées à l'exportation. Le Tableau XXII regroupe les nouveaux pourcentages proposés concernant la classification malgache des fèves fermentées (standard et supérieur).

Tableau XXII. *Proposition de classification des fèves de cacao à l'exportation de Madagascar*

Classification	Standard	Supérieur
Calibre (nombre de fèves par 100 g de fèves)	≤ 105	≤ 95
Particules étrangères	≤ 0,1 %	≤ 0,1 %
Fèves brisées	≤ 3 %	≤ 1 %
Fèves plates	≤ 3 %	≤ 1 %
Fèves violettes	≤ 18 %	≤ 10 %
Fèves ardoisées	≤ 6 %	≤ 2 %
Fèves germées	≤ 4 %	≤ 1 %
Fèves moisies	≤ 3 %	≤ 1 %
Féves mitées	≤ 0,1 %	≤ 0,1 %

Comparée à la norme internationale (ISO 2451) qui ne différencie que les catégories bonne fermentation et fermentation acceptable, la classification interne à Madagascar se traduirait de la manière suivante au niveau de la norme ISO (Tableau XXIII).

Tableau XXIII. *Classification malgache des fèves fermentées de cacao*

Catégorie	Pourcentage de fèves			
	Ardoisées		Moisies et/ou mitées	
Bonne fermentation	< 2	< 5*	< 1,1	< 5*
Fermentation acceptable	< 6	< 10*	< 3,1	< 10*

*Chiffres de la norme ISO 2451

3. Qualités sensorielle et aromatique

3. 1. Evaluation sensorielle

Pour réaliser l'évaluation sensorielle, les fèves de cacao sont transformées en liqueur de cacao. Cette liqueur de cacao (appelée aussi masse de cacao ou pâte de cacao) est obtenue après

concassage des fèves puis broyage au pétrin. Par rapport au chocolat, la liqueur ne contient ni sucre ni lait.

La dégustation de la liqueur de cacao est plus complexe sur le plan technique que l'analyse du chocolat car l'acidité, l'amertume et l'astringence sont souvent des traits dominants.
Les méthodes d'analyse sensorielle employées varient suivant les fabricants et les instituts de recherche du cacao. Après avoir préparé les liqueurs de cacao, celles-ci sont dégustées par un panel composé de membres du CIRAD et de dégustateurs externes.
Tous les échantillons sont dégustés 3 fois par un même juge afin d'avoir des résultats statistiques fiables.

3. 1. 1. Etablissement de la grille d'évaluation sensorielle

La méthode utilisée est celle du libre profil. Elle consiste à l'élaboration d'une liste de termes descriptifs définis par chaque membre du jury pour caractériser les liqueurs de cacao à partir de liqueurs qui devront être caractérisées (norme ISO 11035 : 1994). Les liqueurs utilisées pour la génération du vocabulaire sont des échantillons appartenant aux liqueurs à caractériser. Parmi celles-ci, des liqueurs à différent temps de fermentation sont choisies afin de représenter au mieux l'ensemble des 81 liqueurs. Les panélistes génèrent du vocabulaire pour décrire les différences entre les produits. Dans un premier temps, le groupe doit rechercher le plus grand nombre de descripteurs. Dans un second temps, la liste est ensuite réduite en supprimant les termes à connotation hédonique, les synonymes et les antonymes et les termes non pertinents. La réduction du nombre de termes est faite par consensus : seuls les descripteurs pour lesquels la majorité des panélistes étaient d'accord sont conservés. La liste finale comprend 22 descripteurs générés pour décrire les différents cacaos :

- 6 critères olfactifs (O Fruité, O Doux, O Cacao, O Chocolat, O Acide, O Végétal)
- 15 marqueurs gustatifs (Acidité, Amertume, Astringence, Cacao, Chocolat, Doux, Fruits frais, Fruits secs, Floral, Alcoolique, Epicé, Grillé, Boisé, Terreux, Végétal)
- un descripteur global (qualité)

Les juges doivent compléter la grille d'évaluation sensorielle en donnant une note allant de 0 à 10 (nombre entier et unique) pour chaque descripteur et chaque échantillon. Pour les descripteurs olfactifs et gustatifs, la note 0 indique l'absence du descripteur alors que la note 10 indique une présence très prononcée. Pour le descripteur qualité globale, la note 0 signifie que l'échantillon est très désagréable tandis que la note 10 signifie qu'il est très agréable.

3. 1. 2. Analyse globale

L'analyse sensorielle effectuée par le jury a permis de caractériser les différents échantillons de Madagascar. La moyenne des 22 descripteurs des 18 échantillons de cacao classés par variété sont présentés dans le Tableau XXIV. Les 6 premiers descripteurs sont des descripteurs olfactifs (lettre « O » pour odeur) et les 15 suivants sont des descripteurs gustatifs. Par ailleurs, les ANOVA effectués sur chaque descripteur par le test de Tukey ont permis de classer les échantillons en plusieurs groupes selon les lettres a, b et ab (Tableau XXIV).

Tableau XXIV. *Moyenne des notes des descripteurs pour les 3 variétés de cacao (test de Tukey)*

		Criollo	Trinitario à casse Claire	Trinitario à casse Foncée
odeur	O Fruité	4,66 a	4,81 a	4,78 a
	O Cacao	3,93 a	4,13 a	3,90 a
	O Chocolat	3,69 a	3,65 a	3,57 a
	O Doux	3,13 a	3,09 a	3,07 a
	O Acide	2,72 a	3,23 a	2,97 a
	O Végétal	1,66 a	1,57 a	1,27 a
goût	Cacao	4,79 a	4,97 a	4,65 a
	Acidité	**3,76 b**	4,98 a	5,04 a
	Fruits frais	**2,99 b**	4,05 a	3,99 a
	Amertume	4,01 a	**3,13 b**	**3,10 b**
	Fruits secs	3,65 a	**3,17 ab**	**3,01 b**
	Chocolat	3,01 a	3,12 a	3,02 a
	Astringence	2,91 a	2,70 a	2,62 a
	Epicé	2,28 a	2,38 a	2,22 a
	Doux	2,14 a	2,39a	2,17 a
	Végétal	1,96 a	**1,64 ab**	**1,25 b**
	Grillé	1,72 a	**1,35 ab**	**1,13 b**
	Floral	1,24 a	1,44 a	1,36 a
	Alcoolique	**0,99 b**	1,62 a	1,36 a
	Boisé	1,02 a	**0,73 b**	**0,55 b**
	Terreux	0,47 a	**0,24 b**	**0,23 b**
	Qualité	5,77 a	6,06 a	6,14 a

Les analyses statistiques montrent que pour les descripteurs olfactifs, il n'y a pas de différence significative entre les variétés. Ces descripteurs ne permettent pas de discriminer les échantillons suivant la variété. Par contre, 9 descripteurs gustatifs permettent de discriminer les échantillons suivant la variété. Pour les descripteurs Fruits secs, Végétal et Grillé ; les échantillons de Criollo et de Trinitario à casse Foncée se situent dans 2 groupes bien distincts tandis que les échantillons de Trinitario à casse Claire ont des moyennes de notes se situant entre les 2 variétés de cacao précédemment citées. Pour les 6 autres descripteurs (Acidité, Fruits frais, Amertume, Alcoolique, Boisé et Terreux), 2 groupes distincts apparaissent : d'un côté la variété Criollo et de l'autre les variétés Trinitarios sans distinction entre les Trinitario à casse Claire et les Trinitario à casse Foncée.

Il est à noter que les moyennes des notes attribuées aux descripteurs sont classées par ordre décroissant à l'exception du goût Acidité et Fruits frais pour la variété Criollo. Au niveau olfactif, les échantillons sont caractérisés principalement par la note O Fruité et par les notes O

Cacao et O Chocolat. Au niveau gustatif, les échantillons sont caractérisés principalement par les notes Cacao et Acidité mais aussi par les notes Fruits frais, Amertume et Fruits secs. Les autres descripteurs ont des moyennes de notes plus faibles mais sont intéressants à signaler en particulier : O Doux et goût Chocolat, tous deux ayant une note supérieure à 3.

Gustativement, les échantillons de Criollo ont un goût moins acide et Fruits frais mais l'amertume et la note Fruits secs sont plus prononcées que les échantillons de Trinitario. L'amertume pourrait s'expliquer par une teneur plus élevée en théobromine et en caféine pour les Criollo (Tableau XI). En effet, l'astringence du chocolat est déterminée par les composés polyphénoliques et l'amertume par les purines (caféine et théobromine) (Portillo *et al.*, 2006). D'après la littérature, les chocolats produits à partir des fèves de Forastero (proche de la variété Trinitario à casse Foncée) sont moins amers, moins astringents et moins acides que les chocolats produits à partir des fèves de Criollo ou de Trinitario (Clapperton *et al.*, 1994; Sukha *et al.*, 2008). La note acide est principalement due à l'acide lactique et l'acide acétique, tous deux formés pendant la fermentation. L'acide acétique est volatile tandis que l'acide lactique l'est moins. L'acidité élevée peut s'expliquer par l'ouverture immédiate des cabosses après récolte et la mise en fermentation rapide des fèves dans le procédé utilisé chez AO Madagascar. En effet, il est possible de réduire l'acidité en entreposant les cabosses non ouvertes pendant quelques jours avant le début de la fermentation (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

En résumé, les échantillons de cacao malgache se caractérisent par les notes spécifiques : fruité, cacao et acide. Une étude sur des cacaos provenant d'Equateur a établi une corrélation entre les caractéristiques génétiques, la composition chimique (acides organiques, sucres, polyphénols et méthylxanthines) et les caractéristiques sensorielles (astringence, amertume, acidité, intensité de la saveur cacao et les notes florale et fruitée) (Luna *et al.*, 2002).
Une autre étude a montré la relation existante entre les teneurs en polyphénols et méthylxanthines et l'astringence et l'arôme de cacao (Clapperton *et al.*, 1993; Clapperton *et al.*, 1994).

3. 1. 3. Mise en évidence des corrélations entre descripteurs sensoriels et variétés

Une visualisation des groupes à partir des 9 descripteurs significatifs associés au goût issus de l'ANOVA est réalisée via une ACP afin d'étudier les corrélations entre les liqueurs d'origine variétale différente et les descripteurs. Ces descripteurs sont les goûts : Alcoolique, **Acidité**, **Fruits frais**, Végétal, **Fruits secs**, **Amertume**, Grillé, Boisé et Terreux. Seuls les goûts notés en caractère gras ont une note supérieure ou proche de la valeur 3. Les autres descripteurs gustatifs discriminants sont relativement peu prononcés (note inférieure à 2).

L'analyse en composantes principales (ACP) est une analyse essentiellement descriptive : son objectif est de présenter, sous forme graphique, le maximum de l'information contenue dans un tableau de données, composé de n lignes (individus) et p colonnes (variables) (avec 18 lignes (liqueurs) et 9 colonnes (descripteurs) dans notre cas). L'ACP permet d'examiner les relations entre des variables pouvant être corrélées. L'objectif est de résumer la variabilité entre les individus en un minimum de dimensions non corrélées (les composantes principales) avec une perte d'information minimale. L'ACP permet à la fois d'établir le bilan des ressemblances entre les individus, le bilan des ressemblances entre les variables et de synthétiser l'information sur les composantes principales (Escofier et Pagès, 2008). En ACP, le tableau des données est centré avant l'analyse. En outre, il est parfois utile de standardiser les variables de l'analyse afin que les éventuelles différences entre les échelles de mesure n'influent pas. Il s'agit alors de réduire les données en divisant les valeurs par l'écart-type de la variable en cause pour que toutes les variables aient la même variabilité, donc la même influence dans le calcul des distances entre individus. On parle alors d'ACP normée, ce qui est notre cas.

La Figure 12 est une ACP permettant la visualisation des 18 liqueurs de cacao. Les axes 1 et 2 portent respectivement 65,91 % et 10,85 % de l'information. Il apparaît globalement 2 groupes de liqueurs bien distincts : d'un côté les Trinitario (cercle rouge) et de l'autre les Criollo (cercle bleu).

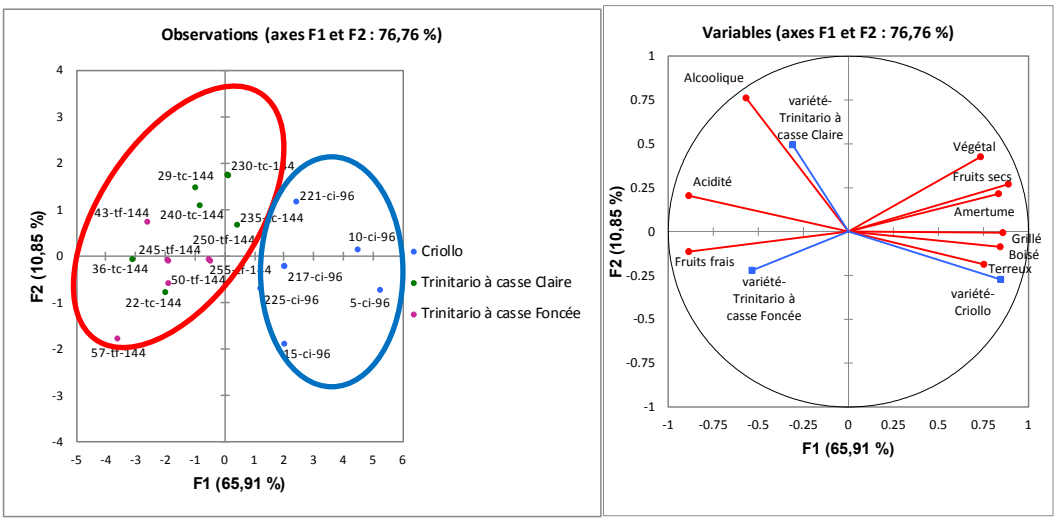


Figure 12. ACP des 18 échantillons

Le biplot montre que les Criollo se distinguent des Trinitario par les descripteurs Terreux, Boisé, Grillé, Amertume, Fruits sec, Végétal. Dans le groupe des Trinitario, deux sous-groupes apparaissent : la variété Trinitario à casse Foncée se distingue par son caractère Fruits frais du Trinitario à casse Claire qui a une note alcoolisée plus élevée que les autres variétés. Il est à noter que ces échantillons sont tous relativement dispersés les uns des autres et que ces caractéristiques concernant les variétés sont donc toutes relatives.

Afin d'avoir des distinctions plus fines au niveau des campagnes de récolte et qui pourraient expliquer cet effet de dispersion des échantillons, une CAH est réalisée pour les 18 liqueurs afin de les classer dans des groupes (Tableau XXV).

Tableau XXV. *Répartition des 18 liqueurs selon la CAH*

Classe	1	2	3
	217-ci-96	230-tc-144	22-tc-144
	221-ci-96	235-tc-144	36-tc-144
	225-ci-96	240-tc-144	43-tf-144
	5-ci-96	245-tf-144	50-tf-144
	10-ci-96	250-tf-144	57-tf-144
	15-ci-96	255-tf-144	
		29-tc-144	

La CAH a classé les 18 liqueurs en 3 groupes (Tableau XXV). Le groupe 1 contient les 6 liqueurs de Criollo. Le groupe 2 contient les 6 liqueurs de Trinitario de la première campagne plus 1 liqueur de Trinitario à casse Claire de la deuxième campagne. Le groupe 3 contient les 5

liqueurs de Trinitario de la deuxième campagne sauf la liqueur de Trinitario à casse Claire (dans le groupe 2).

3. 2. Analyse des composés volatils

Actuellement, plus de 600 composés aromatiques ont été identifiés à partir de fèves de cacao et de produits dérivés du cacao (Crafack *et al.*, 2014). Ces composés sont des hétérocycles oxygénés ou azotés, des aldéhydes et des cétones, des esters, des alcools, des hydrocarbures, des nitriles et des sulfures, des pyrazines, des éthers, des acides, des phénols, des imines, des amines (Hoskin et Dimick, 1984; Schnermann et Schieberle, 1997; Jinap *et al.*, 1998; Counet *et al.*, 2002; Taylor, 2002; Granvogl *et al.*, 2006; Reineccius, 2006; Afoakwa *et al.*, 2008; Frauendorfer et Schieberle, 2008; Ziegleder, 2009). La plupart de ces composés sont générés lors de la torréfaction à partir de précurseurs biochimiques présents dans le cacao vert.

Dans le cadre de notre étude, la technique privilégiée pour capter les composés volatils est celle de la micro-extraction en phase solide (SPME). Cette technique offre l'avantage de piéger d'une part les composés volatils et d'autre part d'opérer à une température inférieure à celle qui pourrait conduire à l'apparition d'artéfacts (molécules volatiles non présentes dans la matrice d'origine et formées sous l'action de la chaleur) (Harmon, 1997; Pawliszyn, 2001). De plus, sa mise en œuvre est aisée et rapide. Néanmoins, la capacité de piégeage des composés volatils est dépendant de la nature de la fibre utilisée. La SPME a été utilisée pour l'analyse de plusieurs composés aromatiques dans plusieurs produits alimentaires, et plus particulièrement dans les fruits (Yang et Peppard, 1994; Steffen et Pawlizyn, 1996; Song *et al.*, 1998; Beaulieu et Grimm, 2001; Azodanlou *et al.*, 2003; Riu-Aumatel *et al.*, 2004).

3. 2. 1. La composition aromatique du cacao torréfié en poudre par SPME

Des tests préliminaires (quantité de matière première, temps d'équilibre et temps de piégeage, température du bain, ajout ou non d'eau dans l'échantillon) ont été réalisés afin d'optimiser le piégeage des molécules volatiles.

Après optimisation de la technique de piégeage en SPME (2 g de cacao en poudre ; phase d'équilibre : 50 °C pendant 10 min ; phase d'adsorption : 50 °C pendant 45 min), les composés volatils ont été séparés sur une colonne polaire (DB-WAX) et une colonne apolaire (SPB-5) à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Ils ont été identifiés par comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux des banques de données ainsi qu'à l'aide des indices de rétention relatifs calculés à ceux théoriques disponibles dans la littérature et diverses banques de données. Par ailleurs, les composés aromatiques identifiés ont été quantifiés sur la colonne polaire à l'aide d'un étalon interne butan-1-ol.

Le Tableau XXVI indique les composés identifiés ainsi que la moyenne de leurs teneurs toutes campagnes confondues par variété (exprimée en ppm).

Tableau XXVI. *Moyenne des concentrations des composés volatils des 18 échantillons de cacao torréfié (ppm)*

Classe	Nom des composés	IRR calculés		Criollo	Trinitario à casse Claire	Trinitario à casse Foncée
		Polaire	Apolaire			
Ester	Acétate de méthyle	823	-	16 ± 5	27 ± 9	26 ± 10
	Acétate d'éthyle	889	-	16 ± 11	122 ± 68	165 ± 96
	Acétate de 3-méthylbutyle	1130	865	17 ± 10	48 ± 16	49 ± 22
	Hexanoate d'éthyle	1251	997	tr	2 ± tr	3 ± tr
	Acétate d'heptan-2-ol	1281	1041	1 ± tr	5 ± 3	4 ± 3
	Diacétate de butane-2,3-diol	1373	1059	tr	tr	tr
	Octanoate d'éthyle	1407	1196	tr	4 ± 1	6 ± 2
	Diacétate de propane-1,3-diol	1649	955	3 ± 3	74 ± 64	80 ± 58
	Acétate d'éthylphényle	1763	1249	2 ± tr	5 ± 1	7 ± 1
	Acétate de 2-phényléthyle	1791	1262	26 ± 7	48 ± 8	65 ± 6
	Acétate de butyle	1047	-	tr	tr	tr
Acide	Acide acétique	1435	-	127 ± 27	104 ± 74	181 ± 107
	Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	1560	727	25 ± 13	10 ± 6	6 ± 2
	Acide 3-méthylbutanoïque	1660	826	51 ± 13	29 ± 8	24 ± 3
	Acide hexanoïque	1823	-	1 ± tr	1 ± tr	2 ± tr
Alcool	Pentan-2-ol	1160	657	2 ± tr	9 ± 5	10 ± 3
	Éthanol	940	-	9 ± 4	2 ± 2	2 ± tr
	3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	1247	871	tr	1 ± tr	2 ± 1
	Heptan-2-ol	1346	895	tr	3 ± 2	2 ± 2
	Alcool benzylique	1844	-	1 ± tr	tr	2 ± tr
	2-phényléthanol	1868	1119	11 ± 11	15 ± 9	30 ± 15
Pyrazine	2,5-diméthylpyrazine	1336	909	8 ± 3	3 ± tr	4 ± 1
	2,6-diméthylpyrazine	1340	894	5 ± 2	2 ± tr	3 ± tr
	2,3-diméthylpyrazine	1354	917	6 ± 1	4 ± tr	5 ± 1
	2-éthyl-6-méthylpyrazine	1385	-	3 ± 1	1 ± tr	2 ± tr
	2,3,5-triméthylpyrazine	1405	1001	45 ± 12	41 ± 6	51 ± 10
	3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine	1443	1083	8 ± 4	4 ± tr	6 ± 2
	Tétraméthylpyrazine	1477	1090	226 ± 88	367 ± 141	380 ± 171
	6-éthyl-2,3,5-triméthylpyrazine	1512	1164	12 ± 7	11 ± 3	16 ± 7
Aldéhyde	3-méthylbutanal	915	609	15 ± 3	15 ± 3	13 ± 2
	Benzaldéhyde	1497	960	46 ± 3	41 ± 7	49 ± 7
	5-méthyl-2-phénylhex-2-énal	1969	1499	tr	tr	tr
	2-méthylbutanal	913	-	14 ± 8	14 ± 6	15 ± 5
	2-isopropyl-5-méthylhex-2-énal	1362	-	tr	tr	tr
Cétone	Heptan-2-one	1209	885	3 ± 1	4 ± 1	3 ± tr
	Acétoïne (3-hydroxybutanone)	1300	-	6 ± 3	7 ± 2	8 ± 4
	Nonan-2-one	1385	1094	1 ± tr	3 ± 1	2 ± tr
	Acétophénone (1-phényléthanone)	1622	-	3 ± tr	7 ± 3	9 ± 2
Lactone	Butyrolactone	1597	910	2 ± tr	2 ± tr	4 ± 2
Hétérocycle	2-acétylpyrrole	1896	1064	16 ± 3	17 ± 4	27 ± 6
	2-formyl-1-méthylpyrrole	1989	-	tr	tr	tr
	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one	-	1147	4 ± 3	2 ± tr	7 ± 4

tr : traces (< 1 ppm)

42 composés répartis en huit classes chimiques ont été identifiés et tous les composés identifiés ont été déjà signalés dans la littérature.

Ce tableau indique que les composés majoritaires (concentrations supérieures à 10 ppm et ceux ayant environ 50 ppm et plus soulignés en gras) dans le cacao sont : l'acétate de méthyle, **l'acétate d'éthyle**, **l'acétate de 3-méthylbutyle**, **l'acétate de 2-phényléthyle**, **l'acide acétique**, l'acide 3-méthylbutanoïque, le 2-phényléthanol, **la 2,3,5-triméthylpyrazine**, **la tétraméthylpyrazine**, le 3-méthylbutanal, **le benzaldéhyde,** le 2-méthylbutanal et la 2-acétylpyrrole.

Sur la base de ces résultats, il semble intéressant d'établir :

- Une corrélation entre la composition aromatique et les résultats de l'analyse olfactive
- Une distinction des variétés selon la composition aromatique et son impact sensoriel.

3. 2. 2. Corrélation entre la composition aromatique et l'analyse olfactive

Les analyses sensorielles ont montré que les cacaos malgaches étaient caractérisés olfactivement par les caractères fruité, cacao, chocolat toutes variétés confondues.

La littérature indique que certaines molécules volatiles ont une influence positive ou négative sur la qualité aromatique des fèves de cacao (Frauendorfer et Schieberle, 2008; Rodriguez-Campos *et al.*, 2011; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012; Torres Moreno, 2012). Parmi les molécules clés considérées comme bénéfiques pour leur contribution aux notes de chocolat, caramel, sucré, de noisette, fruité et floral, on retrouve dans le cacao de Madagascar, le 3-méthylbutan-1-ol, le 3-méthylbutanal, le 2-méthylbutanal, le phénylacétaldéhyde, le benzaldéhyde, la 2-éthyl-3,5-diméthylpyrazine, la 2,3-diéthyl-5-méthylpyrazine, le 2-phényléthanol, l'acétate d'éthylphényle, l'acétate de 2-phényléthyle. Inversement, lorsque les acides 3-méthylbutanoïque (retrouvé dans nos analyses) et propanoïque sont identifiés et lorsque les teneurs de l'acide acétique sont trop élevées, les attributs de saveur et de goût sont notés défavorablement, avec des descripteurs du type rassis, épicé, astringent (Bonvehí, 2005; Afoakwa *et al.*, 2008).

En outre, la technique de l'analyse par dilution d'un extrait d'arôme (AEDA) réalisé sur du cacao torréfié permet de mettre en évidence les composés volatils les plus odorants clés dans divers aliments (Schieberle, 1995). L'AEDA est couplé à la détermination des OAV (Odor

Activity Value) qui traduit la capacité odorante d'une substance volatile. L'OAV est aussi dénommée « Nombre d'Unités d'Odeur » et se définit comme le rapport entre la concentration de la substance dans l'aliment et son seuil de perception dans la même matrice. Les substances volatiles, dont la capacité odorante est supérieure à 1, ont généralement un impact olfactif d'autant plus important que sa capacité odorante est élevée. Parmi les centaines de composés aromatiques identifiés dans l'arôme du cacao, par les méthodes chromatographiques couplées à un spectromètre de masse, la méthode AEDA révèle l'importance olfactive de composés volatils dans l'arôme du cacao. De nombreuses études mettent en évidence les composés responsables de l'arôme de cacao parmi les centaines de composés identifiés comme nous l'indique le Tableau XXVII (Frauendorfer et Schieberle, 2006; Krings *et al.*, 2006; Belitz *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015b).

Tableau XXVII. *Liste de composés responsables de l'arôme du cacao avec leur teneur exprimée en ppm et leur valeur OAV respective*

Composés volatils	Seuil olfactif (ppm)	OAV
Acétate de 2-phényléthyle	233	4
Acide acétique	124	2660
Acide 3-méthylbutanoïque	750	440
Heptan-2-ol	263	4,1
2-phényléthanol	1000	36
2,3,5-triméthylpyrazine	290	3,2
3-méthylbutanal	0,4	2610
2-méthylbutanal	4	32

Dans notre cas, la 2-méthylbutanal et la 3-méthylbutanal, la 2-phényléthanol, l'acide acétique, l'acide 3-méthylbutanoique contribuent le plus à la note chocolat et dans une moindre mesure l'acétate de 2-phényléthyle.

Le 5-méthyl-2-phénylhex-2-énal dans du cacao torréfié est identifié et son odeur est associée à une note de cacao persistante en bouche (Van Praag *et al.*, 1968). Il a même été signalé comme étant caractéristique du cacao de Madagascar.

Les travaux de Ziegleder (1990) ont montré que les monoterpènes tels que le linalol font partie des composés ou des molécules responsables de la saveur de cacao fin et a conclu que les saveurs des cacaos fins contiennent des quantités plus élevées de linalol par rapport au cacao

courant (Ziegleder, 1990). L'auteur a également proposé que le linalol soit considéré comme un composé clé permettant la classification des cacaos en fonction de leur origine. Les amandes des cacaos « fins » qui proviennent d'Equateur (goût Arriba), de Trinidad et du Venezuela contiennent plus de linalol que les cacaos courants (Ghana, Côte d'Ivoire et Brésil). La teneur en linalol qui peut être jusqu'à huit fois plus élevée serait responsable des notes florales attribuées à ces cacaos fins. Concernant les cacaos de Madagascar, le linalol n'a pas été identifié, ce qui est en accord avec les résultats de l'analyse sensorielle pour laquelle la note olfactive florale est absente.

3. 2. 3. Différenciation des 3 groupes de cacao

Le pourcentage des teneurs totales des composés volatils regroupés par famille chimique est calculé et un graphique reprend chacun des groupes et chaque variété en tenant compte de ces pourcentages relatifs (Figure 13).

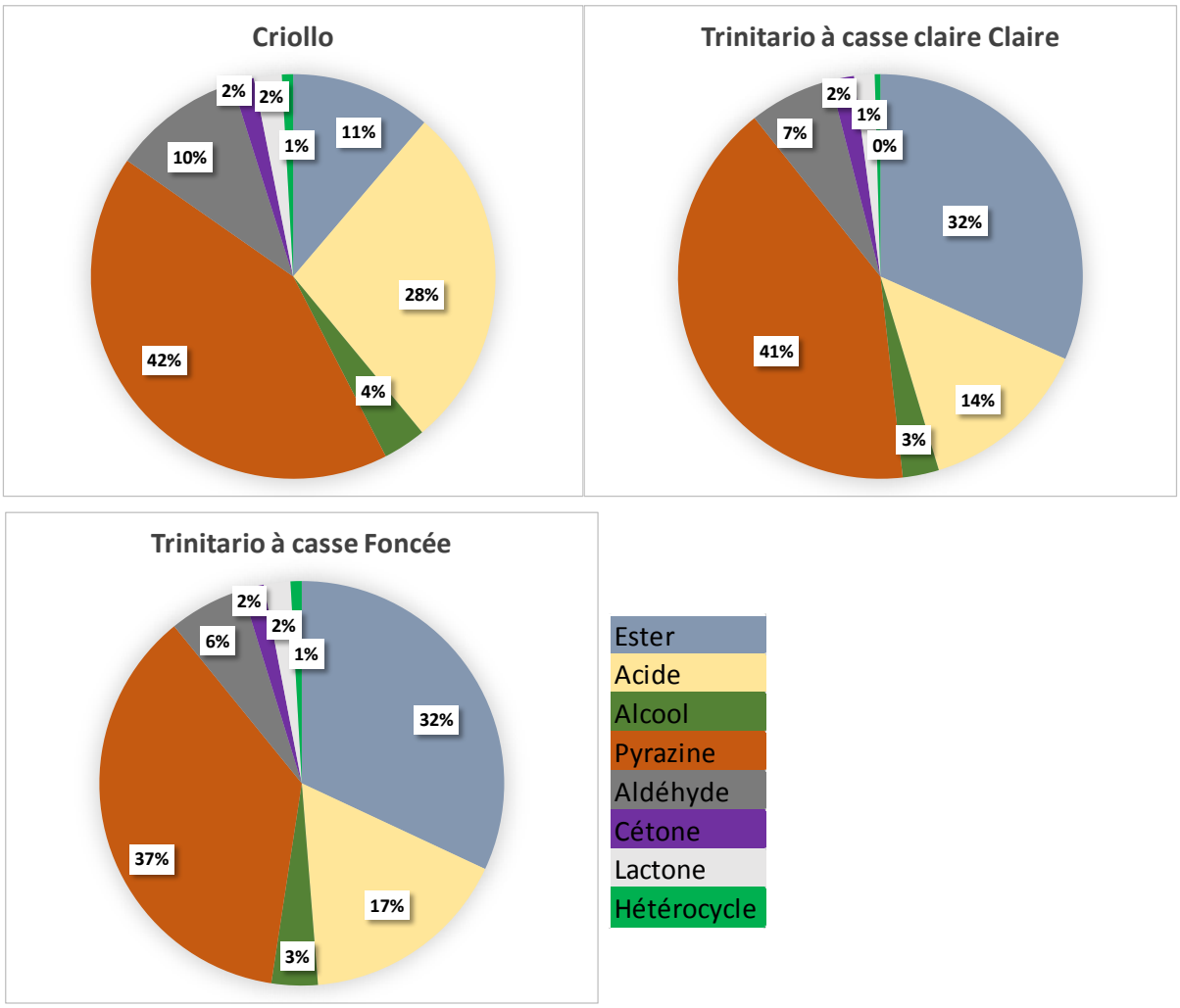


Figure 13. Pourcentage des familles de composés volatils par variété

Le Tableau XXVIII donne les résultats des ANOVA effectués sur chaque famille chimique des composés volatils par le test de Tukey.

Tableau XXVIII. *Moyenne des concentrations des familles chimiques des composés volatils pour les 3 variétés de cacao (test de Tukey) (ppm)*

Familles chimiques	Criollo	Trinitario à casse Claire	Trinitario à casse Foncée
Ester	**83 b**	335 a	408 a
Acide	204 a	144 a	214 a
Alcool	25 a	31 a	47 a
Pyrazine	311 a	434 a	469 a
Aldéhyde	77 a	71 a	78 a
Cétone	**13 b**	**20 ab**	23 a
Lactone	**2 b**	**2 b**	4 a
Hétérocycle	**21 b**	**20 b**	34 a

La teneur des molécules volatiles dans les variétés Criollo, Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée varie significativement (Figure 13 et Tableau XXVIII). Il y a une différence entre les variétés pour les familles des esters, des cétones, de la lactone et des hétérocycles.

Des analyses ANOVA ont aussi été réalisées sur chaque composé volatil par le test de Tukey afin de rechercher les composés discriminant les variétés (Tableau XXIX).

Tableau XXIX. *Moyenne des concentrations des composés volatils pour les 3 variétés de cacao (test de Tukey) (ppm)*

Nom des composés	Criollo	Trinitario à casse Claire	Trinitario à casse Foncée
Acétate de méthyle	16 a	27 a	26 a
Acétate d'éthyle	**16 b**	**122 ab**	165 a
Acétate de 3-méthylbutyle	**17 b**	48 a	49 a
Hexanoate d'éthyle	**tr b**	2 a	3 a
Acétate d'heptan-2-ol	1 a	5 a	4 a
Diacétate de butane-2,3-diol	**tr ab**	**tr b**	tr a
Octanoate d'éthyle	**tr b**	4 a	6 a
Diacétate de propane-1,3-diol	3 a	74 a	80 a
Acétate d'éthylphényle	**2 c**	**5 b**	7 a
Acétate de 2-phényléthyle	**26 c**	**48 b**	65 a
Acétate de butyle	tr a	tr a	tr a
Acide acétique	127 a	104 a	181 a
Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	25 a	**10 b**	**6 b**
Acide 3-méthylbutanoïque	51 a	**29 b**	**24 b**
Acide hexanoïque	**1 b**	**1 b**	2 a
Pentan-2-ol	**2 b**	9 a	10 a
Éthanol	9 a	**2 b**	**2 b**
3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	tr a	1 a	2 a
Heptan-2-ol	tr a	3 a	2 a
Alcool benzylique	1 a	tr a	2 a
2-phényléthanol	11 a	15 a	30 a
2,5-diméthylpyrazine	8 a	**3 b**	**4 b**
2,6-diméthylpyrazine	5 a	**2 b**	**3 ab**
2,3-diméthylpyrazine	6 a	4 a	5 a
2-éthyl-6-méthylpyrazine	3 a	**1 b**	**2 ab**
2,3,5-triméthylpyrazine	45 a	41 a	51 a
3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine	8 a	4 a	6 a
Tétraméthylpyrazine	226 a	367 a	380 a
6-éthyl-2,3,5-triméthylpyrazine	12 a	11 a	16 a
3-méthylbutanal	15 a	15 a	13 a
Benzaldéhyde	46 a	41 a	49 a
5-méthyl-2-phénylhex-2-énal	tr a	tr a	tr a
2-méthylbutanal	14 a	14 a	15 a
2-isopropyl-5-méthylhex-2-énal	tr a	**tr ab**	**tr b**
Heptan-2-one	3 a	4 a	3 a
Acétoïne (3-hydroxybutanone)	6 a	7 a	8 a
Nonan-2-one	1 a	3 a	2 a
Acétophénone (1-phényléthanone)	**3 b**	7 a	9 a
Butyrolactone	**2 b**	**2 b**	4 a
2-acétylpyrrole	**16 b**	**17 b**	27 a
2-formylacétylpyrrole	tr a	tr a	tr a
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one	**4 ab**	**2 b**	7 a

tr : traces (< 1 ppm)

Concernant les teneurs des différentes classes chimiques entrant dans la composition volatile, les pyrazines, les esters, les aldéhydes prédominent en accord avec les travaux de divers auteurs (Muggler-Chavan et Reymond, 1967; Gill *et al.*, 1984; Silwar, 1988; Ziegleder, 1991; Oberparleiter et Ziegleder, 1997). Il est à noter que les cacaos de Madagascar se distinguent par leurs teneurs élevées en acides.

Les pyrazines sont les composés les plus abondants représentant 37-42 % du total des composés volatils. La teneur est la plus élevée pour les variétés Trinitario à casse Foncée (469 ± 174 ppm) et Trinitario à casse Claire (434 ± 146 ppm) et moins élevée pour les Criollo (311 ± 93 ppm). 8 molécules de pyrazine sont retrouvées dans les échantillons. La tétraméthylpyrazine est celle dont la concentration est la plus élevée parmi les pyrazines et aussi parmi l'ensemble des molécules. Elle est de 380 ± 171 ppm et 367 ± 141 ppm respectivement pour les Trinitario à casse Foncée et les Trinitario à casse Claire ; et est à 226 ± 88 ppm pour les Criollo. La tétraméthylpyrazine est l'un des principaux composés de l'arôme cacao, et est responsable des notes aromatique de noisette, grillé et chocolat (Afoakwa *et al.*, 2008). La deuxième pyrazine la plus abondante en concentration est la 2,3,5-triméthylpyrazine avec une valeur la plus élevée pour les Trinitario à casse Foncée (51 ± 10 ppm) et des valeurs plus faibles pour les variétés Criollo et Trinitario à casse Claire (respectivement 45 ± 12 et 41 ± 6 ppm).

La production de pyrazines pendant la fermentation des fèves de cacao a été décrite dans plusieurs articles (Reineccius *et al.*, 1972; Bauermeister, 1981; Barel *et al.*, 1985; Hashim et Chaveron, 1994; Jinap *et al.*, 1994). D'après la littérature, le cacao Criollo contient une grande quantité de pyrazines (Reineccius *et al.*, 1972). A part, les triméthylpyrazines et la tétraméthylpyrazine, toutes les autres pyrazines ont des teneurs plus élevées pour la variété Criollo. La tétraméthylpyrazine pourrait provenir de l'action des micro-organismes tels que *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Acetobacter aceti* et *Bacillus subtilis* (Reineccius *et al.*, 1972; Sabik *et al.*, 2012). La tétraméthylpyrazine serait donc déjà présente dans le cacao non torréfié.

Une étude réalisée sur des liqueurs de cacao d'Equateur et du Venezuela a montré que la tétramethylpyrazine à la concentration la plus élevée dans tous les échantillons avec une valeur maximale de 585 ng/g (Magi *et al.*, 2012). Ces auteurs signalent aussi que les alkylpyrazines sont des indicateurs probables de l'origine du cacao selon leurs teneurs entre les échantillons. Il en est de même des travaux de Reineccius qui indiquent que la concentration en pyrazines

présente dans les fèves de cacao, en particulier la tétraméthylpyrazine, dépend du pays d'origine, de la variété de cacao, du temps de fermentation et du degré de torréfaction (Reineccius *et al.*, 1972).

Néanmoins, les alkylpyrazines peuvent être produites aussi pendant les procédés de chauffage (tels que la torréfaction des fèves de cacao) d'un α-acide aminé et un sucre réducteur par la réaction de Maillard et la dégradation de Strecker.

Les pyrazines donnent généralement une note de rôti, cuit et grillé (Maga, 1982; Owusu, 2010). En plus des aldéhydes, les pyrazines sont les principaux composés formés pendant la torréfaction et les plus importants contributeurs à l'arôme de chocolat (Vitzthum *et al.*, 1975).

Les esters sont des composés aromatiques importants du cacao, qui apportent des arômes fruités, formés sur la réaction des acides organiques avec l'éthanol (Afoakwa *et al.*, 2008). Les esters sont des composés abondants après les pyrazines représentant 11 % du total des composés volatils pour les Criollo, 32 % pour les Trinitario à casse Claire et les Trinitario à casse Foncée **d'où le caractère fruité en particulier pour les Trinitario**. Les teneurs sont significativement plus élevées pour les variétés Trinitario à casse Foncée et Trinitario à casse Claire (408 ± 72 ppm et 335 ± 133 ppm) et plus faible pour les Criollo (83 ± 22 ppm). Les acétates de méthyle, d'éthyle et de 3-méthylbutyle sont des molécules avec des teneurs abondantes parmi les esters. Pour l'acétate de méthyle, les teneurs des Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée sont proches (27 ± 9 et 26 ± 10 ppm respectivement) et plus élevées que la teneur des Criollo (16 ± 5 ppm). Pour l'acétate d'éthyle, la teneur des Trinitario à casse Foncée est la plus élevée (165 ± 96 ppm) et significativement différente des Criollo (16 ± 11 ppm) ; les Trinitario à casse Claire se situant entre les deux variétés précédentes (122 ± 68 ppm). Pour l'acétate de 3-méthylbutyle, les teneurs des Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée sont proches (48 ± 16 et 49 ± 22 ppm respectivement) et significativement plus élevées que les Criollo (17 ± 10 ppm). Pour l'acétate d'éthylphényle et l'acétate de 2-phényléthyle, les teneurs sont significativement différentes entre les 3 variétés : plus élevées pour les Trinitario à casse Foncée (7 ± 1 et 65 ± 6 ppm respectivement) ; plus faibles pour les Criollo (2 ± traces et 26 ± 7 ppm respectivement) et entre les 2 variétés pour les Trinitario à casse Claire (5 ± 1 et 48 ± 8 ppm respectivement).

Les acides représentent la deuxième famille la plus abondante en concentration pour la variété Criollo (28 %) alors que dans les variétés Trinitario, ils se retrouvent en troisième position (14 % pour les Trinitario à casse Claire et 17 % pour les Trinitarios à casse Foncée). Cependant concernant les concentrations, elles sont plus élevées pour les variétés Trinitario à casse Foncée et Criollo (214 ± 105 ppm et 204 ± 48 ppm respectivement) et plus faible pour les Trinitario à casse Claire (144 ± 75 ppm). Selon Qin *et al.* (2017), les acides sont les molécules volatiles les plus abondantes dans ces groupes de cacao et contribuent à hauteur de 30 à 40 % de la teneur totale des composés volatils. Les travaux de Qin *et al*. (2017) ont montré que la teneur des acides est significativement plus élevée dans le cacao Trinitario (414,70 ± 29,45 $\mu g.kg^{-1}$ Matière Sèche) et le cacao Criollo (389,17 ± 29,19 $\mu g.kg^{-1}$ MS) que du cacao Forastero (224,20 ± 27,40 $\mu g.kg^{-1}$ MS). Dans notre étude, 4 molécules d'acide sont retrouvées dans les échantillons. L'acide acétique est celle dont la concentration est la plus élevée parmi les acides. Elle varie de 181 ± 107 ppm pour les Trinitario à casse Foncée, de 127 ± 27 et 104 ± 74 ppm pour les Criollo et les Trinitario à casse Claire respectivement. L'acide acétique présente un arôme " aigre, vinaigre " (Eskes *et al.*, 2007). Le deuxième acide le plus abondant en concentration est l'acide 3-méthylbutanoïque avec une teneur significativement plus élevée pour les Criollo à 51 ± 13 ppm ; et des teneurs proches pour les Trinitario avec des teneurs de 29 ± 8 et 24 ± 3 ppm respectivement pour les variétés Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée. D'après les résultats, les acides permettent de discriminer les variétés Criollo et Trinitario. Les teneurs élevées en acide confèrent aux fèves de Madagascar la note acide.

Les alcools sont caractérisés par les notes fruitée et fleurie (Saltini *et al.*, 2013). Il y 6 alcools qui sont retrouvés dans les échantillons à savoir le pentan-2-ol, l'éthanol, l'alcool isoamylique, l'heptan-2-ol, l'alcool benzylique et le 2-phényléthanol. Concernant les concentrations, elles sont plus élevées pour les variétés Trinitario à casse Foncée (47 ± 17 ppm) et plus faible pour les Trinitario à casse Claire et Criollo (31 ± 15 ppm et 25 ± 11 ppm respectivement). Le 2-phényléthanol est l'alcool dont la concentration est la plus élevée avec des teneurs de 30 ± 15 ppm pour les Trinitario à casse Foncée, de 15 ± 9 ppm pour les Trinitario à casse Claire et de 11 ± 11 ppm pour les Criollo. Le pentan-2-ol a une teneur significativement plus élevée pour les Trinitario à casse Foncée et Trinitario à casse Claire avec des teneurs de 9 ± 5 et 10 ± 3 ppm respectivement et plus faible pour les Criollo (2 ± traces ppm). A l'inverse, l'éthanol a une teneur significativement plus élevée pour les Criollo (9 ± 4 ppm) et plus faible pour les

Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée (2 ± 2 et 2 ± traces ppm respectivement). Les 3 autres alcools ont des teneurs plus faibles. Le pentan-2-ol et l'heptan-2-ol sont des composés retrouvés dans la littérature (Oberparleiter et Ziegleder, 1997; Kadow *et al.*, 2013). Les alcools sont généralement souhaitables pour obtenir des chocolats avec des notes de fleuri et de bonbon (Frauendorfer et Schieberle, 2008; Aculey *et al.*, 2010). L'éthanol a déjà été identifié dans le cacao sec (Portillo *et al.*, 2009).

Nous avons également retrouvé 5 aldéhydes dans les échantillons à savoir le 3-méthylbutanal, le benzaldéhyde, le 5-méthyl-2-phénylhex-2-énal, le 2-méthylbutanal et le 2-isopropyl-5-méthylhex-2-énal. Concernant les concentrations, les aldéhydes ont des teneurs plus élevées pour les variétés Trinitario à casse Foncée et Criollo (78 ± 8 ppm et 77 ± 10 ppm respectivement) et plus faible pour les Trinitario à casse Claire (71 ± 11 ppm). Le benzaldéhyde est l'aldéhyde dont la concentration est la plus élevée avec des teneurs de 49 ± 7 ppm pour les Trinitario à casse Foncée, de 46 ± 3 ppm les Criollo et de 41 ± 7 ppm pour les Trinitario à casse Claire. Puis le 3-méthylbutanal et le 2-méthylbutanal sont les composés dont les teneurs sont élevées et proches : pour le 3-méthylbutanal (15 ± 3 ppm pour les Criollo, 15 ± 3 ppm pour les Trinitario à casse Claire et 13 ± 2 ppm pour le Trinitario à casse Foncée) et pour le 2-méthylbutanal (14 ± 8 ppm pour les Criollo, 14 ± 6 ppm pour les Trinitario à casse Claire et 15 ± 5 ppm pour le Trinitario à casse Foncée).

Selon Qin et collaborateurs, les composés aldéhydiques des trois groupes de cacao (Criollo, Trinitario et Forastero) ont contribué entre 0,83-1,20 % à la teneur en composés volatils totale (Qin *et al.*, 2017). Les aldéhydes aromatiques volatils sont essentiellement formés par la dégradation de Strecker des acides aminés tels que l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine conduisant aux aldéhydes respectifs l'acétaldéhyde, le 2-méthylpropanal, le 3-méthylbutanal, le 2-méthylbutanal et le phénylacétaldéhyde (Belitz *et al.*, 2004; Afoakwa *et al.*, 2008; Ziegleder, 2009). En outre, ces aldéhydes peuvent être partiellement convertis en leurs alcools, acides et esters correspondants.

Une étude ancienne (Van Praag *et al.*, 1968) a identifié le 5-méthyl-2-phényl-2-hexénal dans le cacao torréfié et a indiqué que son odeur a été associée à « une note amère persistante profonde du cacao ». En général, les aldéhydes de Strecker tels que le 2-phénylacétaldéhyde et le 3-méthylbutanal sont reconnus comme des composés odorants importants à l'arôme de cacao (Van Praag *et al.*, 1968).

Il y 4 cétones qui sont retrouvées dans les échantillons. Concernant les concentrations, elles sont plus significativement élevées pour les variétés Trinitario à casse Foncée (23 ± 6 ppm) et plus faible pour les Criollo (13 ± 2 ppm) et entre les 2 variétés précédentes pour les Trinitario à casse Claire (20 ± 5 ppm). L'acétoïne et l'acétophénone sont les 2 composés ayant les teneurs les plus élevées pour les cétones. Concernant l'acétoïne, les teneurs sont proches pour les 3 variétés : 6 ± 3 ppm pour les Criollo ; 7 ± 2 ppm pour les Trinitario à casse Claire et 8 ± 4 ppm pour les Trinitario à casse Foncée. Concernant l'acétophénone, les teneurs sont significativement plus élevées pour les Trinitario à casse Claire et les Trinitario à casse Foncée (7 ± 3 et 9 ± 2 ppm respectivement) par rapport aux Criollo (3 ± traces ppm). Des composés volatils tels que la nonan-2-one sont décrits pour avoir une odeur fraîche et douce et un goût fruité (van der Kooij, 2013).

Il y a 3 hétérocycles qui sont retrouvés dans les échantillons : le 2-acétylpyrrole, le 2-formylacétylpyrrole et le 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one. Concernant le 2-formylacétylpyrrole, il n'y a pas de différence significative entre les 3 variétés. Le 2-acétylpyrrole a une teneur significativement plus élevée pour les Trinitario à casse Foncée (27 ± 6 ppm) que les Criollo et Trinitario à casse Claire (16 ± 3 et 17 ± 4 ppm respectivement). De même le 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one a une teneur significativement plus élevée dans le cas du Trinitario à casse Foncée (7 ± 4 ppm) que le Trinitario à casse Claire (2 ± traces ppm) et entre les 2 variétés précédentes pour les Criollo (4 ± 3 ppm). Le 2-acétylpyrrole a une odeur de pop-corn (Belitz *et al.*, 2009).

Il y a une lactone qui est retrouvée dans les échantillons : la butyrolactone. Celle-ci a une teneur significativement plus élevée pour les Trinitario à casse Foncée (4 ± 2 ppm) par rapport aux Criollo et aux Trinitario à casse Claire (2 ± traces et 2 ± traces ppm respectivement). Des composés volatils tels que ɣ-butyrolactone sont décrits pour avoir une odeur fraîche et douce et un goût fruité (van der Kooij, 2013).

Conclusions

Les résultats des différentes analyses confirment que les cacaos marchands de Madagascar appartiennent bien à la catégorie des cacaos fins selon les critères de l'ICCO :

- *critère génétique* :

Au niveau du grainage, le test statistique de Tukey montre que les fèves de Criollo sont de plus petite taille que celles des variétés Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée.

L'analyse par SPIR a montré, par le ratio théobromine/caféine que les échantillons analysés de Madagascar appartiennent au groupe des cacaos fins.

- *critère visuel* :
le cut test confirme la bonne fermentation des fèves.

- *critères sensoriel et aromatique* :

Au niveau olfactif, les échantillons sont caractérisés principalement par la note O Fruité et secondairement par les notes O Cacao et O Chocolat. Au niveau gustatif, les échantillons sont caractérisés principalement par les notes Cacao et Acidité mais aussi par les notes Fruits frais.

L'analyse des composés volatils confirme l'appartenance des échantillons aux cacaos fins. En effet, parmi les composés volatils dont les teneurs sont supérieures à 50 ppm, certains sont associés à des notes olfactives retrouvées dans les cacaos fins. L'acétate de 3-méthylbutyle et l'acétate d'éthyle sont associés à la note fruitée. De même, le benzaldéhyde et la

tétraméthylpyrazine sont associés à la note chocolat. De plus, le 3-méthylbutanal dont la teneur est d'environ de 15 ppm est l'une des molécules clés de l'arôme cacao.

Des différences entre les diverses variétés de cacao ont aussi été notées.

Au niveau du grainage, le test statistique de Tukey classe les échantillons en 2 groupes, les Criollo et les Trinitario.

Au niveau visuel, les pourcentages de fèves claires plus importants pour les Criollo par rapport aux Trinitario confirment bien la différence variétale des fèves de cacao marchand.

Au niveau des critères sensoriels et aromatiques :

Le test statistique de Tukey montre que les descripteurs olfactifs ne permettent pas de discriminer les échantillons suivant la variété. Par contre, 9 descripteurs gustatifs permettent de discriminer les échantillons suivant la variété. Pour les descripteurs Fruits secs, Végétal et Grillé ; les échantillons de Criollo et de Trinitario à casse Foncée se situent dans 2 groupes bien distincts tandis que les échantillons de Trinitario à casse Claire ont des moyennes de notes se situant entre les 2 variétés de cacao précédemment citées. Pour les 6 autres descripteurs (Acidité, Fruits frais, Amertume, Alcoolique, Boisé et Terreux), 2 groupes distincts apparaissent : la variété Criollo et les variétés Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée. Les Criollo se distinguent des Trinitario par des notes plus élevées au niveau des descripteurs Terreux, Boisé, Grillé, Amertume, Fruits sec et Végétal. Dans le groupe des Trinitario, deux sous-groupes apparaissent : la variété Trinitario à casse Foncée se distingue par son caractère Fruits frais du Trinitario à casse Claire qui a une note alcoolisée plus élevée que les autres variétés. Il faut cependant noter que ces caractéristiques concernant les variétés sont toutes relatives puisque les notes concernant les descripteurs Végétal, Grillé, Alcoolique, Boisé et Terreux sont moins élevées par rapport à celles des autres descripteurs. De plus, la moyenne des notes de qualité globale est légèrement moins élevée pour les Criollo (5,77) par rapport aux Trinitario (6,06 et 6,14) confirmant la qualité de l'ensemble des échantillons.

Les tests de Tukey réalisés sur les composés volatils montrent des différences au niveau des variétés. En effet, le test statistique de Tukey discrimine les variétés Criollo et Trinitario selon les teneurs totales des cétones des Trinitario à casse Claire (20 ppm) et Trinitario à casse Foncée

(23 ppm) qui sont plus élevées que celle des Criollo (13 ppm). En particulier, les teneurs en acétate de 3-méthylbutyle et en acétate d'éthyle sont significativement plus élevées pour les Trinitario par rapport à celles des Criollo. Ces résultats sont en accord avec la note olfactive fruitée plus élevée pour les Trinitario par rapport à celles des Criollo.

CHAPITRE IV :
Evolution de la qualité au cours de la fermentation

Introduction

Il est important dans le diagnostic de la qualité de porter aussi un regard macroscopique sur l'évolution de cette qualité tout au long de l'étape de fermentation. Deux paramètres sont pris comme indicateurs : les descripteurs sensoriels et la composition aromatique.

Le but de cette partie est l'étude de l'évolution des composés volatils au cours de la fermentation pour les différentes variétés de cacao et l'évolution au niveau sensoriel pour les différents échantillons.

Concernant l'analyse sensorielle, la même grille d'évaluation sensorielle que celle utilisée pour l'étude des cacaos marchands est utilisée.

La même technique SPME que celle utilisée pour les cacaos marchands a été employée pour la détermination et la quantification des composés volatils.

Le jeu de données est composé de 81 échantillons fermentés de 24 à 144 h et torréfiés pour l'évaluation sensorielle. En effet, une analyse sensorielle sur les échantillons fermentés à 0 h conduirait à une distorsion des résultats car ces échantillons possèdent une forte amertume en bouche qui masque les autres descripteurs sensoriels.

Le jeu de données est composé de 99 échantillons fermentés de 0 à 144 h torréfiés de cacao malgache pour la détermination de la composition en composés volatils. Parmi les 99 échantillons, il y a : 27 échantillons de Criollo, 36 échantillons de Trinitario à casse Claire et 36 échantillons de Trinitario à casse Foncée.

Le procédé de fermentation étant différent (temps de brassage et temps de fermentation globale) selon la variété de cacao, le suivi de la qualité est entrepris pour chaque variété et les outils statistiques que sont la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH), l'Analyse en Composantes Principales (ACP), le Partial Least Square – Discriminant Analysis (PLS-DA) sont mis en œuvre pour déterminer les caractéristiques de chaque type de fermentation en fonction de la variété de cacao.

1. Les Criollo

1. 1. Evolution sensorielle

Parmi les 21 échantillons analysés, il y a : 3 échantillons fermentés 24 h, 6 fermentés 48 h, 6 fermentés 72 h et 6 fermentés 96 h.

• ***Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) et caractérisation de produits***

Une CAH est effectuée sur les 21 échantillons de Criollo (Figure 14).

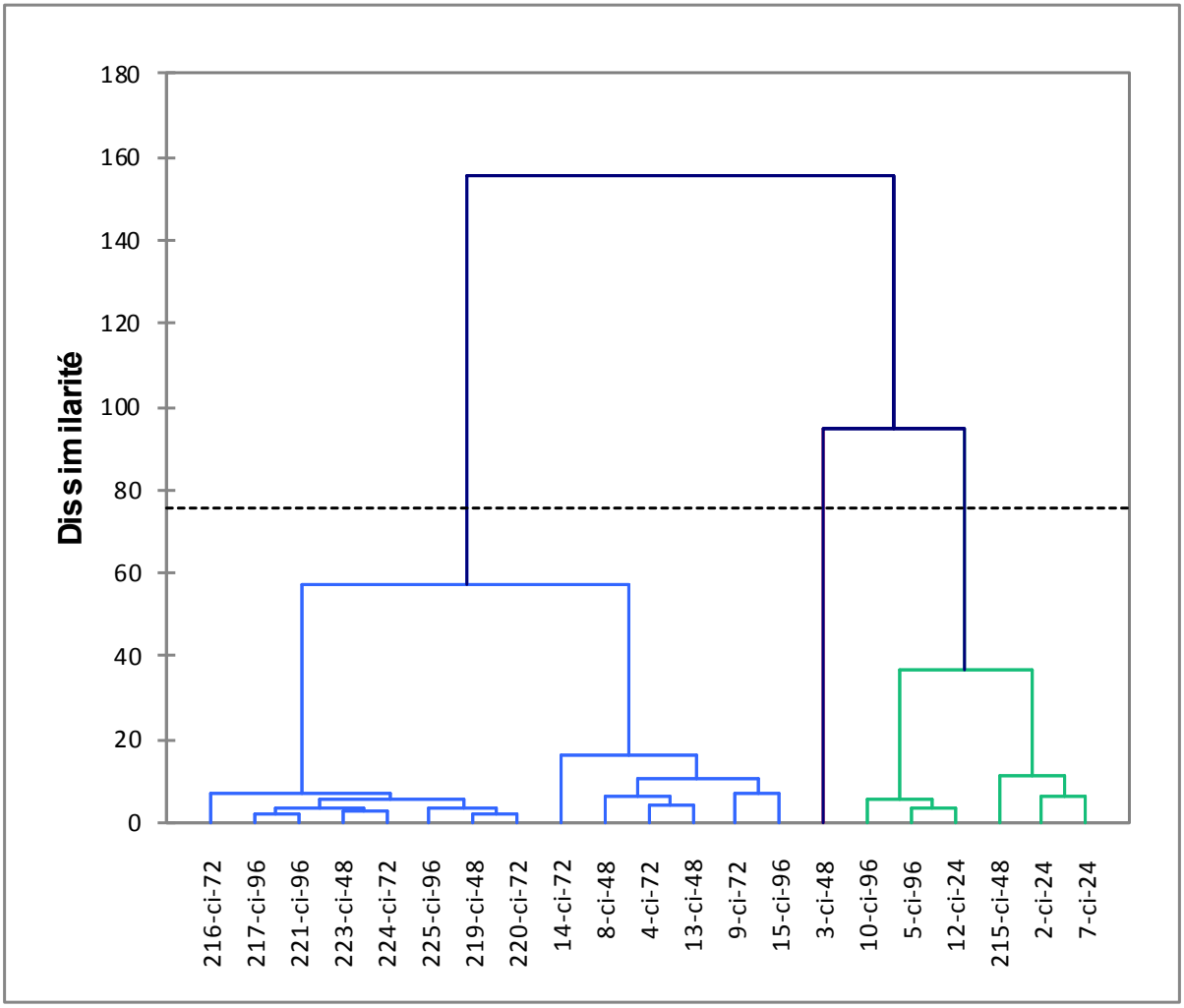


Figure 14. Dendogramme des 21 liqueurs de Criollo selon la CAH

La Figure 14 montre des échantillons peu fermentés (24 h) bien regroupés (en vert). Les échantillons fermentés 48 h sont répartis de manière plus disparate parmi l'ensemble des classes (en vert et bleu). Les échantillons fermentés 72 h et la majorité des échantillons de 96 h se retrouvent dans le groupe bleu. Deux échantillons fermentés 96 h de la campagne 10/2015 (échantillons 5-ci-96 et 10-ci-96) sont dans le groupe vert.

La Figure 15 représente la moyenne des notes des échantillons de Criollo regroupés par classe pour chaque descripteur.

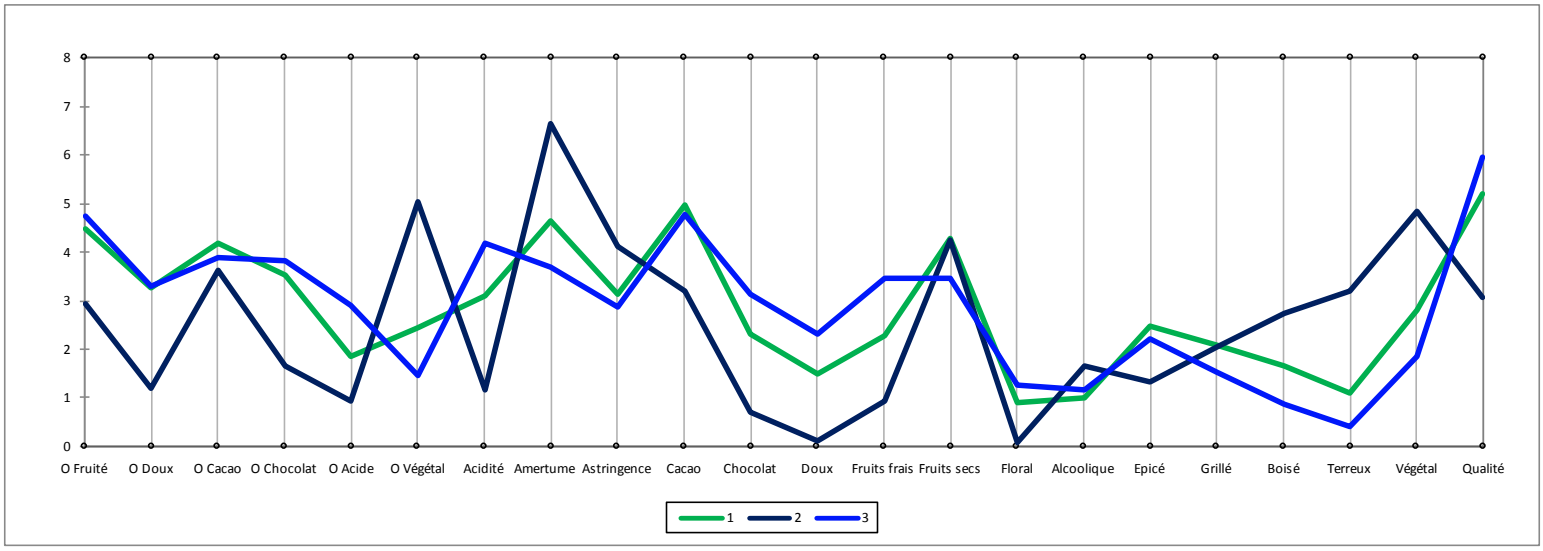


Figure 15. Profil des classes des 21 liqueurs de Criollo selon la CAH

La classe des échantillons en bleu (classe 3) est caractérisée par les descripteurs : O Fruité, O Chocolat, O Acide, Acidité, Chocolat, Doux, Fruits frais et Floral. La classe des échantillons en vert (classe 1) est caractérisée par les descripteurs : O Cacao, Cacao et Epicé. L'échantillon 3-ci-48 représente la classe 2.

Une corrélation entre le positionnement des échantillons au niveau du dendogramme et la cartographie sensorielle de chaque échantillon est effectuée. La Figure 16 est une cartographie détaillée des différents descripteurs pour chaque échantillon par rapport à la moyenne globale des notes obtenues pour chaque descripteur pour l'ensemble des Criollo. En bleu, on voit les caractéristiques dont le coefficient est significativement positif c'est-à-dire dont les moyennes sont significativement plus grandes que la moyenne globale et en rouge celles dont le coefficient est significativement négatif c'est-à-dire dont les moyennes sont significativement plus petites

que la moyenne globale. En blanc, ce sont les descripteurs dont le coefficient est non significatif.

A titre d'exemple, l'échantillon 3-ci-48 est donc corrélé positivement aux descripteurs Amertume, Végétal, Terreux, O Végétal, Boisé, Astringence, Alcoolique et négativement aux descripteurs Epicé, Cacao, O Doux, O Acide, O Chocolat, O Fruité, Floral, Fruits frais, Chocolat, Acidité, Doux. Ces derniers sont des descripteurs corrélés positivement pour des échantillons en fin de fermentation ce qui explique donc la position proche de l'échantillon 3-ci-48 du groupe des fèves fermentées 24 h au niveau du dendogramme.

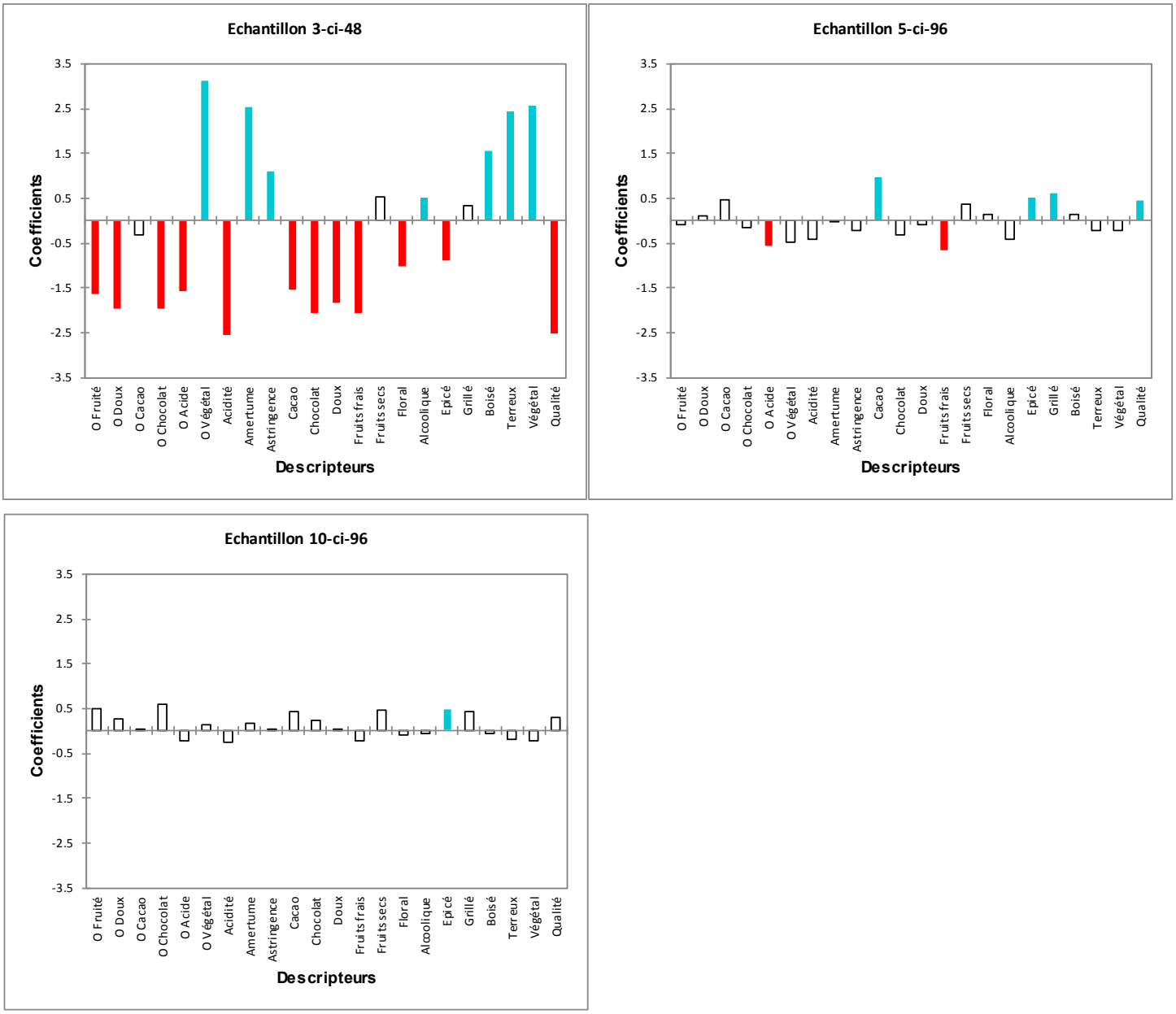


Figure 16. Caractérisation sensorielle des produits 3-ci-48, 5-ci-96 et 10-ci-96

Les Figures 14 et 16 montrent que l'échantillon 5-ci-96 est classé dans le groupe des 24 h bien qu'il y ait une note globale bonne car il est corrélé négativement aux descripteurs O Acide et Fruits frais. L'échantillon 5-ci-96 est corrélé positivement aux descripteurs Grillé, Epicé, Cacao et négativement aux descripteurs O Acide et Fruits frais.

Concernant l'échantillon 10-ci-96, les notes des descripteurs sont proches des moyennes des notes pour l'ensemble des produits. Il est donc mal caractérisé par rapport à des notes attendues pour un échantillon fermenté 96 h. En effet, par exemple pour le descripteur O Fruité, la moyenne des 21 échantillons de Criollo est proche de la note obtenue pour l'échantillon 10-ci-96 et cette dernière n'est ni significativement plus grande ou plus petite que la moyenne globale. Le descripteur O Fruité n'est donc pas caractéristique de l'échantillon 10-ci-96. Cet échantillon est seulement corrélé positivement au descripteur Epicé ce qui explique sa position proche du groupe des fèves fermentées 24 h au niveau du dendogramme.

- ***Analyse en Composantes Principales (ACP)***

Une ACP est effectuée sur les 21 échantillons de Criollo (Figure 17).

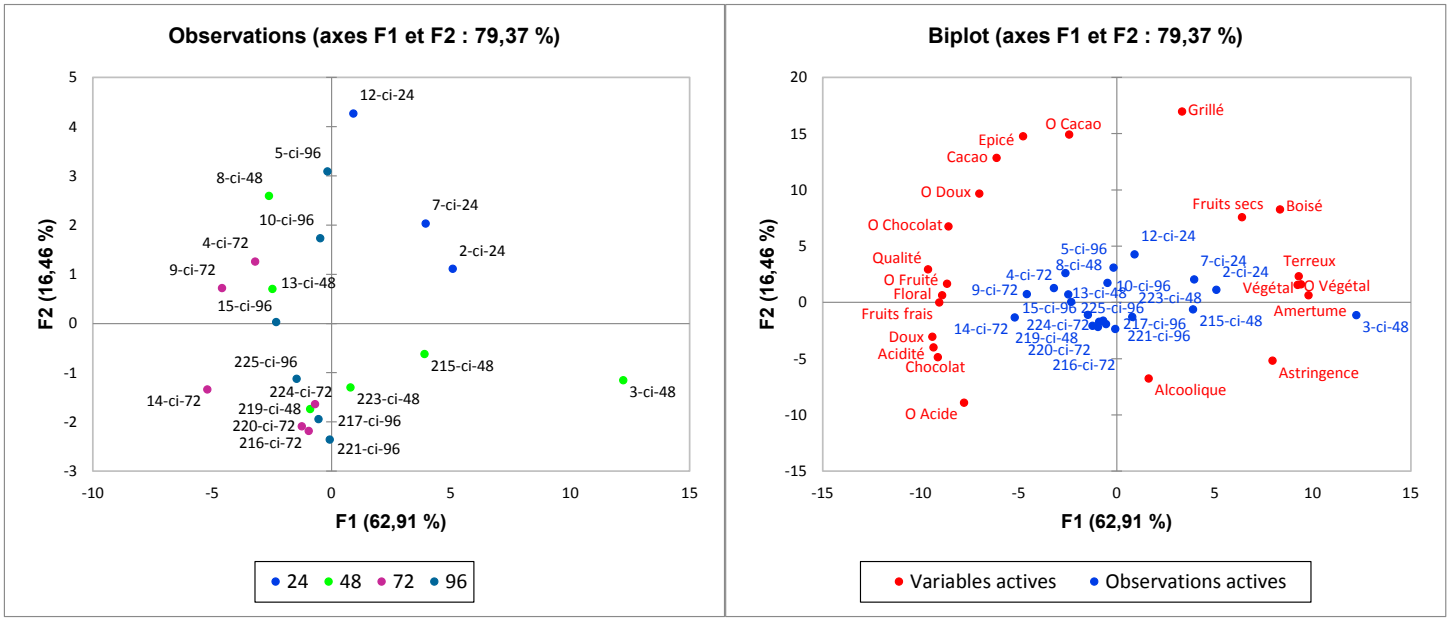


Figure 17. ACP des 21 liqueurs de Criollo

La Figure 17 montre une dispersion des échantillons de la campagne 10/2015 qui sont situés au-dessus de l'axe F1 à l'exception des échantillons 3-ci-48 et 14-ci-72. Les échantillons de la campagne 01/2015 situés en dessous de l'axe F1 sont bien regroupés.

D'après le biplot de la Figure 17, les échantillons fermentés 24 h sont caractérisés par les descripteurs O Végétal, Végétal, Terreux, Boisé, Fruits secs et Grillé. Les échantillons fermentés 72 h sont proches des descripteurs O Fruité, Floral, Fruits frais, Doux, Chocolat et Acidité.

- ***Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)***

La PLS permet d'extraire l'information utile et pertinente d'un ensemble de données pour lesquelles les méthodes classiques sont inopérantes du fait d'un déséquilibre du fichier (plus de colonnes que de lignes, nombre important de données manquantes, redondance significative entre les variables exogènes). Le but est l'exploration (évaluation de la structure de corrélation, présence de groupes, d'individus atypiques, …) et la modélisation (pouvoir prédire et anticiper le comportement d'un processus industriel ou transactionnel).

La Figure 18 représente une PLS-DA réalisée avec les notes attribuées aux 22 descripteurs sensoriels associées aux échantillons de Criollo à différents temps de fermentation.

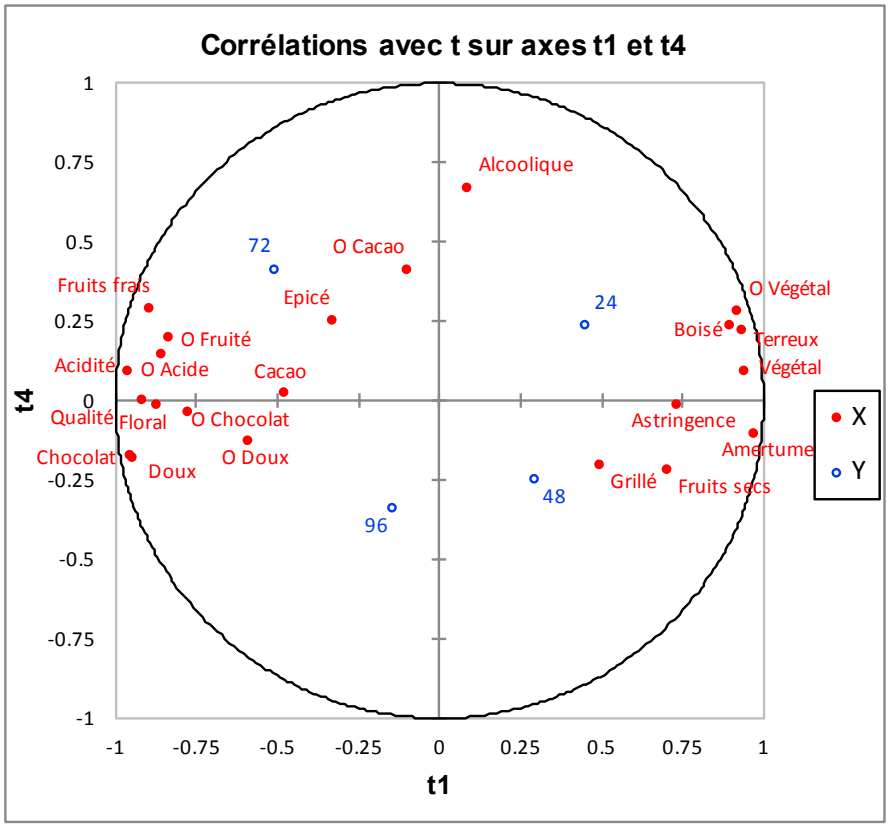


Figure 18. PLS-DA des 22 descripteurs sensoriels des 21 échantillons de Criollo

La Figure 18 montre que les échantillons peu fermentés à droite de l'axe t4 (24 h et 48 h) sont bien séparés des échantillons fermentés à gauche de l'axe t4 (72 h et 96 h). Les échantillons fermentés 24 h sont caractérisés par des goûts de Boisé, de Terreux et de Végétal (goût et odeur) tandis que ceux de 48 h plutôt par des goûts astringent, amer, Grillé et Fruits secs. Concernant les échantillons fermentés 72 h et 96 h, ils sont caractérisés par des descripteurs plaisants : Fruits frais, Acidité, Cacao, Chocolat, Doux et Floral. On peut noter que ces descripteurs sont plus proches des échantillons de 72 h que ceux caractérisant les échantillons fermentés pendant 96 h.

1. 2. Evolution de la composition volatile

Afin de mettre en évidence une variabilité selon les variétés et les temps de fermentation, les composés aromatiques identifiés sont quantifiés sur la colonne polaire à l'aide d'un étalon interne (butan-1-ol).

Le Tableau XXX indique les moyennes des teneurs des composés des 2 campagnes pour la variété Criollo et par temps de fermentation (exprimées en ppm) soit 27 échantillons. Parmi les 27 échantillons de Criollo, il y a : 6 échantillons fermentés 0 h, 3 fermentés 24 h, 6 fermentés 48 h, 6 fermentés 72 h et 6 fermentés 96 h.

Tableau XXX. *Moyenne des concentrations des composés volatils des 27 échantillons de cacao torréfié de Criollo (ppm)*

Classe	Nom des composés	Criollo				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Ester	Acétate de méthyle	3 ± 1	110 ± 75	24 ± 27	24 ± 12	16 ± 5
	Acétate d'éthyle	2 ± 1	159 ± 21	128 ± 135	75 ± 63	16 ± 11
	Acétate de 3-méthylbutyle	11 ± 8	32 ± 3	31 ± 14	29 ± 13	17 ± 10
	Hexanoate d'éthyle	tr	1 ± tr	1 ± tr	1 ± tr	tr
	Acétate d'heptan-2-ol	tr	tr	1 ± 1	2 ± 1	1 ± tr
	Diacétate de butane-2,3-diol	-	1 ± tr	tr	tr	tr
	Octanoate d'éthyle	tr	tr	1 ± tr	1 ± 1	tr
	Diacétate de propane-1,3-diol	tr	tr	2 ± 1	12 ± 10	3 ± 3
	Acétate d'éthylphényle	tr	2 ± tr	3 ± 2	3 ± tr	2 ± tr
	Acétate de 2-phényléthyle	3 ± 2	26 ± 11	30 ± 23	41 ± 15	26 ± 7
	Acétate de butyle	tr	tr	tr	tr	tr
Acide	Acide acétique	19 ± 12	96 ± 23	106 ± 67	136 ± 74	127 ± 27
	Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	tr	2 ± tr	3 ± 2	10 ± 6	25 ± 13
	Acide 3-méthylbutanoïque	2 ± 2	9 ± 2	18 ± 11	32 ± 8	51 ± 13
	Acide hexanoïque	tr	tr	tr	2 ± tr	1 ± tr
Alcool	Pentan-2-ol	6 ± 2	6 ± 3	8 ± 8	4 ± 4	2 ± tr
	Éthanol	tr	1 ± tr	2 ± 1	8 ± 5	9 ± 4
	3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	4 ± 2	10 ± 2	4 ± 2	1 ± tr	tr
	Heptan-2-ol	2 ± 1	tr	1 ± tr	tr	tr
	Alcool benzylique	tr	1 ± tr	1 ± tr	1 ± tr	1 ± tr
	2-phényléthanol	13 ± 3	30 ± 12	27 ± 13	15 ± 13	11 ± 11
Pyrazine	2,5-diméthylpyrazine	tr	5 ± 1	5 ± 2	6 ± 1	8 ± 3
	2,6-diméthylpyrazine	tr	2 ± tr	3 ± 1	3 ± tr	5 ± 2
	2,3-diméthylpyrazine	tr	4 ± 1	4 ± 2	6 ± tr	6 ± 1
	2-éthyl-6-méthylpyrazine	tr	1 ± tr	2 ± 1	2 ± tr	3 ± 1
	2,3,5-triméthylpyrazine	tr	24 ± 11	35 ± 20	57 ± 9	45 ± 12
	3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine	tr	5 ± tr	6 ± 3	6 ± 1	8 ± 4
	Tétraméthylpyrazine	2 ± 1	73 ± 42	219 ± 136	428 ± 182	226 ± 88
	6-éthyl-2,3,5-triméthylpyrazine	tr	4 ± 2	9 ± 7	13 ± 3	12 ± 7
Aldéhyde	3-méthylbutanal	1 ± 1	6 ± tr	11 ± 6	15 ± 4	15 ± 3
	Benzaldéhyde	6 ± 5	35 ± 7	43 ± 22	45 ± 4	46 ± 3
	5-méthyl-2-phénylhex-2-énal	tr	tr	tr	tr	tr
	2-méthylbutanal	17± 9	15 ± tr	14 ± 6	15 ± 6	14 ± 8
	2-isopropyl-5-méthylhex-2-énal	1 ± tr	1 ± tr	tr	tr	tr
Cétone	Heptan-2-one	2 ± 2	2 ± tr	3 ± 2	3 ± tr	3 ± 1
	Acétoïne (3-hydroxybutanone)	tr	8 ± 3	9 ± 6	12 ± 4	6 ± 3
	Nonan-2-one	tr	tr	tr	1 ± tr	1 ± tr
	Acétophénone (1-phényléthanone)	tr	2 ± tr	2 ± tr	3 ± tr	3 ± tr
Lactone	Butyrolactone	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr
Hétérocycle	2-acétylpyrrole	2 ± tr	8 ± 2	15 ± 8	21 ± 4	16 ± 3
	2-formyl-1-méthylpyrrole	tr	tr	tr	tr	tr
	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one	tr	4 ± 1	3 ± 3	5 ± 3	4 ± 3

tr : traces (< 1 ppm)

Au cours de la fermentation, il y a une augmentation des teneurs de la majeure partie des composés volatils et cela après 24 h de fermentation.

Les esters à l'exception des diesters et de l'acétate de butyle voient leurs concentrations 3 (pour l'acétate de 3-méthylbutyle) à 65 fois (pour l'acétate d'éthyle) plus importantes après 24 h de

fermentation. Ces teneurs sont relativement stables dans les échantillons fermentés après 48 h ou 72 h expliquant ainsi l'odeur fruitée de certains Criollo (échantillons 13-ci-48, 4-ci-72).
Les pyrazines responsables de la note grillée telles la 2,5-diméthylpyrazine, la 2,6-diméthylpyrazine, la 2-éthyl-6-méthylpyrazine, la 3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine, la 6-éthyl-2,3,5-triméthylpyrazine, sont présentes dans les fèves fermentées 24 h et leurs teneurs restent constantes dans les fèves fermentées 96 h. Ces résultats sont en accord avec l'évaluation sensorielle (note grillée caractéristique des fèves 24-48 h puis contribution de ces composés à la note chocolat, cacao).
Certains composés importants dans la caractérisation sensorielle des cacaos de Madagascar (note cacao, chocolat, acide) sont en concentration importante en fin de fermentation (72 h et 96 h) à l'image de la tétraméthylpyrazine, l'acide acétique, l'acide 3-méthylbutanoïque.

- ***Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)***

Pour le traitement des données en PLS-DA, la liste des molécules retenues (Tableau XXXI) est constituée par les composés dont la teneur est supérieure à 5 ppm au moins une fois dans un échantillon parmi les 99 échantillons. Les noms de ces 33 composés volatils sont reportés dans le Tableau XXXI.

Tableau XXXI. *Liste des 33 composés volatils retenus*

Classe	Nom des composés	Code
Ester	Acétate de méthyle	Est1
	Acétate d'éthyle	Est2
	Acétate de 3-méthylbutyle	Est3
	Acétate d'heptan-2-ol	Est5
	Octanoate d'éthyle	Est7
	Diacétate de propane-1,3-diol	Est8
	Acétate d'éthylphényle	Est9
	Acétate de 2-phényléthyle	Est10
Acide	Acide acétique	Aci1
	Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	Aci2
	Acide 3-méthylbutanoïque	Aci3
Alcool	Pentan-2-ol	Alc1
	Éthanol	Alc2
	3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	Alc3
	Heptan-2-ol	Alc4
	2-phényléthanol	Alc6
Pyrazine	2,5-diméthylpyrazine	Pyr1
	2,6-diméthylpyrazine	Pyr2
	2,3-diméthylpyrazine	Pyr3
	2,3,5-triméthylpyrazine	Pyr5
	3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine	Pyr6
	Tétraméthylpyrazine	Pyr7
	6-éthyl-2,3,5-triméthylpyrazine	Pyr8
Aldéhyde	3-méthylbutanal	Ald1
	Benzaldéhyde	Ald2
	2-méthylbutanal	Ald4
Cétone	Heptan-2-one	Cét1
	Acétoïne (3-hydroxybutanone)	Cét2
	Nonan-2-one	Cét3
	Acétophénone (1-phényléthanone)	Cét4
Lactone	Butyrolactone	Lac
Hétérocycle	2-acétylpyrrole	Hét1
	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one	Hét3

La Figure 19 représente une PLS-DA réalisée avec les teneurs des 33 composés volatils afin de caractériser les échantillons par temps de fermentation.

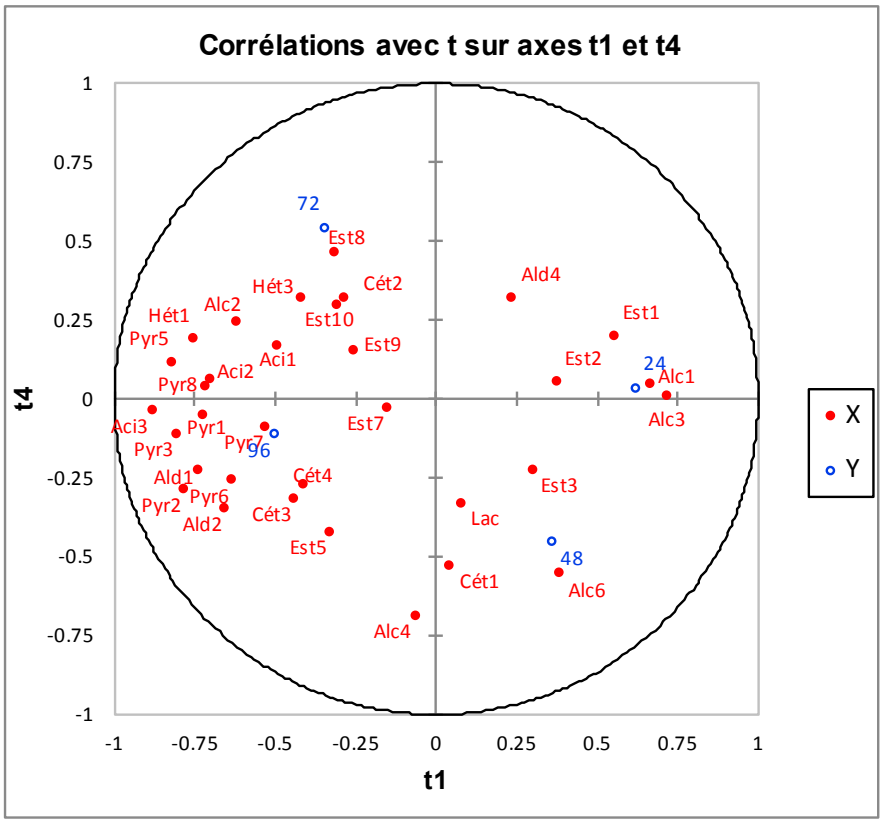


Figure 19. PLS-DA des 33 composés volatils des 21 échantillons de Criollo

L'observation de la Figure 19 montre que les échantillons peu fermentés à droite de l'axe t4 (24 h et 48 h) sont bien séparés des échantillons fermentés à gauche de l'axe (72 h et 96 h). Les échantillons peu fermentés sont caractérisés par des alcools : les 24 h par le pentan-2-ol et l'alcool isoamylique (Alc1 et Alc3 respectivement) ; les 48 h par le 2-phényléthanol (Alc6). En effet, au début de la fermentation se déroule une fermentation alcoolique. Les échantillons fermentés 72 h sont caractérisés par des esters et plus particulièrement le diacétate de propane-1,3-diol (Est8). Les échantillons fermentés 96 h sont caractérisés par des pyrazines et plus particulièrement le tétraméthylpyrazine (Pyr7).

2. Les Trinitario à casse Claire

2. 1. Evolution sensorielle

Parmi les 30 échantillons analysés, il y a : 3 échantillons fermentés 24 h, 6 fermentés 48 h, 3 fermentés 72 h, 6 fermentés 96 h, 6 fermentés 120 h et 6 fermentés 144 h.

- ***Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)***

Une CAH est effectuée sur les 30 échantillons de Trinitario à casse Claire (Figure 20).

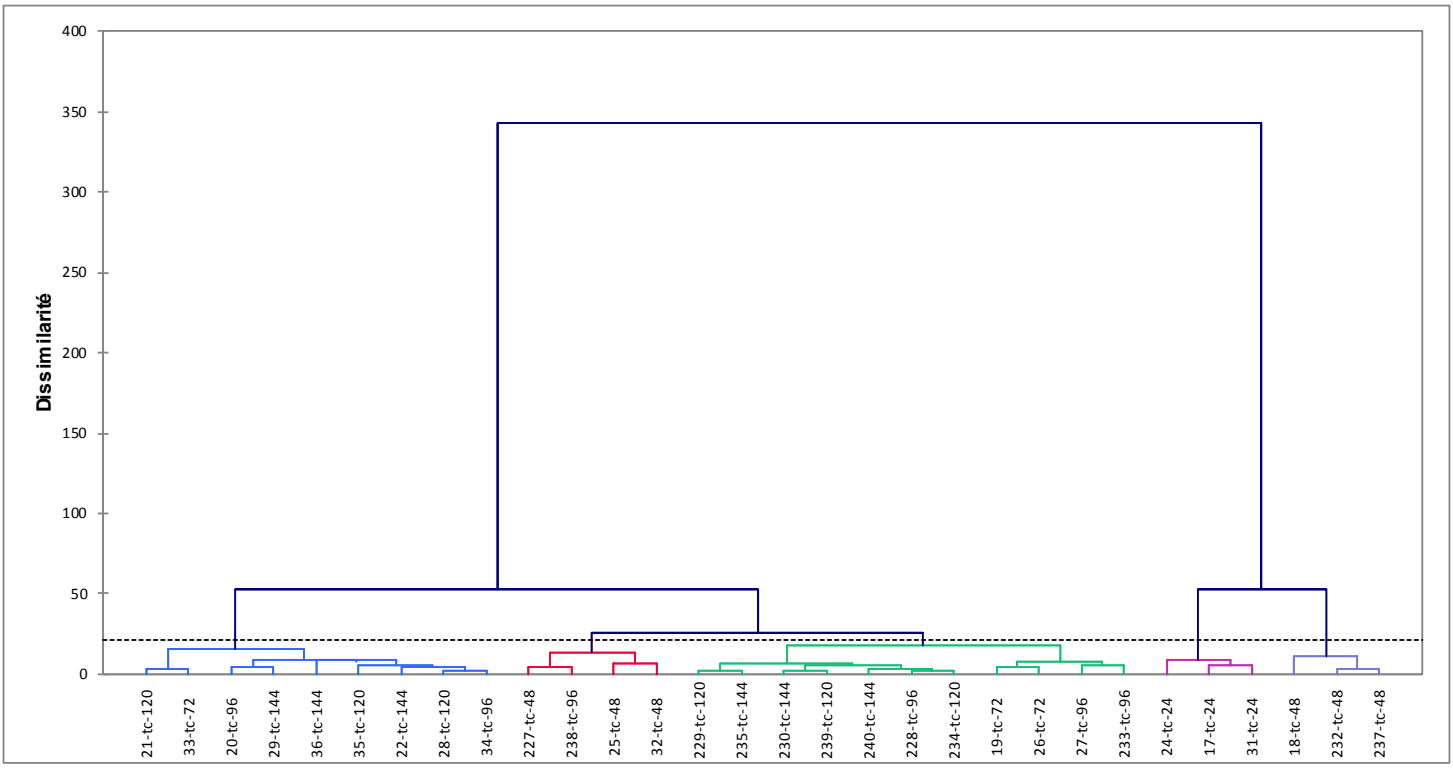


Figure 20. Dendogramme des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire selon la CAH

La Figure 20 montre une classification des échantillons selon le temps de fermentation. 5 groupes apparaissent : les 3 échantillons fermentés 24 h (en violet), un groupe comprenant 3 échantillons fermentés 48 h sauf l'échantillon 238-tc-96 (en rouge), un autre groupe comprenant 3 échantillons fermentés 48 h (en bleu clair, tout à droite), un groupe comprenant les échantillons de la campagne 10/2015 fermentés 72 h à 144 h (en bleu foncé, tout à gauche) et enfin un groupe composé majoritairement des échantillons de la campagne 01/2015 fermentés

96 h à 144 h avec un échantillon de la campagne 01/2015 fermentés 96 h et 2 fermentés 72 h (en vert). Des différences inter campagne ainsi qu'une meilleure répartition des échantillons selon les temps de fermentation sont ainsi mises en évidence par rapport à la classification ascendante hiérarchique des Criollo.

La Figure 21 représente la moyenne des notes des échantillons de Trinitario à casse Claire regroupés par classe pour chaque descripteur.

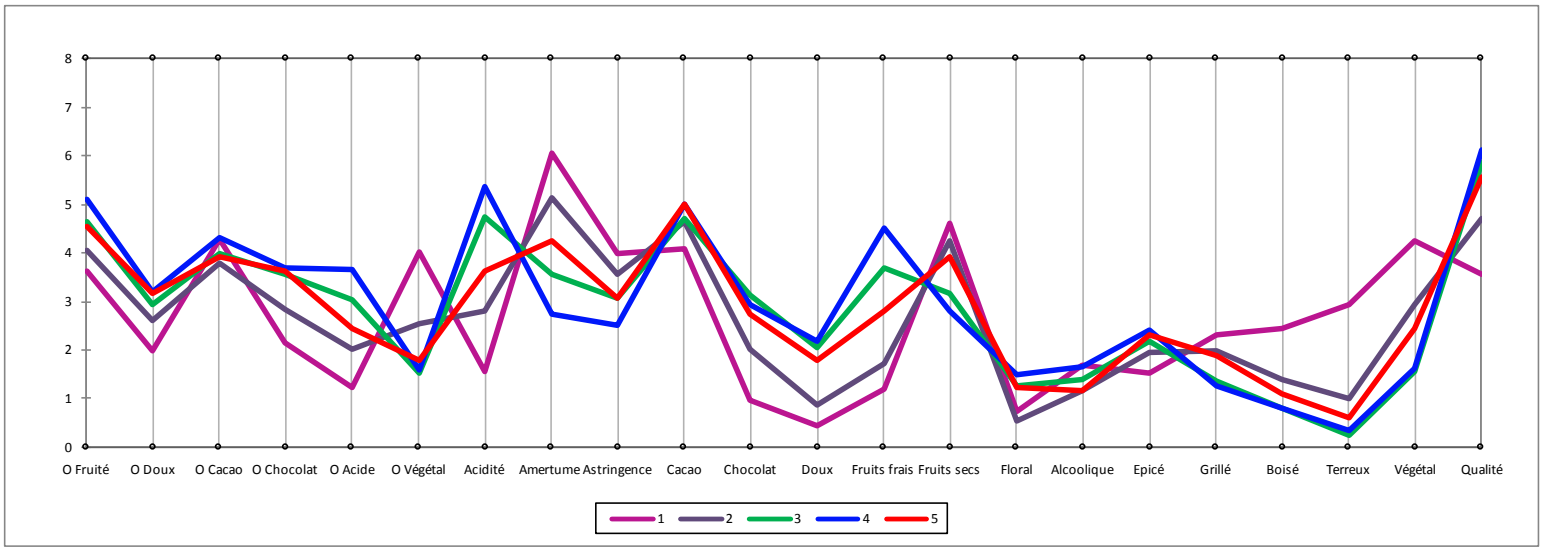


Figure 21. Profil des classes des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire selon la CAH

Selon les Figures 20 et 21, le groupe des échantillons fermenté 24 h (classe 1) est caractérisé par une note olfactive O Végétal et par des descripteurs en bouche (Amertume, Astringence, Boisé, Terreux et Végétal) plus prononcés que pour les autres échantillons. Les notes Chocolat et acide aussi bien olfactivement que gustativement sont inférieures aux autres échantillons plus fermentés. Le groupe des échantillons de la campagne 10/2015 (en bleu foncé) se différencie par une note plus acide (odeur et goût) et plus fruitée (goût Fruits frais) mais une moins grande amertume et astringence que ceux de la campagne 01/2015 (en vert).

- **Analyse en Composantes Principales (ACP)**

Une ACP est réalisée sur les 30 échantillons de Trinitario à casse Claire (Figure 22).

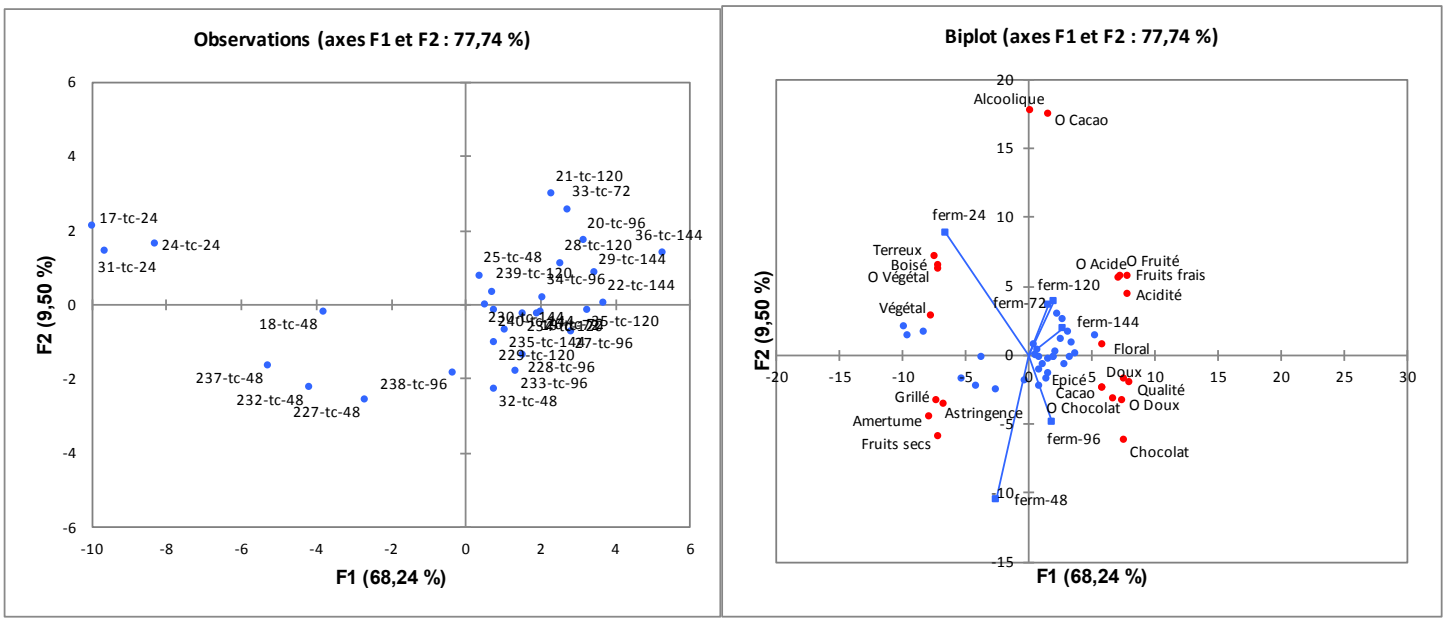


Figure 22. ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire

La Figure 22 montre 3 groupes distincts : d'un côté les 3 échantillons fermentés 24 h, au milieu une partie des échantillons fermentés 48 h et à droite les échantillons fermentés 72 h, 96 h, 120 h et 144 h. L'axe F1 discrimine les échantillons selon le temps de fermentation.

D'après le biplot de la Figure 22, les échantillons fermentés 24 h sont caractérisés par les descripteurs O Végétal, Terreux et Boisé. Les 4 échantillons fermentés 48 h au milieu sont caractérisés par les descripteurs Grillé, Astringence, Amertume et Fruits secs. Les échantillons de droite sont caractérisés par les descripteurs O Acide, O Fruité, Fruits frais, Acidité, Floral, Doux, Epicé, Cacao, O Chocolat, Chocolat, O Doux et Qualité. Plus spécifiquement, les échantillons fermentés 72 h et 120 h sont caractérisés par les descripteurs O Acide, O Fruité, Fruits frais et Acidité ; ceux fermentés 96 h par les descripteurs Doux, Epicé, Cacao, O Chocolat, Chocolat, O Doux et Qualité ; ceux fermentés 144 h par le descripteur Floral.

Le Tableau XXXII est la matrice de corrélation de Pearson des 30 échantillons de Trinitario à casse Claire. La matrice de Pearson associée à l'ACP met en évidence les corrélations entre les 22 descripteurs sensoriels entre eux mais aussi suivant le temps de fermentation. Les valeurs en rouge signifient que les deux variables sont fortement corrélées positivement entre elles (≥ 0,70) tandis que celles en bleu sont fortement corrélées négativement entre elles (≤ - 0,70).

Tableau XXXII. *Matrice de corrélation de Pearson issue de l'ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire*

Variables	O Fr	O Do	O kko	O Choc	O Aci	O Vég	Aci	Ame	Ast	Kko	Choc	Doux	Fr F	Fr S	Flo	Alc	Epi	Gri	Boi	Ter	Vég	Qlt	ferm-24	ferm-48	ferm-72	ferm-96	ferm-120	ferm-144
O Fruité	**1,00**	0,75	0,35	0,78	0,89	-0,69	0,86	-0,87	-0,73	0,58	0,69	0,76	0,85	-0,77	0,50	0,15	0,64	-0,76	-0,65	-0,67	-0,70	0,76	-0,64	-0,29	0,29	0,17	0,19	0,20
O Doux	0,75	**1,00**	0,06	0,90	0,62	-0,80	0,65	-0,72	-0,62	0,56	0,69	0,73	0,69	-0,60	0,59	-0,07	0,51	-0,68	-0,71	-0,72	-0,69	0,73	-0,76	-0,02	0,19	0,04	0,20	0,21
O Cacao	0,35	0,06	**1,00**	0,08	0,27	0,02	0,26	-0,28	-0,32	0,20	-0,05	0,06	0,39	-0,28	0,10	0,40	0,22	-0,17	0,20	0,11	-0,08	0,14	0,20	-0,29	0,23	-0,06	-0,04	0,07
O Chocolat	0,78	0,90	0,08	**1,00**	0,72	-0,89	0,78	-0,78	-0,66	0,65	0,81	0,80	0,78	-0,70	0,56	-0,09	0,61	-0,74	-0,77	-0,82	-0,82	0,82	-0,79	-0,15	0,28	0,10	0,18	0,24
O Acide	0,89	0,62	0,27	0,72	**1,00**	-0,72	0,91	-0,89	-0,65	0,48	0,67	0,72	0,82	-0,85	0,47	0,19	0,57	-0,83	-0,69	-0,72	-0,74	0,75	-0,65	-0,40	0,24	0,21	0,28	0,22
O Végétal	-0,69	-0,80	0,02	-0,89	-0,72	**1,00**	-0,77	0,79	0,55	-0,52	-0,82	-0,75	-0,74	0,75	-0,51	0,25	-0,58	0,73	0,83	0,89	0,86	-0,82	0,84	0,17	-0,30	-0,26	-0,11	-0,21
Acidité	0,86	0,65	0,26	0,78	0,91	-0,77	**1,00**	-0,95	-0,75	0,57	0,81	0,79	0,93	-0,90	0,58	0,18	0,63	-0,89	-0,79	-0,82	-0,85	0,87	-0,71	-0,42	0,25	0,16	0,32	0,28
Amertume	-0,87	-0,72	-0,28	-0,78	-0,89	0,79	-0,95	**1,00**	0,78	-0,59	-0,78	-0,84	-0,95	0,89	-0,64	-0,15	-0,64	0,87	0,78	0,78	0,85	-0,89	0,69	0,40	-0,23	-0,18	-0,25	-0,31
Astringence	-0,73	-0,62	-0,32	-0,66	-0,65	0,55	-0,75	0,78	**1,00**	-0,72	-0,72	-0,76	-0,81	0,64	-0,56	-0,07	-0,63	0,68	0,62	0,63	0,64	-0,79	0,55	0,17	-0,10	-0,11	-0,10	-0,30
Cacao	0,58	0,56	0,20	0,65	0,48	-0,52	0,57	-0,59	-0,72	**1,00**	0,68	0,64	0,64	-0,42	0,47	-0,13	0,66	-0,39	-0,56	-0,61	-0,62	0,74	-0,61	0,07	-0,03	0,09	0,05	0,27
Chocolat	0,69	0,69	-0,05	0,81	0,67	-0,82	0,81	-0,78	-0,72	0,68	**1,00**	0,90	0,78	-0,67	0,66	-0,17	0,65	-0,76	-0,90	-0,92	-0,89	0,92	-0,81	-0,21	0,02	0,31	0,19	0,30
Doux	0,76	0,73	0,06	0,80	0,72	-0,75	0,79	-0,84	-0,76	0,64	0,90	**1,00**	0,81	-0,67	0,77	0,04	0,61	-0,77	-0,85	-0,81	-0,82	0,89	-0,69	-0,34	0,00	0,26	0,12	0,48
Fruits frais	0,85	0,69	0,39	0,78	0,82	-0,74	0,93	-0,95	-0,81	0,64	0,78	0,81	**1,00**	-0,92	0,68	0,16	0,67	-0,86	-0,72	-0,73	-0,86	0,90	-0,61	-0,46	0,27	0,17	0,25	0,28
Fruits secs	-0,77	-0,60	-0,28	-0,70	-0,85	0,75	-0,90	0,89	0,64	-0,42	-0,67	-0,67	-0,92	**1,00**	-0,56	-0,20	-0,50	0,89	0,69	0,69	0,83	-0,79	0,58	0,54	-0,35	-0,21	-0,33	-0,17
Floral	0,50	0,59	0,10	0,56	0,47	-0,51	0,58	-0,64	-0,56	0,47	0,66	0,77	0,68	-0,56	**1,00**	0,13	0,41	-0,60	-0,59	-0,53	-0,65	0,70	-0,39	-0,40	-0,07	0,16	0,29	0,30
Alcoolique	0,15	-0,07	0,40	-0,09	0,19	0,25	0,18	-0,15	-0,07	-0,13	-0,17	0,04	0,16	-0,20	0,13	**1,00**	-0,27	-0,12	0,06	0,19	0,08	-0,07	0,27	-0,46	-0,06	-0,33	0,36	0,27
Epicé	0,64	0,51	0,22	0,61	0,57	-0,58	0,63	-0,64	-0,63	0,66	0,65	0,61	0,67	-0,50	0,41	-0,27	**1,00**	-0,48	-0,50	-0,63	-0,62	0,73	-0,56	0,00	0,15	0,22	-0,16	0,25
Grillé	-0,76	-0,68	-0,17	-0,74	-0,83	0,73	-0,89	0,87	0,68	-0,39	-0,76	-0,77	-0,86	0,89	-0,60	-0,12	-0,48	**1,00**	0,75	0,74	0,84	-0,80	0,65	0,45	-0,22	-0,15	-0,34	-0,28
Boisé	-0,65	-0,71	0,20	-0,77	-0,69	0,83	-0,79	0,78	0,62	-0,56	-0,90	-0,85	-0,72	0,69	-0,59	0,06	-0,50	0,75	**1.00**	0,93	0,85	-0,87	0,85	0,23	0,05	-0,27	-0,33	-0,31
Terreux	-0,67	-0,72	0,11	-0,82	-0,72	0,89	-0,82	0,78	0,63	-0,61	-0,92	-0,81	-0,73	0,69	-0,53	0,19	-0,63	0,74	0,93	**1,00**	0,88	-0,89	0,92	0,12	-0,12	-0,25	-0,22	-0,26
Végétal	-0,70	-0,69	-0,08	-0,82	-0,74	0,86	-0,85	0,85	0,64	-0,62	-0,89	-0,82	-0,86	0,83	-0,65	0,08	-0,62	0,84	0,85	0,88	**1,00**	-0,94	0,77	0,35	-0,20	-0,27	-0,26	-0,25
Qualité	0,76	0,73	0,14	0,82	0,75	-0,82	0,87	-0,89	-0,79	0,74	0,92	0,89	0,90	-0,79	0,70	-0,07	0,73	-0,80	-0,87	-0,89	-0,94	**1,00**	-0,79	-0,24	0,11	0,27	0,17	0,30
ferm-24	-0,64	-0,76	0,20	-0,79	-0,65	0,84	-0,71	0,69	0,55	-0,61	-0,81	-0,69	-0,61	0,58	-0,39	0,27	-0,56	0,65	0,85	0,92	0,77	-0,79	**1,00**	-0,17	-0,11	-0,17	-0,17	-0,17
ferm-48	-0,29	-0,02	-0,29	-0,15	-0,40	0,17	-0,42	0,40	0,17	0,07	-0,21	-0,34	-0,46	0,54	-0,40	-0,46	0,00	0,45	0,23	0,12	0,35	-0,24	-0,17	**1,00**	-0,17	-0,25	-0,25	-0,25
ferm-72	0,29	0,19	0,23	0,28	0,24	-0,30	0,25	-0,23	-0,10	-0,03	0,02	0,00	0,27	-0,35	-0,07	-0,06	0,15	-0,22	0,05	-0,12	-0,20	0,11	-0,11	-0,17	**1,00**	-0,17	-0,17	-0,17
ferm-96	0,17	0,04	-0,06	0,10	0,21	-0,26	0,16	-0,18	-0,11	0,09	0,31	0,26	0,17	-0,21	0,16	-0,33	0,22	-0,15	-0,27	-0,25	-0,27	0,27	-0,17	-0,25	-0,17	**1,00**	-0,25	-0,25
ferm-120	0,19	0,20	-0,04	0,18	0,28	-0,11	0,32	-0,25	-0,10	0,05	0,19	0,12	0,25	-0,33	0,29	0,36	-0,16	-0,34	-0,33	-0,22	-0,26	0,17	-0,17	-0,25	-0,17	-0,25	**1,00**	-0,25
ferm-144	0,20	0,21	0,07	0,24	0,22	-0,21	0,28	-0,31	-0,30	0,27	0,30	0,48	0,28	-0,17	0,30	0,27	0,25	-0,28	-0,31	-0,26	-0,25	0,30	-0,17	-0,25	-0,17	-0,25	-0,25	**1,00**

Ainsi le descripteur O Fruité est fortement corrélé positivement aux descripteurs O Doux, O Chocolat, O Acide, Acidité, Doux, Fruits frais, Qualité et négativement aux descripteurs Amertume, Astringence, Fruits secs, Grillé, Végétal.
Le descripteur O Végétal est fortement corrélé positivement aux descripteurs Amertume, Fruits secs, Grillé, Boisé, Terreux, Végétal et corrélé négativement aux descripteurs O Doux, O Chocolat, O Acide, Acidité, Chocolat, Doux, Fruits frais et Qualité.
Le descripteur O Végétal est corrélé positivement à la fermentation 24 h.
Le descripteur **Qualité** est **fortement corrélé positivement** aux descripteurs **O Fruité**, **O Doux**, **O Chocolat**, **O Acide**, **Acidité**, **Cacao**, **Chocolat**, **Doux**, **Fruits frais**, **Floral** et **Epicé**.
Le descripteur Qualité est **fortement corrélé négativement** aux descripteurs **O Végétal**, **Amertume**, **Astringence**, **Fruits secs**, **Grillé**, **Boisé**, **Terreux** et **Végétal**. De plus, le descripteur Qualité est **corrélé positivement** aux échantillons fermentés **144** h, **96** h et **120** h et négativement aux échantillons fermentés 24 h et 48 h. A partir de 96 h de fermentation, les cacaos Trinitario à casse Claire sont caractérisés par une fermentation de bonne qualité.

- ***Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)***

La Figure 23 représente une PLS-DA réalisée avec les notes attribuées aux 22 descripteurs sensoriels associées aux échantillons de Trinitario à casse Claire à différents temps de fermentation.

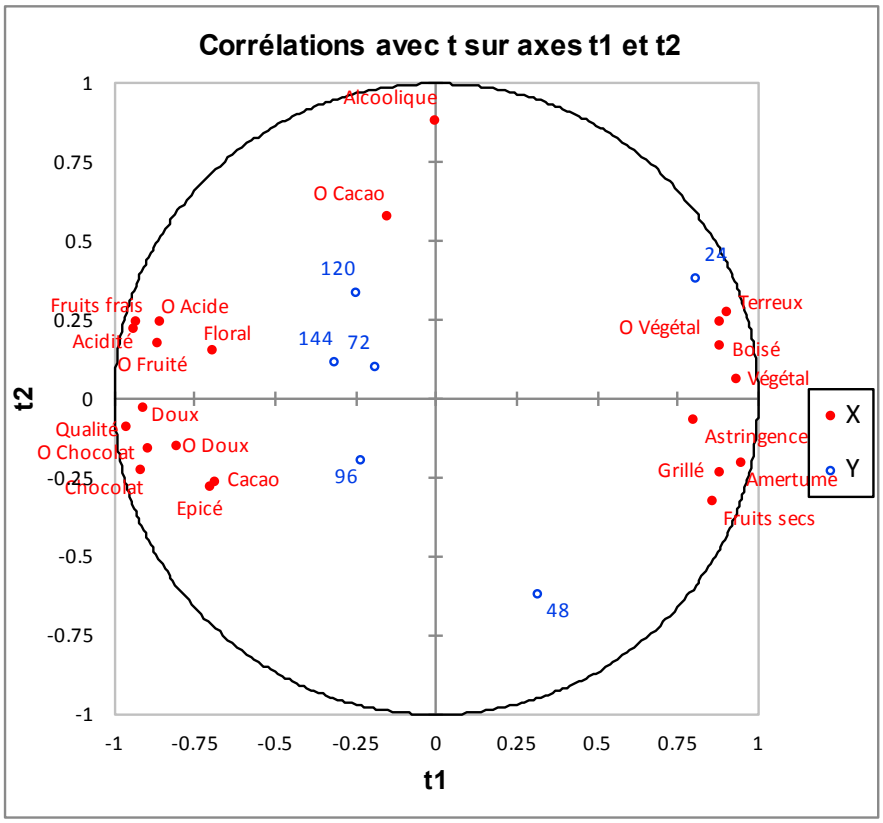


Figure 23. PLS-DA des 22 descripteurs des 30 échantillons de Trinitario à casse Claire

La Figure 23 montre que les échantillons peu fermentés à droite de l'axe t2 (24 h et 48 h) sont bien séparés des échantillons fermentés à gauche de l'axe t2 (72 h à 144 h). Concernant les descripteurs sensoriels on peut distinguer 2 groupes distincts : descripteurs déplaisants à droite (Végétal (odeur et goût), Terreux, Boisé, Astringence, Amertume, Grillé et Fruits secs) et des descripteurs plaisants à gauche (Fruits frais, Acidité (odeur et goût), Floral, O Fruité, Doux (odeur et goût), Chocolat (odeur et goût), Epicé et Cacao. Deux descripteurs ne caractérisent pas les échantillons : Alcoolique et O Cacao. Les échantillons fermentés 24 h sont plutôt caractérisés par les descripteurs déplaisants.

2. 2. Evolution de la composition volatile

Le Tableau XXXIII indique les moyennes des teneurs des composés des 2 campagnes pour la variété Trinitario à casse Claire et par temps de fermentation (exprimées en ppm) soit 36 échantillons au total. Parmi les 36 échantillons de Trinitario à casse Claire, il y a : 6 échantillons

fermentés 0 h, 3 fermentés 24 h, 6 fermentés 48 h, 3 fermentés 72 h, 6 fermentés 96 h, 6 fermentés 120 h et 6 fermentés 144 h.

Tableau XXXIII. *Moyenne des concentrations des composés volatils des 36 échantillons de cacao torréfié de Trinitario à casse Claire (ppm)*

Classe	Nom des composés	Trinitario à casse Claire						
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Ester	Acétate de méthyle	10 ± 9	5 ± tr	94 ± 127	206 ± 237	29 ± 12	30 ± 12	27 ± 9
	Acétate d'éthyle	36 ± 67	60 ± 16	178 ± 157	486 ± 185	352 ± 167	290 ± 200	122 ± 68
	Acétate de 3-méthylbutyle	19 ± 11	23 ± 10	42 ± 9	51 ± 7	52 ± 13	54 ± 10	48 ± 16
	Hexanoate d'éthyle	tr	1 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	3 ± tr	3 ± tr	2 ± tr
	Acétate d'heptan-2-ol	tr	tr	3 ± tr	3 ± tr	4 ± 2	5 ± 3	5 ± 3
	Diacétate de butane-2,3-diol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Octanoate d'éthyle	tr	tr	3 ± tr	3 ± tr	4 ± 2	4 ± 1	4 ± 1
	Diacétate de propane-1,3-diol	2 ± 2	tr	1 ± 1	18 ± 7	50 ± 33	73 ± 51	74 ± 64
	Acétate d'éthylphényle	tr	tr	2 ± tr	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 1	5 ± 1
	Acétate de 2-phényléthyle	9 ± 7	3 ± 2	19 ± 8	45 ± 18	44 ± 7	51 ± 6	48 ± 8
	Acétate de butyle	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Acide	Acide acétique	44 ± 45	21 ± 7	115 ± 50	178 ± 138	135 ± 117	73 ± 74	104 ± 74
	Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	2 ± 2	tr	3 ± 2	6 ± 2	5 ± 2	6 ± 2	10 ± 6
	Acide 3-méthylbutanoïque	6 ± 6	1 ± tr	14 ± 5	18 ± 3	18 ± 2	20 ± 2	29 ± 8
	Acide hexanoïque	tr	tr	tr	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	1 ± tr
Alcool	Pentan-2-ol	10 ± 6	23 ± 7	16 ± 9	13 ± tr	15 ± 5	14 ± 6	9 ± 5
	Éthanol	4 ± 5	tr	3 ± 2	2 ± 1	4 ± 4	3 ± 2	2 ± 2
	3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	6 ± 3	13 ± 2	6 ± 4	5 ± 1	4 ± 3	2 ± 2	1 ± tr
	Heptan-2-ol	2 ± 2	1 ± tr	4 ± 3	1 ± tr	2 ± 2	3 ± 2	3 ± 2
	Alcool benzylique	tr	tr	tr	tr	1 ± tr	tr	tr
	2-phényléthanol	20 ± 15	7 ± 6	10 ± 7	9 ± 6	13 ± 12	16 ± 8	15 ± 9
Pyrazine	2,5-diméthylpyrazine	2 ± tr	1 ± tr	4 ± tr	2 ± tr	4 ± 2	2 ± 1	3 ± tr
	2,6-diméthylpyrazine	1 ± tr	tr	2 ± tr	1 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr
	2,3-diméthylpyrazine	1 ± tr	tr	4 ± 2	4 ± tr	5 ± 2	4 ± 2	4 ± tr
	2-éthyl-6-méthylpyrazine	tr	tr	1 ± tr	1 ± tr	1 ± tr	1 ± tr	1 ± tr
	2,3,5-triméthylpyrazine	6 ± 10	2 ± 1	33 ± 15	51 ± 17	55 ± 14	50 ± 22	41 ± 6
	3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine	1 ± tr	1 ± tr	4 ± 2	5 ± 1	5 ± 2	4 ± 1	4 ± tr
	Tétraméthylpyrazine	25 ± 43	3 ± 3	187 ± 162	339 ± 81	497 ± 148	514 ± 248	367 ± 141
	6-éthyl-2,3,5-triméthylpyrazine	1 ± 2	tr	6 ± 4	16 ± 3	14 ± 4	16 ± 9	11 ± 3
Aldéhyde	3-méthylbutanal	4 ± 3	2 ± tr	9 ± 2	12 ± 2	13 ± 2	13 ± 2	15 ± 3
	Benzaldéhyde	10 ± 7	6 ± 4	32 ± 4	35 ± 9	51 ± 13	41 ± 6	41 ± 7
	5-méthyl-2-phénylhex-2-énal	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr
	2-méthylbutanal	14 ± 7	11 ± 6	16 ± 6	12 ± 6	15 ± 7	9 ± 6	14 ± 6
	2-isopropyl-5-méthylhex-2-énal	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Cétone	Heptan-2-one	4 ± 2	5 ± 2	8 ± 4	4 ± 1	5 ± 2	4 ± 1	4 ± 1
	Acétoïne (3-hydroxybutanone)	3 ± 4	1 ± tr	8 ± 3	15 ± 4	15 ± 4	10 ± 6	7 ± 2
	Nonan-2-one	tr	2 ± tr	4 ± 2	7 ± 3	3 ± 2	3 ± 2	3 ± 1
	Acétophénone (1-phényléthanone)	3 ± tr	3 ± tr	6 ± 1	7 ± 2	9 ± 2	8 ± 2	7 ± 3
Lactone	Butyrolactone	3 ± tr	1 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	3 ± tr	2 ± tr	2 ± tr
Hétérocycle	2-acétylpyrrole	4 ± 5	2 ± tr	12 ± 3	26 ± 8	25 ± 8	22 ± 7	17 ± 4
	2-formyl-1-méthylpyrrole	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one	tr	tr	2 ± tr	5 ± 3	7 ± 6	4 ± 4	2 ± tr

tr : traces (< 1 ppm)

L'analyse du Tableau XXXIII montre une biosynthèse plus lente des composés à l'image des esters et des acides, de la tétraméthylpyrazine. La cinétique de la synthèse de ces composés devient exponentielle uniquement après 48 h de fermentation à l'inverse des Criollo où cette synthèse devient significative après 24 h. En outre, les composés volatils notamment ceux qui contribuent notablement à la qualité sensorielle du cacao atteignent des concentrations du même ordre de grandeur que celui des Criollo après 120 h de fermentation. Ce suivi cinétique justifie

donc le procédé traditionnel de fermentation plus long pour les Trinitario à casse Claire que celui appliqué aux Criollo.

- **Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)**

La Figure 24 représente une PLS-DA réalisée avec les teneurs des 33 composés volatils afin de caractériser les échantillons par temps de fermentation.

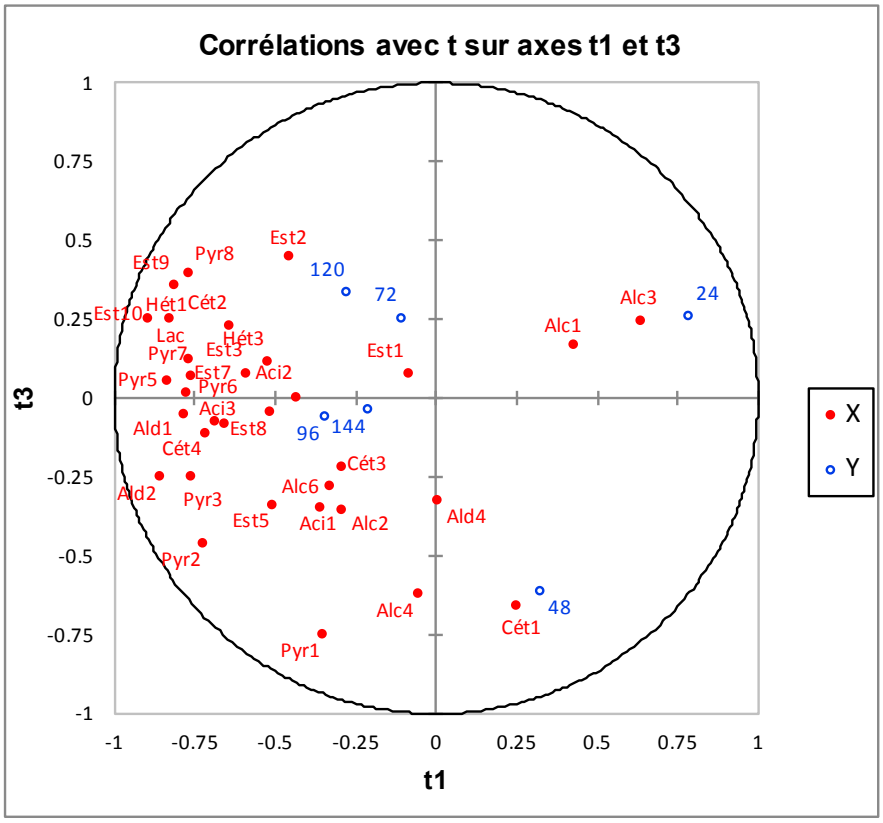


Figure 24. PLS-DA des 33 composés volatils des 30 échantillons de Trinitario à casse Claire

L'observation de la Figure 24 montre que les échantillons peu fermentés à droite de l'axe t3 (24 h et 48 h) sont bien séparés des échantillons fermentés à gauche de l'axe t3 (72 h à 144 h). Les échantillons fermentés 24 h sont caractérisés par des alcools : le pentan-2-ol et l'alcool isoamylique (Alc1 et Alc3 respectivement) comme ceux des Criollo fermentés 24 h ; tandis que les 48 h par l'heptan-2-one (Cét1). Les échantillons fermentés 72 h sont caractérisés par l'acétate de méthyle (Est1). Les échantillons fermentés 120 h sont caractérisés par l'acétate d'éthyle (Est2).

3. Les Trinitario à casse Foncée

3. 1. Evolution sensorielle

Parmi les 30 échantillons analysés, il y a : 3 échantillons fermentés 24 h, 6 fermentés 48 h, 3 fermentés 72 h, 6 fermentés 96 h, 6 fermentés 120 h et 6 fermentés 144 h.

- ***Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) et caractérisation de produits***

Une CAH est effectuée sur les 30 échantillons de Trinitario à casse Foncée (Figure 25).

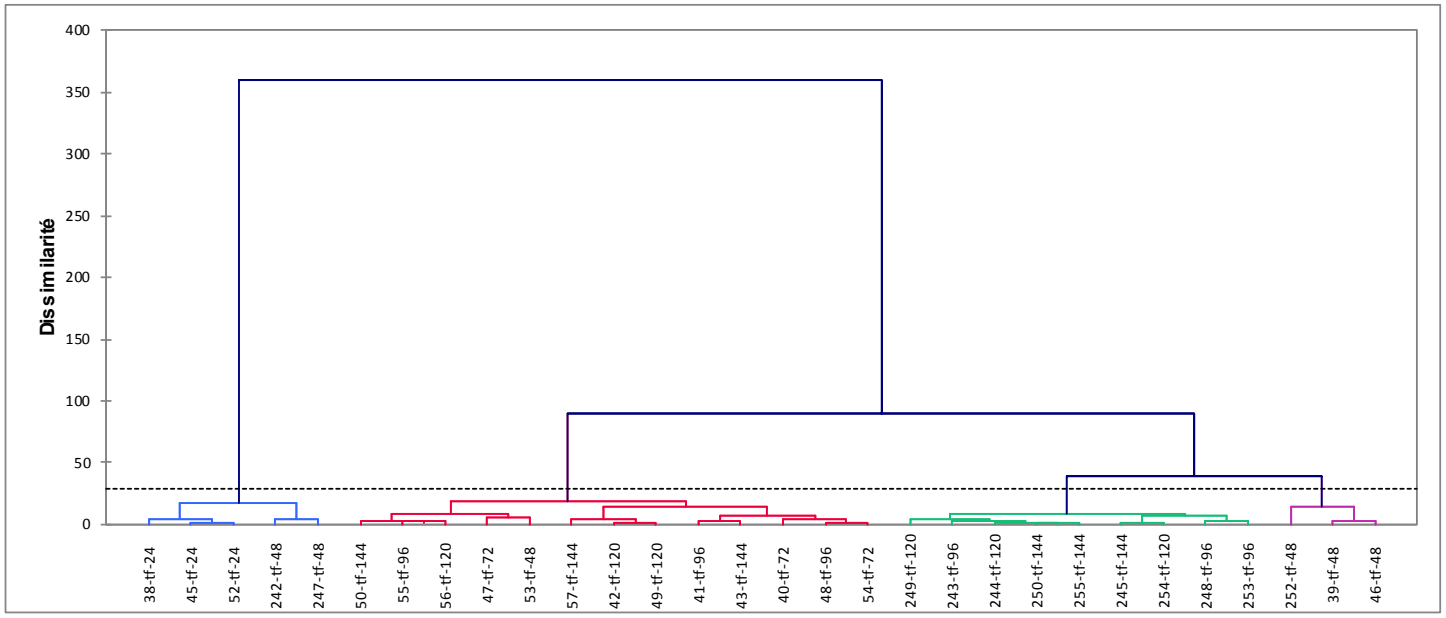


Figure 25. Dendogramme des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée selon la CAH

La Figure 25 montre la répartition des Trinitario à casse Foncée en 4 groupes : les 3 échantillons fermentés 24 h et 2 échantillons fermentés 48 h (en bleu), un groupe comprenant 3 échantillons fermentés 48 h (en violet), un groupe comprenant les échantillons de la campagne 10/2015 fermentés 72 h à 144 h sauf l'échantillon 53-tf-48 fermenté 48 h (en rouge) et enfin un groupe composé des échantillons de la campagne 01/2015 fermentés 96 h à 144 h (en vert).

La Figure 26 représente la moyenne des notes des échantillons de Trinitario à casse Foncée regroupés par classe pour chaque descripteur.

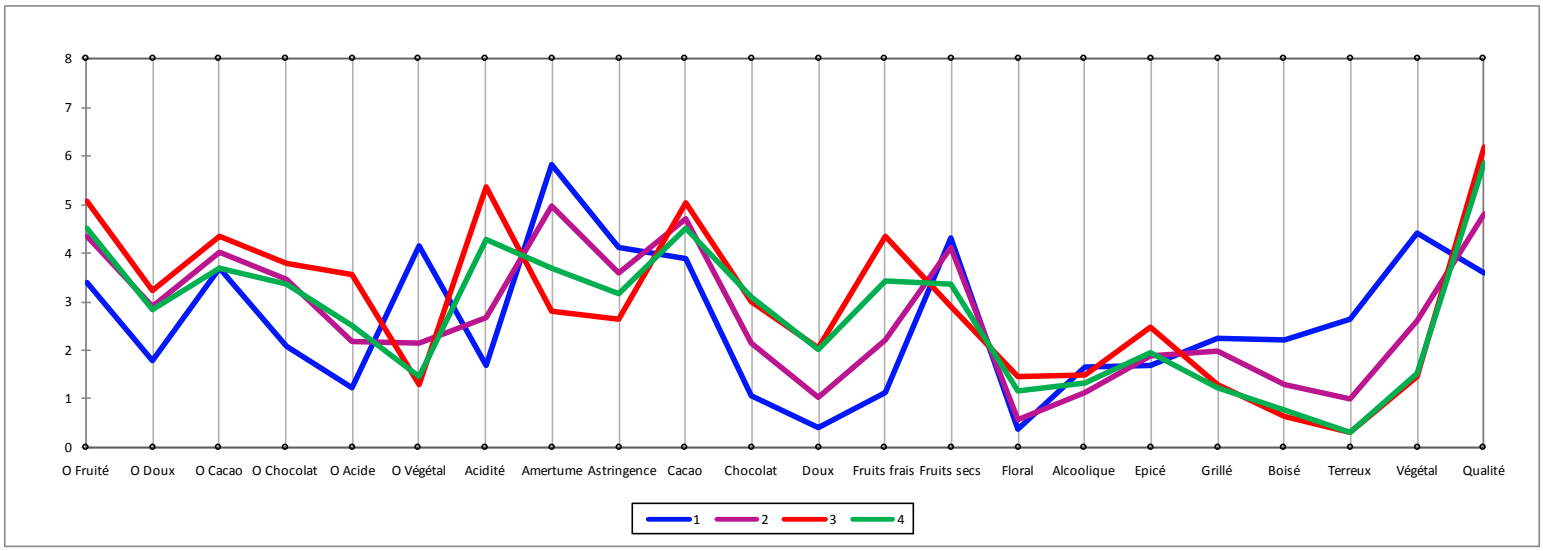


Figure 26. Profil des classes des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée selon la CAH

Selon les Figures 25 et 26, le groupe des échantillons fermenté 24 h et des 2 échantillons fermentés 48 h (classe 1 en bleu) est caractérisé par des notes plus élevées que celles des autres groupes des descripteurs : O Végétal, Amertume, Astringence, Boisé, Terreux et Végétal. Les caractères acide, doux, chocolat sont aussi moins marqués olfactivement et en bouche par rapport aux trois autres groupes. Contrairement aux Trinitario à casse Claire fermentés entre 72 h et 144 h où les profils sensoriels sont proches pour les deux campagnes de récolte, le groupe des échantillons fermentés entre 72 h et 144 h de la campagne 10/2015 (classe 3 en rouge) se démarque plus des échantillons fermentés entre 72 h et 144 h de la campagne 01/2015 par les descripteurs : O Fruité, O Doux, O Cacao, O Chocolat, O Acide, Acidité, Cacao, Fruits frais, Floral et Epicé.

Selon la caractérisation de produits (Figure 27), l'échantillon 53-tf-48 est corrélé positivement aux descripteurs Acidité, O Chocolat, O Doux, Cacao et Epicé ce qui peut expliquer son classement dans les cacaos bien fermentés.

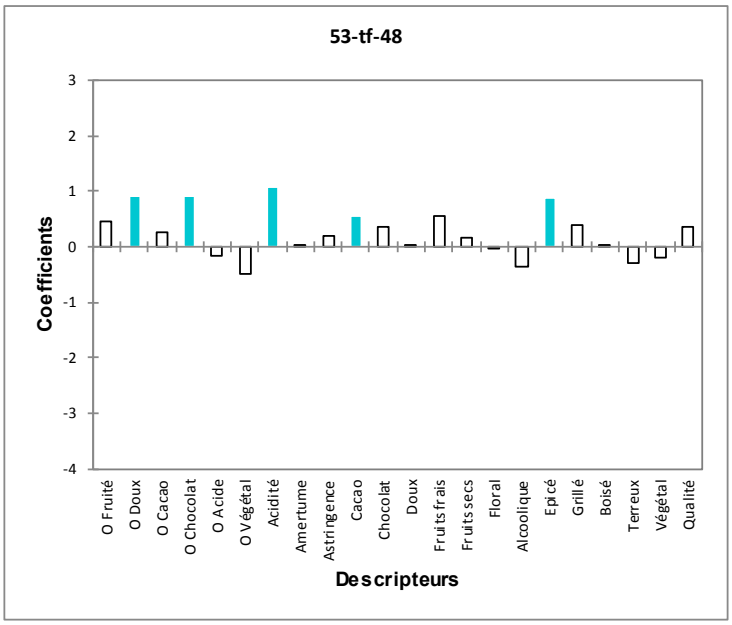


Figure 27. Caractérisation sensorielle du produit 53-tf-48

- ***Analyse en Composantes Principales (ACP)***

Une ACP est réalisée sur les 30 échantillons de Trinitario à casse Foncée (Figure 28).

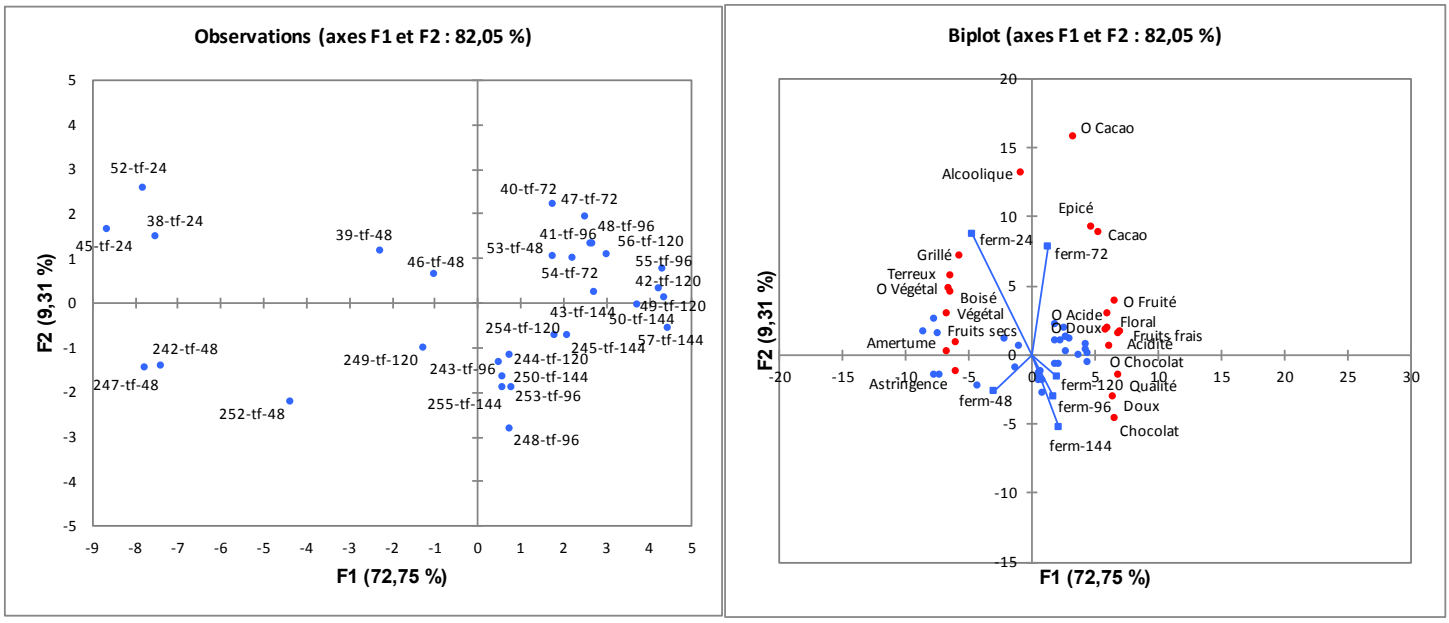


Figure 28. ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée

La Figure 28 montre que l'axe F1 sépare la campagne 01/2015 de celle 10/2015.

D'après le biplot de la Figure 28, les échantillons fermentés 24 h sont caractérisés par les descripteurs Grillé, Terreux, O Végétal et Boisé. Les échantillons fermentés 48 h sont

caractérisés par le descripteur Astringent. Les échantillons fermentés 72 h sont caractérisés par les descripteurs Epicé et Cacao. Les points moyens des échantillons fermentés 96, 120 et 144 h sont proches. Les échantillons fermentés 96 h sont plutôt caractérisés par les descripteurs Doux ; ceux de 120 h par O Fruité, O Acide, O Doux, Floral, Fruits frais, Acidité, O Chocolat ; et enfin ceux de 144 h par Chocolat. L'axe F2 sépare les échantillons fermentés 24 et 48 h des échantillons en fin de fermentation (72 h, 96 h, 120 h et 144 h).

Le Tableau XXXIV est la matrice de corrélation de Pearson des 30 échantillons de Trinitario à casse Foncée pour les 22 descripteurs et les temps de fermentation. Les valeurs en rouge signifient que les deux variables sont fortement corrélées positivement entre elles (≥ 0,70) tandis que celles en bleu sont fortement corrélées négativement entre elles (≤ - 0,70).

Tableau XXXIV. *Matrice de corrélation par Pearson issue de l'ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée*

Variables	O Fr	O Do	O kko	O Choc	O Aci	O Vég	Aci	Ame	Ast	Kko	Choc	Doux	Fr F	Fr S	Flo	Alc	Epi	Gri	Boi	Ter	Vég	Qlt	ferm-24	ferm-48	ferm-72	ferm-96	ferm-120	ferm-144
O Fruité	**1,00**	0,84	0,61	0,88	0,77	-0,83	0,88	-0,87	-0,78	0,81	0,80	0,76	0,90	-0,77	0,74	-0,09	0,67	-0,65	-0,79	-0,79	-0,83	0,87	-0,53	-0,36	0,23	0,12	0,28	0,18
O Doux	0,84	**1,00**	0,44	0,95	0,58	-0,79	0,76	-0,71	-0,64	0,77	0,73	0,76	0,74	-0,55	0,56	-0,24	0,64	-0,46	-0,72	-0,75	-0,74	0,80	-0,57	-0,16	0,20	0,11	0,14	0,19
O Cacao	0,61	0,44	**1,00**	0,45	0,50	-0,24	0,45	-0,43	-0,49	0,73	0,26	0,29	0,51	-0,31	0,44	0,33	0,63	-0,12	-0,23	-0,19	-0,32	0,39	0,13	-0,33	0,40	-0,04	0,10	-0,12
O Chocolat	0,88	0,95	0,45	**1,00**	0,62	-0,86	0,78	-0,75	-0,69	0,74	0,79	0,75	0,78	-0,62	0,62	-0,27	0,58	-0,56	-0,76	-0,80	-0,78	0,83	-0,62	-0,16	0,11	0,20	0,18	0,16
O Acide	0,77	0,58	0,50	0,62	**1,00**	-0,76	0,86	-0,87	-0,72	0,57	0,66	0,61	0,86	-0,86	0,75	0,07	0,59	-0,73	-0,76	-0,73	-0,75	0,73	-0,58	-0,35	0,26	0,15	0,31	0,13
O Végétal	-0,83	-0,79	-0,24	-0,86	-0,76	**1,00**	-0,87	0,88	0,74	-0,59	-0,92	-0,85	-0,89	0,82	-0,74	0,28	-0,50	0,83	0,93	0,96	0,95	-0,92	0,79	0,28	-0,05	-0,32	-0,23	-0,29
Acidité	0,88	0,76	0,45	0,78	0,86	-0,87	**1,00**	-0,96	-0,83	0,69	0,86	0,85	0,97	-0,88	0,88	0,01	0,70	-0,78	-0,89	-0,87	-0,89	0,93	-0,64	-0,45	0,22	0,18	0,27	0,31
Amertume	-0,87	-0,71	-0,43	-0,75	-0,87	0,88	-0,96	**1,00**	0,87	-0,65	-0,86	-0,87	-0,97	0,92	-0,85	0,10	-0,63	0,86	0,89	0,87	0,89	-0,93	0,63	0,51	-0,20	-0,24	-0,30	-0,29
Astringence	-0,78	-0,64	-0,49	-0,69	-0,72	0,74	-0,83	0,87	**1,00**	-0,69	-0,73	-0,81	-0,87	0,75	-0,69	0,12	-0,53	0,73	0,75	0,72	0,81	-0,86	0,43	0,49	0,02	-0,18	-0,26	-0,39
Cacao	0,81	0,77	0,73	0,74	0,57	-0,59	0,69	-0,65	-0,69	**1,00**	0,63	0,69	0,73	-0,46	0,60	0,00	0,69	-0,33	-0,55	-0,57	-0,67	0,74	-0,30	-0,29	0,31	0,16	0,12	0,00
Chocolat	0,80	0,73	0,26	0,79	0,66	-0,92	0,86	-0,86	-0,73	0,63	**1,00**	0,91	0,87	-0,73	0,79	-0,27	0,45	-0,80	-0,89	-0,94	-0,92	0,94	-0,70	-0,42	0,16	0,30	0,27	0,25
Doux	0,76	0,76	0,29	0,75	0,61	-0,85	0,85	-0,87	-0,81	0,69	0,91	**1,00**	0,87	-0,69	0,75	-0,22	0,50	-0,76	-0,85	-0,86	-0,90	0,96	-0,59	-0,52	0,15	0,29	0,21	0,35
Fruits frais	0,90	0,74	0,51	0,78	0,86	-0,89	0,97	-0,97	-0,87	0,73	0,87	0,87	**1,00**	-0,90	0,89	-0,01	0,66	-0,81	-0,90	-0,87	-0,92	0,94	-0,59	-0,49	0,17	0,25	0,27	0,27
Fruits secs	-0,77	-0,55	-0,31	-0,62	-0,86	0,82	-0,88	0,92	0,75	-0,46	-0,73	-0,69	-0,90	**1,00**	-0,82	-0,03	-0,50	0,83	0,81	0,78	0,81	-0,79	0,60	0,45	-0,05	-0,21	-0,36	-0,29
Floral	0,74	0,56	0,44	0,62	0,75	-0,74	0,88	-0,85	-0,69	0,60	0,79	0,75	0,89	-0,82	**1,00**	0,15	0,49	-0,72	-0,77	-0,75	-0,79	0,81	-0,47	-0,53	0,21	0,30	0,17	0,25
Alcoolique	-0,09	-0,24	0,33	-0,27	0,07	0,28	0,01	0,10	0,12	0,00	-0,27	-0,22	-0,01	-0,03	0,15	**1,00**	0,06	0,24	0,20	0,31	0,18	-0,19	0,39	-0,33	0,26	-0,02	-0,02	-0,11
Epicé	0,67	0,64	0,63	0,58	0,59	-0.50	0,70	-0,63	-0,53	0,69	0,45	0,50	0,66	-0,50	0,49	0,06	**1,00**	-0,37	-0,52	-0,50	-0,52	0,61	-0,32	-0,18	0,41	0,04	-0,03	0,11
Grillé	-0,65	-0,46	-0,12	-0,56	-0,73	0,83	-0,78	0,86	0,73	-0,33	-0,80	-0,76	-0,81	0,83	-0,72	0,24	-0,37	**1,00**	0,85	0,83	0,82	-0,80	0,60	0,53	0,03	-0,33	-0,26	-0,41
Boisé	-0,79	-0,72	-0,23	-0,76	-0,76	0,93	-0,89	0,89	0,75	-0,55	-0,89	-0,85	-0,90	0,81	-0,77	0,20	-0,52	0,85	**1,00**	0,96	0,92	-0,90	0,77	0,37	-0,17	-0,19	-0,25	-0,38
Terreux	-0,79	-0,75	-0,19	-0,80	-0,73	0,96	-0,87	0,87	0,72	-0,57	-0,94	-0,86	-0,87	0,78	-0,75	0,31	-0,5	0,83	0,96	**1,00**	0,94	-0,92	0,84	0,27	-0,13	-0,26	-0,24	-0,30
Végétal	-0,83	-0,74	-0,32	-0,78	-0,75	0,95	-0,89	0,89	0,81	-0,67	-0,92	-0,90	-0,92	0,81	-0,79	0,18	-0,52	0,82	0,92	0,94	**1,00**	-0,96	0,67	0,42	-0,05	-0,22	-0,31	-0,36
Qualité	0,87	0,8	0,39	0,83	0,73	-0,92	0,93	-0,93	-0,86	0,74	0,94	0,96	0,94	-0,79	0,81	-0,19	0,61	-0,80	-0,90	-0,92	-0,96	**1,00**	-0,64	-0,47	0,14	0,27	0,27	0,31
ferm-24	-0,53	-0,57	0,13	-0,62	-0,58	0,79	-0,64	0,63	0,43	-0,30	-0,70	-0,59	-0,59	0,60	-0,47	0,39	-0,32	0,60	0,77	0,84	0,67	-0,64	**1,00**	-0,17	-0,11	-0,17	-0,17	-0,17
ferm-48	-0,36	-0,16	-0,33	-0,16	-0,35	0,28	-0,45	0,51	0,49	-0,29	-0,42	-0,52	-0,49	0,45	-0,53	-0,33	-0,18	0,53	0,37	0,27	0,42	-0,47	-0,17	**1,00**	-0,17	-0,25	-0,25	-0,25
ferm-72	0,23	0,20	0,40	0,11	0,26	-0,05	0,22	-0,2	0,02	0,31	0,16	0,15	0,17	-0,05	0,21	0,26	0,41	0,03	-0,17	-0,13	-0,05	0,14	-0,11	-0,17	**1,00**	-0,17	-0,17	-0,17
ferm-96	0,12	0,11	-0,04	0,20	0,15	-0,32	0,18	-0,24	-0,18	0,16	0,30	0,29	0,25	-0,21	0,30	-0,02	0,04	-0,33	-0,19	-0,26	-0,22	0,27	-0,17	-0,25	-0,17	**1,00**	-0,25	-0,25
ferm-120	0,28	0,14	0,10	0,18	0,31	-0,23	0,27	-0,30	-0,26	0,12	0,27	0,21	0,27	-0,36	0,17	-0,02	-0,03	-0,26	-0,25	-0,24	-0,31	0,27	-0,17	-0,25	-0,17	-0,25	**1,00**	-0,25
ferm-144	0,18	0,19	-0,12	0,16	0,13	-0,29	0,31	-0,29	-0,39	0,00	0,25	0,35	0,27	-0,29	0,25	-0,11	0,11	-0,41	-0,38	-0,30	-0,36	0,31	-0,17	-0,25	-0,17	-0,25	-0,25	**1,00**

Le descripteur **Qualité** est **fortement corrélé positivement** aux descripteurs **O Fruité**, **O Doux**, **O Chocolat**, **O Acide**, **Acidité**, **Cacao**, **Chocolat**, **Doux**, **Fruits frais** et **Floral** c'est-à-dire des descripteurs à connotation positive. Le descripteur **Qualité** est **fortement corrélé négativement** aux descripteurs **O Végétal**, **Amertume**, **Astringence**, **Fruits secs**, **Grillé**, **Boisé**, **Terreux**, **Végétal** c'est-à-dire des descripteurs à connotation négative. De plus, le descripteur Qualité est corrélé négativement aux échantillons fermentés 24 h et 48 h ; et positivement aux échantillons fermentés 72 h, 96 h, 120 h et 144 h. Le coefficient de corrélation évolue de manière croissante entre les échantillons fermentés 24 h et ceux fermentés 144 h ce qui signifie que plus le temps de fermentation est long, meilleure sera la qualité globale du cacao.

- ***Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)***

La Figure 29 représente une PLS-DA réalisée avec les notes attribuées aux 22 descripteurs sensoriels associées aux échantillons de Trinitario à casse Foncée à différents temps de fermentation.

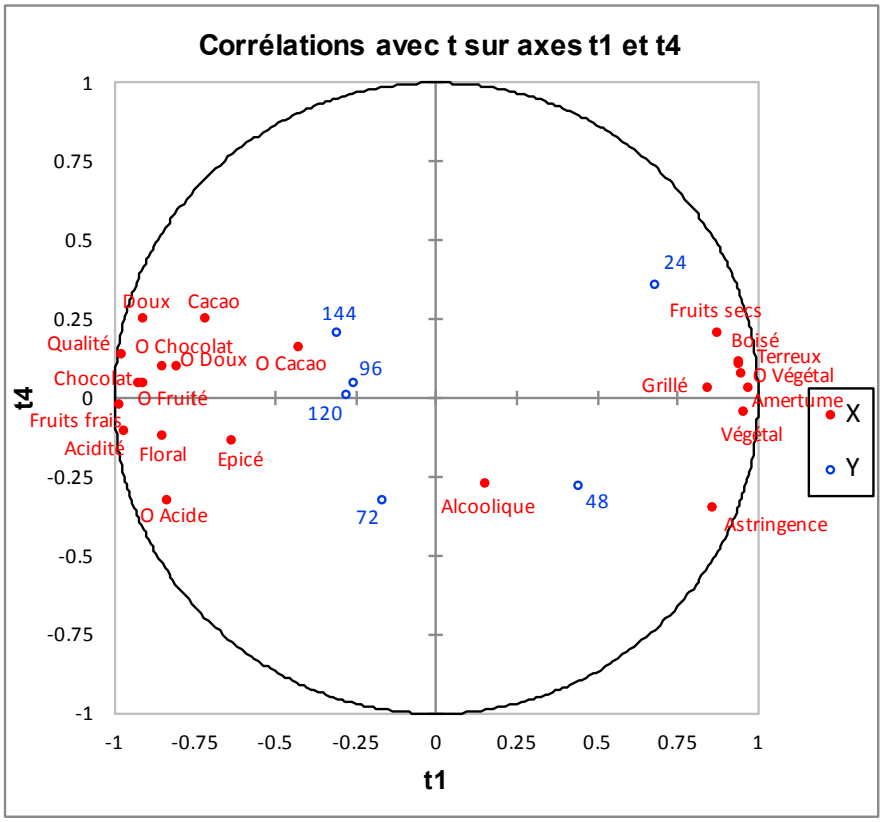


Figure 29. PLS-DA des 22 descripteurs des 30 échantillons de Trinitario à casse Foncée

La Figure 29 montre que les échantillons peu fermentés à droite de l'axe t4 (24 h et 48 h) sont bien séparés des échantillons fermentés à gauche de l'axe t4 (72 h à 144 h). Concernant les descripteurs sensoriels, on peut distinguer 2 groupes distincts : descripteurs déplaisants à droite (Végétal (odeur et goût), Terreux, Boisé, Astringence, Amertume, Grillé et Fruits secs) et des descripteurs plaisants à gauche (Fruits frais, Acidité (odeur et goût), Floral, O Fruité, Doux (odeur et goût), Chocolat (odeur et goût), Epicé et Cacao (odeur et goût)). Les échantillons fermentés 24 h sont plutôt caractérisés par les descripteurs déplaisants situés à droite du graphique tandis que ceux de 96 h, 120 h et 144 h sont plutôt caractérisés par les descripteurs plaisants situés à gauche.

3. 2. Evolution de la composition volatile

Le Tableau XXXV indique les moyennes des teneurs des composés des 2 campagnes pour la variété Trinitario à casse Foncée et par temps de fermentation (exprimées en ppm) soit 36 échantillons au total. Parmi les 36 échantillons de Trinitario à casse Foncée, il y a : 6 échantillons fermentés 0 h, 3 fermentés 24 h, 6 fermentés 48 h, 3 fermentés 72 h, 6 fermentés 96 h, 6 fermentés 120 h et 6 fermentés 144 h.

Tableau XXXV. *Moyenne des concentrations des composés volatils des 36 échantillons de cacao torréfié de Trinitario à casse Foncée (ppm)*

Classe	Nom des composés	Trinitario à casse Foncée						
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Ester	Acétate de méthyle	3 ± tr	5 ± tr	145 ± 190	31 ± 5	30 ± 15	32 ± 12	26 ± 10
	Acétate d'éthyle	7 ± 6	36 ± 25	207 ± 173	431 ± 54	286 ± 188	177 ± 89	165 ± 96
	Acétate de 3-méthylbutyle	9 ± 4	9 ± 3	39 ± 5	33 ± 3	54 ± 16	54 ± 24	49 ± 22
	Hexanoate d'éthyle	tr	tr	2 ± tr	2 ± tr	3 ± tr	3 ± tr	3 ± tr
	Acétate d'heptan-2-ol	tr	tr	2 ± 1	2 ± tr	4 ± 2	4 ± 2	4 ± 3
	Diacétate de butane-2,3-diol	tr	tr	1 ± 1	tr	tr	tr	tr
	Octanoate d'éthyle	tr	tr	4 ± 1	5 ± tr	6 ± 1	6 ± 2	6 ± 2
	Diacétate de propane-1,3-diol	tr	tr	3 ± 2	46 ± 17	59 ± 38	94 ± 69	80 ± 58
	Acétate d'éthylphényle	tr	tr	3 ± 2	5 ± 1	6 ± 2	7 ± tr	7 ± 1
	Acétate de 2-phényléthyle	3 ± tr	3 ± 2	26 ± 18	41 ± 13	51 ± 12	63 ± 9	65 ± 6
	Acétate de butyle	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Acide	Acide acétique	22 ± 9	31 ± 12	132 ± 66	216 ± 155	224 ± 160	127 ± 91	181 ± 107
	Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	tr	tr	3 ± 2	5 ± 1	5 ± 2	6 ± 2	6 ± 2
	Acide 3-méthylbutanoïque	2 ± 1	2 ± tr	13 ± 6	14 ± 2	21 ± 4	24 ± 3	24 ± 3
	Acide hexanoïque	tr	tr	1 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr
Alcool	Pentan-2-ol	18 ± 13	22 ± 9	19 ± 7	17 ± 3	14 ± 4	11 ± 4	10 ± 3
	Éthanol	1 ± 2	tr	4 ± 3	3 ± tr	4 ± 2	2 ± 1	2 ± tr
	3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	3 ± 2	10 ± tr	7 ± 5	5 ± tr	3 ± 2	2 ± 2	2 ± 1
	Heptan-2-ol	2 ± tr	2 ± 1	3 ± 2	tr	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 2
	Alcool benzylique	tr	tr	1 ± tr	1 ± tr	1 ± tr	2 ± tr	2 ± tr
	2-phényléthanol	14 ± 7	19 ± tr	24 ± 10	14 ± 2	25 ± 9	22 ± 16	30 ± 15
Pyrazine	2,5-diméthylpyrazine	tr	2 ± 1	5 ± 2	4 ± tr	5 ± tr	5 ± 1	4 ± 1
	2,6-diméthylpyrazine	tr	tr	3 ± tr	2 ± tr	3 ± tr	3 ± tr	3 ± tr
	2,3-diméthylpyrazine	tr	tr	3 ± 2	5 ± 1	4 ± 2	6 ± tr	5 ± 1
	2-éthyl-6-méthylpyrazine	tr	tr	1 ± tr	1 ± tr	2 ± tr	2 ± tr	2 ± tr
	2,3,5-triméthylpyrazine	1 ± tr	3 ± 2	39 ± 30	78 ± 12	61 ± 23	61 ± 12	51 ± 10
	3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine	tr	2 ± tr	5 ± 3	4 ± 1	6 ± 1	6 ± 2	6 ± 2
	Tétraméthylpyrazine	2 ± 1	3 ± 1	175 ± 171	570 ± 156	508 ± 294	486 ± 191	380 ± 171
	6-éthyl-2,3,5-triméthylpyrazine	tr	tr	8 ± 7	16 ± 5	18 ± 10	19 ± 10	16 ± 7
Aldéhyde	3-méthylbutanal	2 ± 2	1 ± tr	6 ± 1	7 ± 1	13 ± 3	13 ± 1	13 ± 2
	Benzaldéhyde	5 ± 3	6 ± 3	31 ± 7	43 ± 2	47 ± 8	49 ± 9	49 ± 7
	5-méthyl-2-phénylhex-2-énal	-	-	tr	tr	tr	tr	tr
	2-méthylbutanal	15 ± 5	17 ± 3	12 ± 8	19 ± 2	16 ± 6	11 ± 3	15 ± 5
	2-isopropyl-5-méthylhex-2-énal	tr	tr	tr	1 ± tr	tr	tr	tr
Cétone	Heptan-2-one	4 ± 2	5 ± 2	4 ± 2	3 ± tr	4 ± 2	3 ± tr	3 ± tr
	Acétoïne (3-hydroxybutanone)	tr	3 ± tr	11 ± 9	25 ± 7	8 ± 6	10 ± 3	8 ± 4
	Nonan-2-one	tr	2 ± 2	3 ± 1	2 ± tr	3 ± 2	2 ± tr	2 ± tr
	Acétophénone (1-phényléthanone)	3 ± 2	4 ± 2	7 ± tr	8 ± tr	9 ± tr	10 ± 2	9 ± 2
Lactone	Butyrolactone	2 ± tr	3 ± tr	3 ± tr	3 ± tr	5 ± 2	4 ± tr	4 ± 2
Hétérocycle	2-acétylpyrrole	2 ± tr	2 ± 1	16 ± 6	31 ± 5	34 ± 8	33 ± 8	27 ± 6
	2-formyl-1-méthylpyrrole	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one	tr	1 ± tr	6 ± 4	10 ± 4	9 ± 5	8 ± 7	7 ± 4

tr : traces (< 1 ppm)

La biosynthèse des composés volatils suit une cinétique identique à celle des Trinitario à casse Claire. Après 144 h de fermentation, les concentrations des molécules volatiles des fèves de Trinitario à casse Foncée sont du même ordre de grandeur que celles des Trinitario à Casse Claire à l'exception du 2-phényléthanol qui est 2 fois plus concentré dans les trinitario à Casse Foncée que dans les fèves à Casse claire. Cependant, l'OAV (égale à la valeur de 36 unités) du 2-phényléthanol étant considérée comme faible dans la contribution de la note cacao (voir section 3. 2. 2 du CHAPITRE III), ce composé aura peu d'influence sur la note cacao.

- **Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)**

La Figure 30 représente une PLS-DA réalisée avec les teneurs des 33 composés volatils afin de caractériser les échantillons par temps de fermentation.

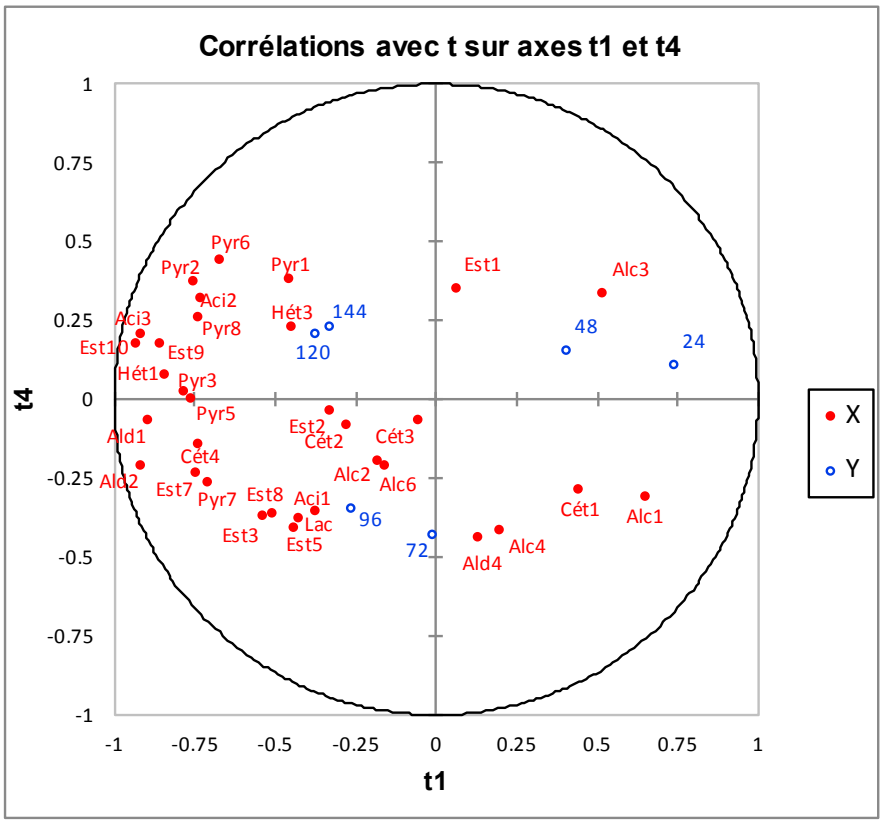


Figure 30. PLS-DA des 33 composés volatils des 30 échantillons de Trinitario à casse Foncée

L'observation de la Figure 30 montre que les échantillons peu fermentés à droite de l'axe t4 (24 h et 48 h) sont bien séparés des échantillons fermentés à gauche de l'axe t4 (72 h à 144 h). Les échantillons fermentés 48 h sont caractérisés par l'alcool isoamylique (Alc3). Les échantillons fermentés 72 h sont caractérisés par le 2-méthylbutanal (Ald4) et l'heptan-2-ol (Alc4). Les échantillons fermentés 96 h sont caractérisés par l'acide acétique (Aci1), le butyrolactone (Lac), l'acétate d'heptan-2-ol (Est5), l'éthanol (Alc2) et le 2-phényléthanol (Alc6). Les échantillons fermentés 120 h et 144 h sont proches et caractérisés par le 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one (Hét3).

Conclusions

L'usage de divers outils d'analyse de données a mis en évidence les indicateurs de la qualité au cours de la fermentation :

- L'analyse en composantes principales et l'exploitation de la matrice de Pearson associée à l'ACP ont permis de définir les critères pour parvenir à une qualité sensorielle optimale. Ainsi, quelle que soit la variété de cacao, il n'y a pas de différence significative entre les variétés pour les échantillons en début et milieu de fermentation (24 h et 48 h) au niveau sensoriel. Les notes végétal, terreux, boisé, astringent, amertume sont des traits prédominants. Au fur et à mesure du déroulement du processus de fermentation, l'odeur végétal, l'amertume laissent place peu à peu aux notes grillé, fruits secs et aboutir en fin de fermentation à une note cacao, chocolat, fruits frais associée à un caractère acide.

- L'analyse de la composition volatile montre que la production de certaines classes de molécules au cours de la fermentation peut être associée à l'acquisition de cette qualité sensorielle. Ainsi, les esters sont tout d'abord synthétisés suivi de celles des pyrazines et des acides. Leurs teneurs restent conséquentes dans la fève en fin de fermentation. Des réactions entre ces divers constituants peuvent aussi avoir lieu conduisant à l'apparition de diesters ou d'aldéhydes.

Cependant, l'analyse PLS-DA a montré quelques différences suivant les variétés.

Concernant les Criollo selon la PLS-DA, les échantillons peu fermentés (24 h et 48 h) sont bien séparés des échantillons fermentés (72 h et 96 h). Les échantillons en début de fermentation sont caractérisés par la présence de certains alcools et esters : les 24 h par le pentan-2-ol, l'alcool isoamylique, l'acétate de méthyle et l'acétate d'éthyle ; les 48 h par le 2-phényléthanol et l'acétate de 3-méthylbutyle. Les échantillons fermentés 72 h sont caractérisés par le diacétate de propane-1,3-diol, l'acétoïne, le 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one et l'acétate de 2-phényléthyle. Les échantillons fermentés 96 h sont caractérisés par des pyrazines et plus particulièrement la tétraméthylpyrazine. Les échantillons fermentés 24 h sont plutôt caractérisés par des goûts de Boisé, de Terreux et de Végétal (goût et odeur) tandis que ceux de 48 h plutôt par des goûts astringent, amer, Grillé et Fruits secs. Concernant

les échantillons fermentés 72 h et 96 h, ils sont caractérisés par des descripteurs plaisants : Fruits frais, Acidité, Cacao, Chocolat, Doux et Floral. Ces descripteurs sont plus proches des échantillons de 72 h que ceux de 96 h. Les notes O Fruité et O Chocolat sont plus élevées pour les échantillons fermentés 72 h par rapport aux 96 h tandis qu'elle est plus faible pour la note O Végétal. Les échantillons semblent mieux fermentés à 72 h qu'à 96 h pour les échantillons de Criollo.

Concernant les Trinitario à casse Claire selon la PLS-DA, les échantillons fermentés 24 h sont toujours caractérisés par des alcools : le pentan-2-ol et l'alcool isoamylique comme ceux des Criollo fermentés 24 h ; tandis que les 48 h par l'heptan-2-one. Les échantillons fermentés 72 h sont caractérisés par l'acétate de méthyle. Les échantillons fermentés 120 h sont caractérisés par l'acétate d'éthyle. La biosynthèse des esters notamment de l'acétate de méthyle et d'éthyle est plus lente chez les Trinitario à casse Claire. Concernant les descripteurs sensoriels on peut distinguer 2 groupes distincts : descripteurs déplaisants dans un groupe (Végétal (odeur et goût), Terreux, Boisé, Astringence, Amertume, Grillé et Fruits secs) pour des échantillons fermentés 24 h et des descripteurs plaisants dans l'autre groupe (Fruits frais, Acidité (odeur et goût), Floral, O Fruité, Doux (odeur et goût), Chocolat (odeur et goût), Epicé et Cacao pour les échantillons fermentés à minima 96 h.

Concernant les Trinitario à casse Foncée selon la PLS-DA, les échantillons fermentés 48 h sont caractérisés par l'alcool isoamylique. Les échantillons fermentés 72 h sont caractérisés par le 2-méthylbutanal et l'heptan-2-ol. Les échantillons fermentés 96 h sont caractérisés par l'acide acétique, le butyrolactone, l'acétate d'heptan-2-ol, l'éthanol et le 2-phényléthanol. Les échantillons fermentés 120 h et 144 h sont proches et caractérisés par le 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4*H*-pyran-4-one et la 2,5-diméthylpyrazine. Concernant les descripteurs sensoriels on peut distinguer 2 groupes distincts : descripteurs déplaisants d'un côté (Végétal (odeur et goût), Terreux, Boisé, Astringence, Amertume, Grillé et Fruits secs) pour des échantillons fermentés au maximum pendant 48 h et des descripteurs plaisants pour les échantillons fermentés à minima 96 h (Fruits frais, Acidité (odeur et goût), Floral, O Fruité, Doux (odeur et goût), Chocolat (odeur et goût), Epicé et Cacao (odeur et goût)).

D'une manière générale, les variétés Trinitario à casse Claire et à casse Foncée doivent fermenter au minimum pendant 96 h pour acquérir toutes leurs propriétés organoleptiques.

Néanmoins, la variété Trinitario à casse Claire et la variété Trinitario à casse Foncée doivent être fermentées idéalement respectivement 120 h et 144 h pour acquérir olfactivement la note cacao.

CHAPITRE V :
Etude des souches de levure isolées du cacao malgache

Introduction

L'analyse de l'état de l'art révèle qu'une seule étude traitant des souches de levure isolées de fèves de Madagascar a été publiée (Galzy, 1984). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous présentons nos résultats sur l'analyse de la diversité microbienne (levurienne en particulier) du cacao malgache (flore revivifiable), sur la nature des composés volatils produits par ces micro-organismes et sur l'analyse du lien potentiel entre ces micro-organismes et la qualité aromatique du cacao malgache.

Les principales questions scientifiques auxquelles nous nous sommes attachés dans ce chapitre sont les suivantes :

- les propriétés sensorielles spécifiques du cacao malgache sont-elles liées aux propriétés métaboliques (COVs) des levures impliquées dans les différentes étapes de sa fermentation ?
- quelles sont les spécificités des souches de levures isolées des fèves de cacao malgache par rapport à celles décrites dans la littérature pour d'autres types de cacao ?
- les souches de levures isolées du cacao malgache ont-elles des propriétés métaboliques intéressantes du point de vue de la production d'arômes ?

Le jeu de données est composé de 16 échantillons issus de la première campagne de collecte de cacao malgache fermentés de 0 à 96 h car les levures interviennent au début de la fermentation. Parmi les 16 échantillons, il y a : 2 échantillons de Criollo, 6 échantillons de Trinitario à casse Claire et 8 échantillons de Trinitario à casse Foncée.

1. Flores levuriennes revivifiables

Un peu plus de 200 isolats de levures ont été isolés à partir des variétés Criollo, Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée de la région nord-ouest de Madagascar. Parmi l'ensemble des isolats, certains repiquages ont été contaminés dans l'étuve et 132 isolats ont été repiqués, isolés et l'ADN extrait. Afin d'éliminer les isolats issus des mêmes souches de levures, nous avons réalisé les profils de restriction des enzymes *Hae*III et *Hinf*I de 132 isolats que nous avons comparés entre eux. Parmi les profils obtenus : 10 isolats n'ont pas de fragment

d'ADN avec l'enzyme *Hae*III et 15 isolats avec *Hinf*I. Après regroupement des isolats présentant des bandes de taille identique, nous avons répertoriés 77 profils possibles avec l'enzyme *Hae*III et 42 profils pour *Hinf*I. Pour cette dernière, il y a moins de profils différents qu'avec *Hae*III car il y a beaucoup plus de profils ressemblants donc plus de regroupement. Les isolats qui présentaient le même profil avec *Hinf*I et *Hae*III ont été considérés comme identiques. Au final, seuls les isolats possédant des profils différents ont été envoyés au séquençage soit 50 sur les 132 étudiés. Après réception des séquences (Annexe 2), les souches ont été identifiées par comparaison des séquences avec la base de données BLASTN. 20 isolats, non séquencés mais étant groupés selon les profils de restriction des enzymes *Hae*III et *Hinf*I, sont identifiés grâce aux isolats qui sont séquencés et appartenant au même groupe selon les tailles des fragments identiques. Au final, 70 souches ont été identifiées sur les 132 étudiées (50 souches par séquençage et 20 souches par comparaison des profils de restriction) : 3 pour la variété Criollo, 40 pour la variété Trinitario à casse Claire et 27 pour la variété Trinitario à casse Foncée. Le profil d'apparition des différentes souches de levures identifiées pour les échantillons analysés pour cette étude est présenté dans le Tableau XXXVI. Au total nous avons isolé sur les 16 échantillons de cacao analysés, 9 genres de levure et 16 espèces différentes. Parmi ces souches, nous avons également observé une grande variabilité génétique. Sur la base des profils de restriction, nous avons par exemple trouvé chez *S. cerevisiae* 16 isolats différents.

Tableau XXXVI. *Flores levuriennes revivifiables issues de fèves fraîches de 16 échantillons de Madagascar identifiées*

	Candida rugosa	*Candida sorbosivorans*	*Clavispora lusitaniae*	*Hanseniaspora meyeri*	*Hanseniaspora opuntiae*	*Hanseniaspora thailandica*	*Hanseniaspora valbyensis*	*Pichia galeiformis*	*Pichia manshurica*	*Pichia* sp.	*Saccharomyces cerevisiae*	*Torulaspora delbrueckii*	*Uncultured fungus*	*Wickerhamomyces anomalus*	*Zygoascus hellenicus*	*Zygoascus meyerae*
214-ci-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
223-ci-48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
227-tc-48	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
228-tc-96	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
232-tc-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
233-tc-96	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
236-tc-0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
237-tc-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
241-tf-0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
242-tf-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
243-tf-96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
246-tf-0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
247-tf-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
248-tf-96	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
252-tf-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
253-tf-96	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

La première colonne à gauche comporte les codes des échantillons de cacao avec dans l'ordre : le numéro du lot, la variété (« ci » pour Criollo, « tc » pour Trinitario à casse Claire et « tf » pour Trinitario à casse Foncée) et le temps de fermentation. Par exemple le code « 214-ci-0 » signifie l'échantillon n° 214 de la variété Criollo fermenté 0 h. Dans le tableau, « 0 » signifie que la souche n'est pas présente dans l'échantillon tandis que « 1 » signifie qu'au moins un isolat de cette souche est identifié dans l'échantillon.

Dans la littérature, certaines de ces souches sont retrouvées sur des fèves de cacao dans différents pays à travers le monde : *Candida rugosa* (Brésil, Bolivie), *Candida sorbosivorans* (Equateur et Australie), *Clavispora lusitaniae* (Cuba), *Hanseniaspora opuntiae* (Ghana, Côte d'Ivoire, Brésil, Equateur, Malaisie, Indonésie, Colombie et Cuba), *Hanseniaspora thailandica* (Malaisie, Indonésie et Cuba), *Pichia galeiformis* (Ghana, Côte d'Ivoire et Mexique), *Pichia manshurica* (Ghana, Côte d'Ivoire, Brésil, Equateur, Malaisie, Bolivie et Cuba), *Saccharomyces cerevisiae* (Madagascar, Ghana, Côte d'Ivoire, Brésil, Equateur, Malaisie, Indonésie, République dominicaine, Bélize, Cameroun, Mexique, Honduras, Colombie, Pérou, Cuba, Trinité-et-Tobago et Australie), *Torulaspora delbrueckii* (Equateur, Malaisie, Indonésie, Mexique et Cuba), *Wickerhamomyces anomalus* (Côte d'Ivoire, Brésil, Equateur, Malaisie et Colombie) et *Zygoascus hellenisus* (Cuba et Australie).

Candida rugosa est présent à 96 h de fermentation donc lorsque la température dans le bac de fermentation est élevée avant le 2ème brassage des fèves. Ce résultat est en accord avec la littérature où cette souche est présente en fin de fermentation lorsque la température est d'environ 50 °C (Schwan et Wheals, 2004). Elle a également été identifiée sur le cacao de Bolivie qui est classé parmi les cacao 100 % fin selon l'ICCO (Miescher Schwenninger *et al.*, 2016). *C. rugosa* possède une lipase très active qui permet l'hydrolyse de fonctions esters notamment celles des triglycérides en glycérol et en acide gras (Dalmau *et al.*, 2000). Elle est aussi utilisée en biotechnologie pour la synthèse organique (Jaeger et Reetz, 1998; Gunasekaran et Das, 2005; Vakhlu et Kour, 2006). On retrouve également cette souche dans un échantillon de Trinitario à casse Claire fermenté 96 h de Madagascar mais pas aux autres temps de fermentation (0 et 48 h), ni dans les autres variétés (Criollo et Trinitario à casse Foncée). Cette souche peu retrouvée sur les fèves de cacao dans le reste du monde pourrait être caractéristique du cacao de Madagascar et plus particulièrement de la variété Trinitario à casse Claire.

Nous trouvons également une souche de *Candida sorbosivorans* sur les fèves des échantillons fermentés pendant 48 et 96 h. Cette levure a déjà été identifiée sur des échantillons de cacao hybride (Nacional x Trinitario) fermentés sur des plateformes en bambou et prélevés à 72 h de fermentation (Papalexandratou *et al.*, 2011b). Dans une autre étude australienne, elle est présente parfois pendant les 24 premières heures de fermentation (Dircks, 2009). *C. sorbosivorans* a été isolée de différents fruits comme la cerise des Antilles, l'*Hancornia speciosa* Gom. et le prunier du Brésil (Trindade *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2007). Elle est décrite comme une espèce présente dans du matériel industriel contaminé résultant d'un procédé d'oxydation du sorbitol (*D*-glucitol) en *L*-sorbose (James *et al.*, 2001). Elle est aussi identifiée lors de la fermentation de grappes de raisin pour la production de vin (Li *et al.*, 2012). *C. sorbosivorans* permet la production d'érythritol à partir de glucose (Saran *et al.*, 2015; Carly et Fickers, 2018). Cette souche permet la production de polyol à partir des sucres présents dans la pulpe de cacao lors de la phase anaérobie. *Candida sorbosivorans* est retrouvée sur des fèves originaires d'Equateur qui est un pays classé à 75 % cacao fin selon l'ICCO et pourrait être caractéristique de cacao fin et plus particulièrement de la variété Trinitario.

Clavispora lusitaniae produit une α-amylase et est présente dans le tube digestif de nombreux animaux (Gargeya *et al.*, 1990). Dans la littérature, un seul article cite sa présence sur des fèves de cacao de Cuba (Fernández Maura *et al.*, 2016). Cette souche est aussi identifiée dans du jus de pomme concentré (Deak et Beuchat, 1993), dans les agaves (Lachance, 1995; Pérez-Brito *et al.*, 2015), dans du fromage (Kaminarides et Anifantakis, 1989). Du point de vue du métabolisme, *C. lusitaniae* transforme le glucose et le cellobiose en éthanol (Freer et Greene,

1990). Cette souche est retrouvée dans les 3 variétés de cacao étudiées et aux différents temps de fermentation. Cette levure n'est donc pas un marqueur spécifique d'un type de cacao mais pourrait être spécifique du cacao malgache ou d'un mode spécifique de transformation au même titre que le cacao cubain.

Le genre *Hanseniaspora* est généralement présent sur les fruits, le sol et les exsudats d'arbres (Jindamorakot *et al.*, 2009), ainsi que dans le cacao (Papalexandratou et De Vuyst, 2011). Ce type de levure joue un rôle significatif dans la fabrication du vin avec la production d'enzymes telles que les protéases, les β-glucosidases, les pectinases et de composés aromatiques (Martin *et al.*, 2018). La co-culture de ce genre avec la souche *Saccharomyces cerevisiae* permet d'avoir des flaveurs plus intenses comparé à la culture de *Saccharomyces cerevisiae* seule (Martin *et al.*, 2018).

Les souches de *Hanseniaspora* que nous avons isolées de nos échantillons de Trinitario à casse Claire sont les espèces *meyeri*, *opuntiae*, *thailandica* et *valbyensis*. La souche *H. meyeri* a été isolée en 2003 sur un fruit de *Sapindus* sp. et des fleurs de *Schotia* sp. (Cadez *et al.*, 2003). *Hanseniaspora thailandica* a également été retrouvée comme une levure majoritaire dans la fermentation de certains cacaos et elle apparaît généralement dans les 48 premières heures de la fermentation spontanée des fèves de cacao (Crafack *et al.*, 2013; Meersman *et al.*, 2013; Papalexandratou *et al.*, 2013; Fahrurrozi, 2015; Teng-Sin *et al.*, 2016). *Hanseniaspora valbyensis* est une souche qui a pour origine la fleur de *Strelitzia* sp. (Cadez *et al.*, 2002). Peu d'études existent sur cette souche dans la fermentation du cacao (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007). Par contre, elle est décrite dans la fermentation des pommes pour la fabrication de cidre (Pando Bedriñana *et al.*, 2010). *H. meyeri* n'a jamais été décrite sur des échantillons de cacao. Il se pourrait donc que cette espèce soit plus spécifiquement liée au cacao de Madagascar et plus particulièrement de la variété Trinitario à casse Claire.

Plusieurs souches de *Pichia* ont également été retrouvées dans nos échantillons de cacao. *Pichia galeiformis* est une levure minoritaire dans la fermentation du cacao (Koné *et al.*, 2016). *Pichia galeiformis* apparaît à différents temps de fermentation selon la littérature : 0, 30, 144 et 168 h (Arana-Sánchez *et al.*, 2015) ; 144 h (Hamdouche *et al.*, 2015). Dans la littérature, la souche *Pichia manshurica* a été retrouvée sur de nombreux échantillons de cacao en cours de fermentation sous forme majoritaire (Papalexandratou *et al.*, 2011b; Fernández Maura *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2019) ou minoritaire (Daniel *et al.*, 2009; Papalexandratou *et al.*, 2013). Elle a été identifiée aussi bien dans les fermentations en tas (Daniel *et al.*, 2009; Meersman *et al.*, 2013; Fernández Maura *et al.*, 2016; Visintin *et al.*, 2016; Koffi *et al.*, 2017) que dans les bacs en bois (Hamdouche *et al.*, 2015; Miescher Schwenninger *et al.*, 2016; Bastos *et al.*, 2018).

P. manshurica apparaît également à différents temps de fermentation selon la littérature : 0, 48, 72 et 96 h (Papalexandratou *et al.*, 2011b) ; 6, 24, 32, 56 h (Meersman *et al.*, 2013) ; 42 h (Daniel *et al.*, 2009) ; 96 h (Hamdouche *et al.*, 2015) ; 0, 24, 48 et 144 h (Visintin *et al.*, 2016) ; 0, 24, 96, 120 et 144 h (Almeida *et al.*, 2019); 48, 72, 120 et 144 h (Bastos *et al.*, 2018). De plus, *P. manshurica* est identifiée aussi bien sur des fèves de cacao courant (Ghana, Côte d'Ivoire, Brésil, Malaisie et Cuba) que sur des fèves de cacao fin (Equateur et Bolivie). D'autres espèces de *Pichia* ont été isolées sur les fèves de cacao. *Pichia kudriavzevii* est utilisé comme starter pour l'ensemencement des fèves de cacao soit seul soit en co-culture avec d'autres souches de levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora opuntiae*) et a une influence positive sur la qualité aromatique (Saerens et Swiegers, 2016; Luan *et al.*, 2018) et notamment des notes florale et fruitée (cf. Tableau II). De même, l'ensemencement de fèves de cacao par un mélange des souches *P. kluyveri* / *Lb. fermentum* / *A. pasteurianus* semble avoir une influence positive sur le profil aromatique par rapport à un témoin fermenté spontanément en ayant les notes les plus élevées pour les descripteurs doux, fruité, arôme de cacao (Crafack *et al.*, 2013).

La température optimale pour la croissance des levures est 25-35 °C mais certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* font partie des quelques levures qui peuvent survivre à des températures plus élevées (> 35 °C) (Ardhana et Fleet, 2003). *Saccharomyces cerevisiae* est retrouvée dans 13 échantillons sur les 16. Les 3 échantillons où elle n'est pas retrouvée sont des Trinitario à casse Foncée non fermentés et fermentés pendant 96 h. Sa présence sur la majeure partie des échantillons est en cohérence avec la littérature puisque cette souche est retrouvée très fréquemment dans la fermentation du cacao dans divers pays à travers le monde. Elle joue cependant un rôle essentiel dans la qualité des fèves de cacao. *S. cerevisiae* est souvent associée à la production d'un certain nombre de substances volatiles sous formes d'aldéhydes (acétaldéhyde, nonanal, ...), de cétones (2,3-butanedione, acétoïne, ...), d'alcools (butan-1-ol, phényléthanol, ...) ou d'esters (acétate d'éthyle, octanoate d'éthyle, ...) (Patrignani *et al.*, 2016).

Torulaspora delbrueckii a été retrouvée dans un seul échantillon sur les 16, à savoir un échantillon de Trinitario à casse Foncée non fermenté. Ce résultat est assez surprenant car de nombreux auteurs signalent sa présence à différents temps de fermentation : à 0 h (Papalexandratou *et al.*, 2011b) ; à 0, 12, 24 et 48 h (Fahrurrozi, 2015) ; à 24, 30 et 48 h (Arana-Sánchez *et al.*, 2015) ; à 14, 24, 32, 48 et 56 h (Meersman *et al.*, 2013). De plus *T. delbrueckii* est identifiée aussi bien sur des fèves de cacao courant (Malaisie et Cuba) que de cacao fin (Equateur, Indonésie et Mexique).

Wickerhamomyces anomalus apparaît au début de la fermentation : à 6 h (Papalexandratou et De Vuyst, 2011), 14 h (Meersman *et al.*, 2013), à 0, 12 et 24 h (Fahrurrozi, 2015), à 0, 6 et 48 h (Teng-Sin *et al.*, 2016). Dans le Tableau XXXVI, elle est identifiée une fois dans un échantillon non fermenté.

D'après la littérature, peu d'étude identifiant la souche *Zygoascus hellenicus* dans la fermentation du cacao existe (Dircks, 2009; Fernández Maura *et al.*, 2016).

Aucune étude ne cite la souche *Zygoascus meyerae* dans la fermentation du cacao.

A ce jour, il existe qu'une étude portant sur l'étude des flores levuriennes du Criollo (Lee et al., 2019).

D'après nos résultats, la souche *Candida sorbosivorans* pourrait être caractéristique des cacaos fins. La souche *Hanseniaspora opuntiae* a été retrouvée sur différentes variétés de cacao en particulier le Forastero (Visintin *et al.*, 2016), un hybride de Criollo et de Forastero (Papalexandratou *et al.*, 2011a) et un hybride de Trinitario et de Nacional (Papalexandratou *et al.*, 2011b). Cette souche ne peut donc pas être associée à une variété spécifique. De même, la souche *Pichia manshurica* n'est pas caractéristique d'une variété particulière puisqu'elle est retrouvée sur différentes variétés comme le Forastero (Visintin *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2019), un hybride de Criollo et de Forastero (Papalexandratou *et al.*, 2011a), ou encore un hybride de Trinitario et de Nacional (Papalexandratou *et al.*, 2011b). Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* que nous avons isolées ne sont également pas caractéristiques d'une variété particulière puisque cette levure a été retrouvée sur différentes variétés à savoir le Criollo (Lee *et al.*, 2019), le Trinitario (Dircks, 2009), le Nacional (Daza Safadi et Tapia Román, 2017), le Forastero (Visintin *et al.*, 2016), un hybride de Criollo et de Forastero (Papalexandratou *et al.*, 2011a) et un hybride de Trinitario et de Nacional (Papalexandratou *et al.*, 2011b). Les souches *Torulaspora delbrueckii* et *Wickerhamomyces anomalus* ne sont pas caractéristiques d'une variété particulière puisqu'elles sont retrouvées sur différentes variétés à savoir un hybride de Criollo et de Forastero (Papalexandratou *et al.*, 2011a) et un hybride de Trinitario et de Nacional (Papalexandratou *et al.*, 2011b). La souche *Zygoascus hellenicus* est peu retrouvée dans la littérature sur le cacao. Une thèse cite sa présence sur des fèves de Trinitario (Dircks, 2009) et pourrait être spécifique d'une fermentation de Trinitario à 24-48 h. Les souches *Hanseniaspora meyeri* et *Hanseniaspora valbyensis* ne sont pas présentes ailleurs que sur les fèves de cacao de Madagascar de l'étude. Elles pourraient être donc caractéristiques de ce cépage. Cette hypothèse reste à confirmer par le lien qui existerait entre ces souches et les composés volatils présents dans la poudre des échantillons (voir section 4).

De nombreuses souches de levure sont connues pour produire des composés volatils dont *Hanseniaspora opuntiae, Pichia manshurica* et *Saccharomyces cerevisiae* (Assi-Clair *et al.*, 2019). Une fois que ces composés chimiques volatils ont pénétré à l'intérieur de la graine pendant la phase de fermentation, ils se retrouvent piégés à l'intérieur de celle-ci.
Dans le paragraphe suivant, nous allons étudier ces composés volatils à partir de graines broyées et nous essaierons d'établir un lien entre les souches de levure et la production de composés volatils.

2. Etude de la fraction volatile élaborée au cours de la fermentation

L'analyse des composés volatils par SPME identifiés sur la poudre des fèves de cacao non torréfiées a été comparée aux composés retrouvés sur la poudre des fèves de cacao torréfiées (Tableau XXVI). 32 composés volatils communs sont retrouvés. Le Tableau XXXVII présente les teneurs des 32 composés volatils pour les 16 échantillons.

Tableau XXXVII. *Moyenne des concentrations des composés volatils des 16 échantillons de cacao non torréfié (ppm)*

	214-ci-0	223-ci-48	227-tc-48	228-tc-96	232-tc-48	233-tc-96	236-tc-0	237-tc-48
Acétate de méthyle	3,48	12,70	11,66	16,76	11,37	18,86	10,59	11,21
Acétate d'éthyle	0,31	4,23	0,99	110,64	0,90	29,75	12,10	3,90
Acétate de butyle	0,09	0,33	0,14	0,47	0,53	0,62	0,55	1,39
Acétate de 3-méthylbutyle	1,54	15,60	9,18	48,52	10,73	51,57	5,23	9,58
Hexanoate d'éthyle	0,11	1,41	1,09	2,25	2,95	4,19	0,00	2,24
Acétate d'heptan-2-ol	0,00	1,40	1,97	1,81	2,32	4,21	0,70	2,62
Octanoate d'éthyle	0,00	0,28	3,58	2,64	5,48	6,89	0,00	3,21
Diacétate de propane-1,3-diol	0,05	0,16	0,00	0,01	0,14	0,00	0,00	0,08
Acétate d'éthylphényle	0,00	2,14	0,39	4,69	1,04	3,48	0,00	0,95
Acétate de 2-phényléthyle	0,05	1,66	1,02	7,09	1,20	5,19	0,51	0,47
Acide acétique	7,79	80,62	54,67	77,35	59,66	92,97	34,84	51,15
Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	0,18	4,01	3,95	3,27	6,46	2,72	2,52	0,95
Acide 3-méthylbutanoïque	1,23	23,49	13,76	19,13	22,62	15,87	7,40	8,58
Acide hexanoïque	0,08	1,44	0,71	0,91	1,56	1,21	0,48	0,79
Ethanol	0,15	1,42	11,12	0,97	12,31	1,61	15,76	0,89
Pentan-2-ol	5,44	1,28	9,27	10,82	10,95	19,74	40,33	42,72
3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	1,10	7,21	4,09	4,57	6,90	4,27	6,90	4,77
Heptan-2-ol	0,61	2,30	2,97	1,03	5,28	2,38	16,07	13,24
Alcool benzylique	0,09	0,97	0,58	0,58	0,99	0,58	0,76	0,52
2-phényléthanol	3,81	52,39	24,23	42,00	38,07	37,41	78,48	15,46
2,3-diméthylpyrazine	0,12	2,84	5,65	1,74	2,71	1,39	1,97	1,08
2,3,5-triméthylpyrazine	0,31	21,37	22,24	20,62	17,81	15,37	1,81	8,37
Tétraméthylpyrazine	0,76	303,00	649,83	460,88	192,84	335,65	3,81	80,80
2-méthylbutanal	4,27	15,64	17,53	9,58	20,54	8,49	26,27	21,19
3-méthylbutanal	2,43	13,85	13,90	6,51	16,70	6,93	20,50	15,91
Benzaldéhyde	4,41	79,55	68,92	37,37	82,05	44,79	67,52	57,00
Heptan-2-one	1,69	4,14	4,85	2,52	9,45	6,21	20,09	9,24
Acétoïne (3-hydroxybutanone)	1,82	3,18	4,00	2,73	2,60	3,31	49,59	2,01
Nonan-2-one	0,18	2,38	1,46	0,72	4,05	3,17	11,60	3,32
Acétophénone (1-phényléthanone)	0,40	2,53	8,41	2,53	7,97	6,67	4,83	10,28
2-acétylpyrrole	0,49	5,67	2,67	5,39	3,91	4,41	0,85	2,97
Butyrolactone	0,49	1,80	1,58	1,77	1,62	2,21	2,93	1,70

Tableau XXXVII (*suite*)

	241-tf-0	242-tf-48	243-tf-96	246-tf-0	247-tf-48	248-tf-96	252-tf-48	253-tf-96
Acétate de méthyle	3,90	6,85	17,70	5,98	9,17	21,45	13,04	17,98
Acétate d'éthyle	0,28	45,29	78,85	0,53	2,26	18,14	1,70	62,19
Acétate de butyle	0,74	0,43	0,36	0,09	0,39	0,28	0,43	0,57
Acétate de 3-méthylbutyle	1,90	31,49	77,12	5,10	16,75	52,34	21,52	57,09
Hexanoate d'éthyle	0,07	4,73	5,26	0,04	1,67	3,70	2,05	3,55
Acétate d'heptan-2-ol	0,23	1,22	3,88	0,32	2,29	4,04	2,01	5,79
Octanoate d'éthyle	0,00	3,65	7,28	0,00	2,10	6,87	2,25	3,31
Diacétate de propane-1,3-diol	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,98
Acétate d'éthylphényle	0,02	0,88	3,04	0,00	0,37	2,17	0,71	2,90
Acétate de 2-phényléthyle	0,08	1,17	10,91	0,15	1,09	6,66	0,98	8,09
Acide acétique	11,90	33,66	86,09	21,12	37,82	97,27	56,06	76,43
Acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique)	0,23	0,58	2,24	0,33	0,44	3,93	4,23	2,62
Acide 3-méthylbutanoïque	1,06	4,29	13,17	2,69	3,11	20,93	11,06	13,31
Acide hexanoïque	0,08	0,50	0,72	0,24	0,42	1,23	0,95	0,97
Ethanol	3,26	0,38	1,48	0,16	10,18	1,59	5,00	1,58
Pentan-2-ol	24,67	23,65	16,27	10,76	21,55	9,93	18,41	20,42
3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique)	0,91	2,89	3,71	0,74	4,50	2,88	2,21	3,39
Heptan-2-ol	2,23	3,10	2,25	0,78	6,36	1,76	2,02	3,55
Alcool benzylique	0,00	0,19	0,43	0,00	0,34	0,57	0,34	0,41
2-phényléthanol	1,65	5,21	28,07	0,00	15,44	23,42	7,85	23,39
2,3-diméthylpyrazine	0,41	0,28	1,29	0,27	0,61	3,03	2,08	1,18
2,3,5-triméthylpyrazine	0,46	3,34	11,28	0,74	2,20	23,75	17,39	12,32
Tétraméthylpyrazine	1,24	17,42	84,21	1,44	7,41	573,45	169,94	183,33
2-méthylbutanal	6,70	3,36	9,93	5,40	16,91	11,98	17,23	13,01
3-méthylbutanal	4,09	1,87	9,10	3,18	12,98	9,92	12,04	12,15
Benzaldéhyde	12,57	12,66	32,56	4,84	33,32	54,13	40,18	44,59
Heptan-2-one	5,53	6,05	4,66	2,10	9,74	4,69	5,94	7,51
Acétoïne (3-hydroxybutanone)	0,44	1,63	1,74	0,33	0,59	5,49	3,69	2,99
Nonan-2-one	2,33	3,86	1,45	0,20	2,97	1,34	1,99	2,40
Acétophénone (1-phényléthanone)	5,42	3,62	4,30	1,41	7,61	6,37	5,80	6,46
2-acétylpyrrole	0,30	1,45	3,65	0,76	1,37	5,00	2,83	5,12
Butyrolactone	0,86	1,29	2,41	0,81	1,55	2,20	1,18	1,84

L'échantillon 236-tc-0 présente des caractéristiques particulièrement atypiques par rapport aux autres échantillons à 0 h de fermentation et il sera discuté individuellement à la fin du chapitre.

Les esters sont connus depuis longtemps par leur arôme fruité (Crouzet, 1998). Les teneurs en esters comme l'acétate de butyle, l'hexanoate d'éthyle, l'acétate d'heptan-2-ol, l'octanoate d'éthyle, … sont relativement peu élevées (< 10 ppm) sauf pour les acétates de méthyle, d'éthyle et de 3-méthylbutyle. On remarque néanmoins que ces teneurs sont croissantes au cours de la fermentation, variant par exemple pour l'acétate d'éthyle de 0,28 ppm (0 h) à 78,85 ppm (96 h) ou pour l'acétate de 3-méthylbutyle de 1,90 ppm (0 h) à 77,12 ppm (96 h), indiquant qu'ils sont probablement générés par les micro-organismes pendant la phase de fermentation. De nombreuses notes olfactives sont détectées à faible teneur selon la littérature[1]. Ainsi l'octanoate d'éthyle a un seuil de perception à 7,5 ppm, l'acétate d'éthylphényle à 5-10 ppm et l'acétate de 2-phényléthyle à 5-10 ppm. L'octanoate d'éthyle a

une note fruitée et cette note se retrouve dans les échantillons fermentés à 48 et à 96 h. L'acétate d'éthylphényle et l'acétate de 2-phényléthyle ont une note florale. Tous les échantillons fermentés 96 h ont une teneur supérieure à 5 ppm pour l'acétate de 2-phényléthyle. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de l'analyse sensorielle (voir CHAPITRE IV) qui montre que les échantillons fermentés 48 h ont une note florale beaucoup plus faible que ceux fermentés 96 h.

La teneur des acides est élevée pour certains acides comme l'acide acétique notamment par rapport à l'acide 3-méthylbutanoïque. La teneur en acide acétique augmente au cours de la fermentation. Ce résultat est en cohérence avec la littérature (Barel, 2016) qui montre que jusqu'à 48 h les levures transforment les sucres en éthanol et qu'à partir de 48 h cet alcool est transformé en acide acétique par les bactéries acétiques. Dans nos échantillons, la teneur en acide acétique est justement élevée à 48 h pour les Criollo et à 96 h pour les Trinitario.

Les teneurs en alcool sont moyennes en particulier pour le pentan-2-ol et le 2-phényléthanol. Les teneurs en éthanol des différents échantillons sont maximales (11,12 ; 12,31 et 10,18 ppm pour les échantillons respectifs 227-tc-48, 232-tc-48 et 247-tf-48) à 48 h de fermentation par rapport à ceux de 0 h et 96 h, excepté pour les échantillons 237-tc-48 et 242-tf-48. Concernant l'échantillon 237-tc-48, la teneur est quasiment nulle tandis que l'échantillon 236-tc-0 non fermenté présente une teneur importante de 15,76 ppm. La raison de la présence d'éthanol dans l'échantillon non fermenté pourrait s'expliquer par une fermentation qui aurait démarré bien avant la mise en bac de fermentation (correspondant à 0 h de fermentation). Cette hypothèse serait confirmée par une teneur en acide acétique élevée pour l'échantillon 236-tc-0 par rapport aux 3 autres échantillons non fermentés. Le 3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique) a une note de chocolat tandis que l'alcool benzylique et le 2-phényléthanol ont une note florale. La note olfactive florale est détectée à une teneur d'au moins 20 ppm selon les bases de données[1]. L'alcool benzylique ne devrait pas être détecté olfactivement car sa teneur est inférieure à 1 ppm. Par contre, le 2-phényléthanol devrait être détecté olfactivement pour les échantillons de Criollo et de Trinitario à casse Claire fermentés 48 et 96 h et l'échantillon de Trinitario à casse Claire non fermenté (236-tc-0). Comme précédemment, la fermentation aurait démarré bien avant la mise en bac de fermentation (correspondant à 0 h de fermentation). Concernant les échantillons de Trinitario à casse Foncée, le 2-phényléthanol est détecté pour les échantillons fermentés 96 h. D'après l'évolution des teneurs en 2-phényléthanol, il se

[1] http://www.thegoodscentscompany.com

pourrait que la fermentation pour les Trinitario à casse Claire se déroule plus rapidement que les Trinitario à casse Foncée.

Les pyrazines contribuent de façon importante à la flaveur d'un grand nombre de produits grillés ou cuits (Crouzet, 1998). Les teneurs en pyrazines sont variables selon le composé et le temps de fermentation. Elles sont très faibles à 0 h de fermentation. Elles sont inférieures à 6 ppm pour la 2,3-diméthylpyrazine (note cacao), varient de 2,20 à 23,75 ppm pour les échantillons fermentés 48 à 96 h pour la 2,3,5-triméthylpyrazine (note cacao) et varient de 7,41 à 649,83 ppm pour les échantillons fermentés 48 à 96 h pour la tétraméthylpyrazine (note chocolat). La production de ces molécules particulièrement importantes pour la qualité sensorielle du chocolat peuvent être produites par des micro-organismes, par exemple chez *Bacillus subtilis* (Zak *et al.*, 1972). Un article et un brevet plus récents sur des matrices différentes que les fèves fraîches de cacao décrivent la production de tétraméthylpyrazine par une souche de *Bacillus* et *Bacillus pumilus* (Xiao *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011).

Les teneurs des cétones sont inférieures à 10 ppm pour l'ensemble des 4 composés (à savoir l'heptan-2-one, l'acétoïne, la nonan-2-one et l'acétophénone) et pour l'ensemble des échantillons à l'exception de l'échantillon 236-tc-0 qui présente des teneurs nettement plus élevées. Les composés sont présents dans tous les échantillons à tous les temps de fermentation avec globalement un pic à 48 h de fermentation. Cela est en cohérence car l'heptan-2-one, le nonan-2-one et l'acétophénone sont des composés volatils présents à l'origine (arôme de constitution) (Rodriguez-Campos *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2014). Ces composés ont des notes florale et fruitée (Rodriguez-Campos *et al.*, 2012).

Les teneurs de la 2- acétylpyrrole sont inférieures à 6 ppm mais on peut noter une augmentation de sa concentration au cours de la fermentation. Au niveau olfactif, ce composé qui produit une note de cacao est détecté à partir de 10 ppm[1]. La présence de ce composé pourrait donc potentiellement influer sur le profil aromatique de nos échantillons de cacaos.

La γ-butyrolactone est un précurseur de l'acide γ-hydroxybutyrique et possède une faible odeur caractéristique de beurre rance. Les teneurs de la butyrolactone sont inférieures à 3 ppm et il y a une augmentation au cours de la fermentation sauf pour l'échantillon 236-tc-0. Celui-ci à une teneur plus élevée que l'échantillon fermenté 48 h (237-tc-48). Sa présence n'est pas souhaitée dans les échantillons.

Concernant l'échantillon atypique 236-tc-0, la teneur en éthanol est importante à 15,76 ppm. Les teneurs en cétones sont supérieures aux autres temps de fermentation : l'heptan-2-one (20,09 ppm), l'acétoïne (49,59 ppm), la nonan-2-one (11,60 ppm) et l'acétophénone (4,83

ppm). La teneur en butyrolactone est à 2,93 ppm et est plus élevée que l'échantillon fermenté 48 h.

La comparaison de l'échantillon 236-tc-0 avec les deux autres échantillons de la même variété prélévés à 0 h de fermentation (226-tc-0 et 231-tc-0) montre des différences suivant certains composés. Les teneurs sont beaucoup plus élevées pour l'acétate d'éthyle (12 fois), l'éthanol (2 fois), le pentan-2-ol (3 fois), le 2-phényléthanol (1,7 fois), le 3-méthylbutanal (2 fois), le benzaldéhyde (2 fois) et l'acétoïne (50 fois).

Plusieurs hypothèses semblent possibles :

- hypothèse 1 : erreur d'échantillonnage,
- hypothèse 2 : le temps indiqué 0 h n'est pas réellement à 0 h de fermentation,
- hypothèse 3 : les produits contiennent naturellement les composés (éthanol, acide acétique, ...).

Certaines composés volatils sont classés comme provenant de cacao fin qu'ils soient d'origine de constitution (heptan-2-ol, pentan-2-ol, heptan-2-one) ou d'origine fermentaire (2-phényléthanol, 3-méthylbutan-1-ol) (Rottiers *et al.*, 2019). Parmi les 32 composés volatils, il y a :

- 6 composés volatils d'origine de constitution : pentan-2-ol, heptan-2-ol, heptan-2-one, nonan-2-one, acétophénone et butyrolactone,
- 26 composés volatils d'origine fermentaire : les 10 esters, les 4 acides, éthanol, alcool isoamylique, alcool benzylique, 2-phényléthanol, les 3 pyrazines, les 3 aldéhydes, acétoïne et 2-acétylpyrrole.

Le nombre de variables (32 composés volatils) étant beaucoup plus important que le nombre d'échantillons (16), nous avons regroupé l'ensemble des molécules par famille de composé chimique (Tableau XXXVIII). Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin d'associer les classes chimiques des composés volatils aux échantillons (Figure 31).

Tableau XXXVIII. *Somme des concentrations des 32 composés volatils par famille chimique des 16 échantillons de cacao non torréfié (ppm)*

	Ester	Acide	Alcool	Pyrazine	Aldéhyde	Cétone	Hétérocycle	Lactone
214-ci-0	5,63	9,29	11,20	1,19	11,11	4,09	0,49	0,49
223-ci-48	39,90	109,57	65,58	327,22	109,04	12,23	5,67	1,80
227-tc-48	30,03	73,09	52,26	677,72	100,35	18,71	2,67	1,58
228-tc-96	194,86	100,65	59,97	483,24	53,46	8,49	5,39	1,77
232-tc-48	36,66	90,30	74,52	213,37	119,29	24,07	3,91	1,62
233-tc-96	124,77	112,77	65,98	352,42	60,21	19,36	4,41	2,21
236-tc-0	29,68	45,24	158,30	7,58	114,29	86,10	0,85	2,93
237-tc-48	35,64	61,47	77,60	90,25	94,10	24,85	2,97	1,70
241-tf-0	7,22	13,26	32,72	2,10	23,37	13,73	0,30	0,86
242-tf-48	95,71	39,03	35,41	21,04	17,89	15,16	1,45	1,29
243-tf-96	204,70	102,22	52,21	96,78	51,60	12,15	3,65	2,41
246-tf-0	12,21	24,38	12,44	2,45	13,42	4,04	0,76	0,81
247-tf-48	36,08	41,79	58,36	10,22	63,21	20,91	1,37	1,55
248-tf-96	115,64	123,36	40,15	600,24	76,03	17,89	5,00	2,20
252-tf-48	44,70	72,30	35,83	189,40	69,45	17,43	2,83	1,18
253-tf-96	162,44	93,33	52,74	196,83	69,76	19,36	5,12	1,84

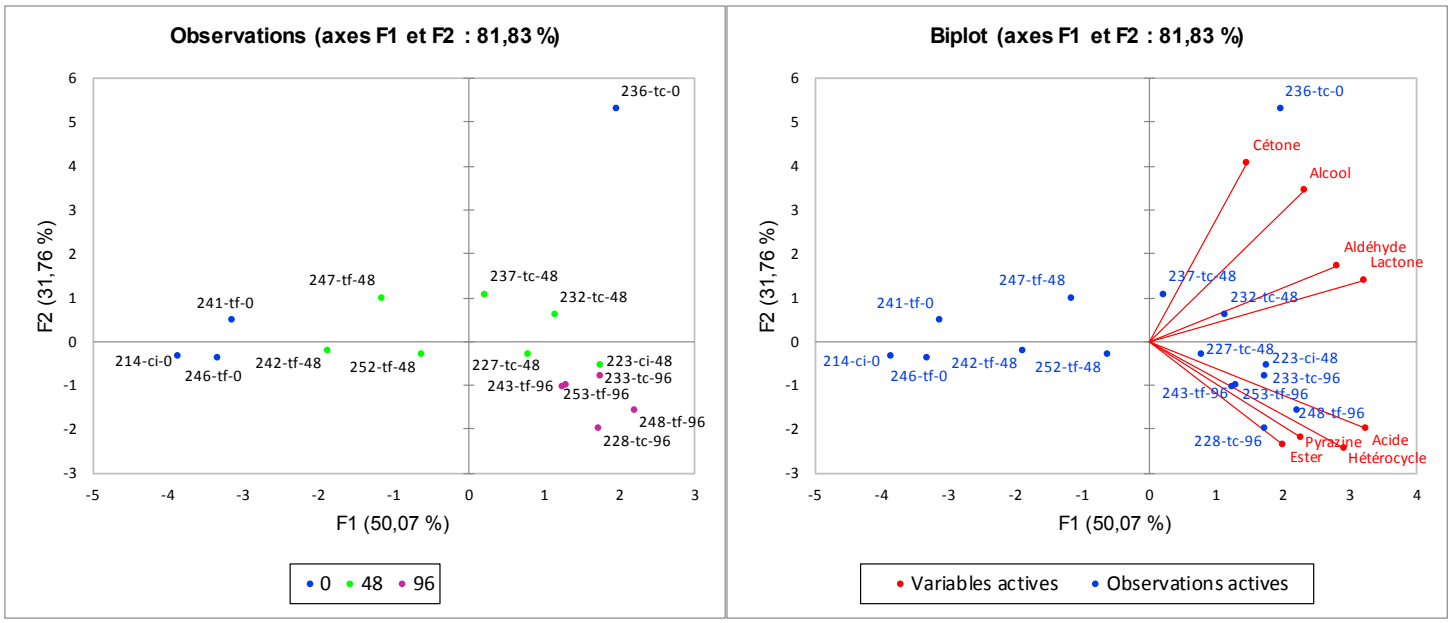


Figure 31. ACP des 16 échantillons de cacao non torréfié selon les familles de composés chimiques

L'ACP des 16 échantillons de cacao non torréfié est fortement représenté par les axes F1 et F2 (81,83 %). Trois groupes distincts apparaissent suivant le temps de fermentation : le groupe des 0 h (à l'exception de l'échantillon 236-tc-0), celui des 48 h et celui des 96 h. La position de l'échantillon 236-tc-0 est expliquée par des teneurs des composés volatils qui ne vont pas dans le même sens que les 3 autres échantillons non fermentés. L'échantillon de Criollo fermenté 48 h (223-ci-48) est proche du groupe des 96 h. Ce résultat est assez cohérent puisque cela correspond au milieu de la fermentation totale pour les 3 variétés : 96 h pour les Criollo, 144 h

pour les Trinitario à casse Claire et à casse Foncée. L'échantillon 236-tc-0 (fermenté 0 h) est caractérisé par les cétones et les alcools avec des teneurs plus élevées pour cet échantillon par rapport aux autres. Les aldéhydes sont plutôt caractéristiques des échantillons 232-tc-48 et 237-tc-48. Les échantillons fermentés 96 h sont caractérisés par les esters, les pyrazines, les acides et l'hétérocycle.

Les échantillons de cacao en fin de fermentation (96 h) sont caractérisés principalement par des teneurs élevées pour les familles des esters et des pyrazines. L'octanoate d'éthyle a une note fruitée et cette note se retrouve dans les échantillons fermentés à 48 et à 96 h. L'acétate d'éthylphényle et l'acétate de 2-phényléthyle ont une note florale. Ces esters sont retrouvés aussi bien dans le cacao courant que le cacao fin (Afoakwa *et al.*, 2009; Portillo *et al.*, 2009; Rodriguez-Campos *et al.*, 2011; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012; Rottiers *et al.*, 2019). La tétraméthylpyrazine a une note chocolatée et est retrouvée aussi bien dans le cacao courant que le cacao fin (Afoakwa *et al.*, 2009; Rottiers *et al.*, 2019). D'après les résultats, le cacao malgache a une olfactive fruitée et chocolatée.
L'octanoate d'éthyle, l'acétate d'éthylphényle et l'acétate de 2-phényléthyle sont produits par des souches de levures notamment *Saccharomyces cerevisiae* (Patrignani *et al.*, 2016). Cela est vérifié sur le Tableau XXXVII où les échantillons fermentés 0 h (214-ci-0 ; 236-tc-0 ; 241-tf-0 et 246-tf-0) ont des teneurs nulles ou très faibles (< 0,51 ppm) comparées aux échantillons fermentés 48 ou 96 h. La plupart des pyrazines proviennent principalement de la torréfaction des fèves de cacao. Cependant, la tétraméthylpyrazine est produite par un *Bacillus* et expliquerait la faible teneur à 0 h comparée à 48 ou 96 h de fermentation (Tableau XXXVII). En effet, les analyses sont réalisées sur du cacao non torréfié. Les micro-organismes ont un impact positif sur la production des composés volatils d'intérêt du cacao.

Les micro-organismes ont une influence positive sur la qualité du cacao et principalement les levures. Dans la partie suivante, nous allons étudier l'activité de souches de levures sur la production de composés volatils.

3. Composés volatils des levures isolées sur les cacaos non torréfiés

Il est donc important maintenant d'identifier les composés aromatiques produits par les levures isolées du cacao de Madagascar. Après avoir mis en place un procédé de production d'un milieu de culture à partir de cacao malgache, une analyse des composés volatils produits par diverses levures isolées du cacao de Madagascar est réalisée lorsqu'elles se développent sur milieu de culture cacaoté.

Après optimisation de différents paramètres (pH, température, solvant d'extraction), 3 milieux à base d'extrait de cacao sont retenus : un milieu de Sabouraud avec 1 % d'Eeth-30 (Extrait éthanolique 30 °C) (SabKKOEtOH1), un milieu de Sabouraud comportant 5 % d'Eeth-30 (SabKKOEtOH5) et un milieu de Sabouraud comportant 20 % d'Eaq6-4 (Extrait aqueux pH 6, 4 °C) (SabKKOAq20). Ensuite, une analyse qualitative et semi-quantitative des composés volatils produits par les levures indigènes du cacao malgache lorsqu'elles se développent sur le milieu de référence (Sabouraud) ou sur les milieux cacaotés préparés (SabKKOEtOH5, SabKKOEtOH1 et SabKKOAq20) est effectuée. A titre de contrôle, nous avons également étudié l'influence que peut avoir la présence de 5 % d'éthanol dans le milieu à l'aide d'un milieu Sabouraud additionné de 5 % d'éthanol absolu (SabEtOH5).

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi d'analyser les souches de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Hanseniaspora opuntiae* et de *Torulaspora delbrueckii* que nous avons isolées des fèves de cacao de Madagascar (Tableau XXXVI). Ces souches présentent un intérêt particulier car elles sont connues pour produire des arômes spécifiques comme le 2-phényléthanol (2-PE), l'acétate de 2-phényléthyle (Ac-2-PE), l'hexanoate d'éthyle ou encore l'octanoate d'éthyle. Les quantités de composés volatils produites sont présentées dans le Tableau XXXIX. Ces composés sont des marqueurs de qualité qui présentent des notes olfactives caractéristiques, à savoir : florale pour le 2-phényléthanol et fruitée pour l'acétate de 2-phényléthyle.

Tableau XXXIX. *Résultats d'analyse en CG-SM après SPME des composés volatils produits par les levures étudiées sur milieux Sab, SabEtOH5, SabKKOEtOH5, SabKKOEtOH1 et SabKKOAq20*

	Composés	Tiglate d'éthyle (µg/L)	Hexanoate d'éthyle (µg/L)	2-phényléthanol (µg/L)	Octanoate d'éthyle (µg/L)	Acétate de 2-phényléthyle (µg/L)
	Tr(min)	10,580	14,674	20,490	24,246	26,440
	IRRth	929	1002	1107	1196	1265
	IRRexp	894	900	1039	1133	1193
H. opuntiae	Sab	-	-	6,52	-	494,97
	SabEtOH5	-	-	-	-	13,99
	SabKKOEtOH5	-	-	-	-	12,09
	SabKKOEtOH1	-	-	-	-	125,55
	SabKKOAq20	-	-	-	-	53,56
S. cerevisiae	Sab	-	-	-	-	-
	SabEtOH5	-	-	-	8,66	-
	SabKKOEtOH5	-	2,80	-	6,28	-
	SabKKOEtOH1	-	-	-	-	-
	SabKKOAq20	-	-	-	-	-
T. delbrueckii	Sab	42,75	-	-	-	-
	SabEtOH5	-	-	-	-	-
	SabKKOEtOH5	-	-	-	-	-
	SabKKOEtOH1	26,46	85,69	-	-	-
	SabKKOAq20	-	-	-	-	-

Ce tableau montre que sur milieu Sabouraud, *H. opuntiae* produit peu de 2-PE et une quantité relativement importante d'Ac-2-PE. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature puisque les espèces du genre *Hanseniaspora* sont connues pour être de bons producteurs d'Ac-2-PE (Rojas *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2011).

Il n'y a pas de production de composés volatils par *S. cerevisiae* sur le milieu Sabouraud. Ceci est particulièrement surprenant puisque les souches de *S. cerevisiae* sont souvent associées à la production d'un certain nombre de substances volatiles sous formes d'aldéhydes (acétaldéhyde, nonanal, ...), de cétones (2,3-butanedione, acétoïne, ...), d'alcools (butan-1-ol, phényléthanol, ...) ou d'esters (acétate d'éthyle, octanoate d'éthyle, ...) (Patrignani *et al.*, 2016). Cependant, ces composés ont souvent été observés sur des matrices alcoolisées comme du vin ou de la bière. Il est donc possible que le milieu Sabouraud n'offre pas tous les précurseurs (notamment l'éthanol) dont a besoin *S. cerevisiae* pour produire l'ensemble de ces composés volatils. Par contre, lorsqu'elles se développent sur les milieux SabEtOH5 et SabKKOEtOH5, une production d'hexanoate d'éthyle et/ou d'octanoate d'éthyle est observée. Comme ces composés ne se retrouvent ni sur milieu Sabouraud, ni sur milieu SabKKOAq20, ils sont probablement issus de la transformation de l'éthanol par *S. cerevisiae*. Ce résultat est cohérent avec la littérature puisque les esters éthyliques d'acide gras sont décrits comme étant issus de la condensation d'un acyl-CoA et d'une molécule d'éthanol sous l'effet d'une acyl-CoA :

éthanol acyltransférase (Saerens *et al.*, 2010). Comme pour le milieu Sabouraud, aucun composé volatil n'est produit sur milieu SabKKOAq20 par *S. cerevisiae*. Les productions d'hexanoate d'éthyle et d'octanoate d'éthyle par cette levure nécessitent donc de l'éthanol dans le milieu.

Torulaspora delbrueckii ne produit ni Ac-2-PE, ni 2-PE sur milieu Sabouraud mais uniquement du tiglate d'éthyle. La production d'Ac-2-PE n'a été que très rarement observée pour ces souches (Renault, 2010; Visintin *et al.*, 2017). Par contre l'absence de production de 2-PE est très surprenante puisque *T. delbrueckii* est connue pour être un bon producteur de 2-PE. La production de tiglate d'éthyle est inexistante sur SabEtOH5, SabKKOEtOH5 et SabKKOAq20 mais elle est présente sur SabKKOEtOH1, en même temps que la production d'hexanoate d'éthyle. Ce résultat suggère que le mode de fonctionnement de *T. delbrueckii* est fortement impacté par des teneurs en éthanol de 5 %. De plus, cela semble confirmer la nécessité de la présence d'éthanol dans le milieu pour la production d'hexanoate d'éthyle par les levures. Ceci est d'autant plus probable qu'une forte production d'hexanoate d'éthyle par *T. delbrueckii* a déjà été observée en production de vin (Renault, 2010).

Nous avons par ailleurs effectué une comparaison des composés volatils produits par les levures sur milieu cacaoté avec ceux des fèves de cacao de Madagascar après torréfaction. Sur les 5 composés volatils majoritairement produits par les souches sélectionnées, seul le tiglate d'éthyle n'est pas retrouvé dans le profil aromatique des fèves de cacao torréfiées. Cependant, ce composé produit par les levures a été analysé après seulement 24 h d'incubation. Il est donc possible qu'il serve de précurseur à la formation d'autres composés pendant la fermentation du cacao. De même, on peut penser que lors de la torréfaction des fèves, cette substance disparaisse. Ainsi, le tiglate d'éthyle ne semble pas participer directement au profil aromatique des fèves de cacao, mais il est peut être un acteur indirect de son élaboration. A l'inverse, le 2-PE et l'Ac-2-PE sont les composés majoritaires de la fraction volatile des fèves de cacao malgache torréfiées. L'octanoate d'éthyle y est également retrouvé, mais en plus faible concentration. La présence de 2-PE et d'Ac-2-PE sur les fèves de cacao torréfiées semble donc avoir une origine fermentaire. Ce résultat est cohérent avec le métabolisme des levures puisque la capacité de ces dernières à transformer d'abord la L-phénylalanine en 2-PE puis en Ac-2-PE selon la voie d'Ehrlich a déjà été largement démontrée (Berger, 2007).

Une analyse sensorielle sur des liqueurs de cacao malgache torréfié ayant fermenté pendant 96 h a permis de décrire l'arôme du cacao comme étant boisé et fruité. Ceci est cohérent

avec la présence de 2-PE, d'Ac-2-PE et d'octanoate d'éthyle dans les fractions volatiles produites par les levures puisque tous ces composés sont associés à ce type d'odeur.

En effet, l'Ac-2-PE et le 2-PE qui sont les constituants contribuant le plus à la flaveur du cacao de diverses variétés (Aprotosoaie *et al.*, 2016) offrent des sensations florales et fruitées en bouche et au nez qui ont été mentionnées par le panel de consommateur qui a analysé les fèves de cacao malgache torréfiées. Or, ces sensations ont des influences significativement positives sur la qualité aromatique du cacao malgache. L'octanoate d'éthyle offre aussi des notes fruitées et florales. Cependant, l'octanoate d'éthyle est associée à des notes de vert qui influencent de façon significativement négative la qualité aromatique du cacao malgache. La levure productrice d'Ac-2-PE et de 2-PE (*H. opuntiae*) semble exercer des influences positives sur la flaveur du cacao malgache. L'influence de *S. cerevisiae* est aussi positive avec les notes florale et fruitée confirmée avec une étude récente (Assi-Clair *et al.*, 2019).

Des analyses semi-quantitatives des composés volatils ont ainsi été réalisées pour les souches *H. opuntiae* et *T. delbrueckii* en croissance sur Sabouraud et sur SabKKOEtOH1 après 96 h de fermentation. Pour ce faire, une technique d'extraction liquide-liquide complétée par une étape de concentration des composés volatils sous flux d'azote avant analyse en CG-SM a été développée. Cette approche permet en effet de quantifier de manière plus précise les composés par rapport à la SPME, mais aussi de détecter en CG-SM les substances minoritaires produites dans le milieu.

Pour évaluer la quantité des composés volatils émise, et de distinguer les composés produits par les souches et ceux qui ne le sont pas, les analyses ont été réalisées sur des extraits de surnageant totaux (EST) obtenus par extraction directe des composés dans le milieu de culture liquide mais aussi sur des extraits culot totaux (ECT) obtenus après lyse des cellules par ultrasons avant extraction des composés volatils. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau XL.

Tableau XL. *Capacité de H. opuntiae et de T. delbrueckii à produire des composés volatils sur milieu Sabouraud et Sabouraud enrichie en extrait de cacao et éthanol à 1 % (SabKKOEtOH1)*

			3-méthylbutan-1-ol	3-méthylthiopropan-1-ol	2-phényléthanol	Acétate de 2-phényléthyle	Undécan-1-ol
		IRRth	734	980	1117	1256	1371
		IRRexp	-	976	1113	1255	1319
H. opuntiae	Sab	EST (mg/g)	3,85 ± 1,58	-	11,05 ± 2,61	2,24 ± 0,69	-
		ECT (mg/g)	-	-	-	-	-
		Total (mg/g)	3,85 ± 1,12	-	11,05 ± 1,85	2,24 ± 0,49	-
	SabKKOEtOH1	EST (mg/g)	-	-	0,23 ± 0,12	0,75 ± 0,41	-
		ECT (mg/g)	-	-	-	-	-
		Total (mg/g)	-	-	0,23 ± 0,08	0,75 ± 0,28	-
T. delbrueckii	Sab	EST (mg/g)	10,24 ± 1,67	0,34 ± 0,19	8,74 ± 3,23	0,26 ± 0,04	0,09 ± 0,04
		ECT (mg/g)	-	-	0,11 ± 0,08	0,10 ± 0,07	0,07 ± 0,04
		Total (mg/g)	10,24 ± 1,18	0,34 ± 0,13	8,85 ± 2,28	0,36 ± 0,05	0,16 ± 0,04
	SabKKOEtOH1	EST (mg/g)	0,82 ± 0,2	-	1,21 ± 0,72	0,73 ± 0,09	-
		ECT (mg/g)	-	-	-	0,17 ± 0,06	-
		Total (mg/g)	0,82 ± 0,14	-	1,21 ± 0,51	0,90 ± 0,08	-

Parmi les 5 composés produits par *H. opuntiae* et *T. delbrueckii*, nous recensons 4 alcools et un ester. Ce résultat est assez surprenant puisque les esters sont les composés volatils majoritairement produits pendant la fermentation du cacao (Aprotosoaie *et al.*, 2016). Trois hypothèses sont avancées pour expliquer ce phénomène.

La première serait que, dans ces conditions de cultures spécifiques, les acétates produits sont directement hydrolysés en alcools et en acide acétique. En effet, il est important de rappeler que dans cette étude, les levures ont été mises en culture dans des milieux liquides légèrement acides (le pH du milieu Sabouraud est de 6). Ainsi, lorsque les composés volatils sont produits, ils sont directement excrétés dans le milieu et subissent l'acidité de ce dernier.

Aussi, les nouvelles conditions de culture peuvent entraîner une modification de la synthèse d'acétate. En effet, de façon générale, 3 facteurs sont importants à la formation de ces composés : les concentrations des deux substrats nécessaires (l'acétyl-CoA et les alcools supérieurs) et l'activité totale des enzymes impliquées dans la formation et la destruction des acétates concernés (Saerens *et al.*, 2010). Ainsi, la seconde hypothèse serait que les nouvelles conditions de cultures entraînent une diminution de la production d'acétyl-CoA et/ou d'alcools supérieurs qui entraîne une baisse de production d'acétate.

Enfin, la troisième hypothèse serait que ces conditions sont à l'origine d'une baisse d'activité des acétyltransférases qui catalysent la transformation des alcools en acétates. Cette dernière hypothèse est la plus probable selon une étude qui a montré que les alcools acétyltransférases sont les facteurs les plus déterminants pour le taux de production d'acétate pendant la fermentation de *S. cerevisiae* (Verstrepen *et al.*, 2003).

Ces 3 hypothèses permettraient d'expliquer la présence de 2-PE nettement plus importantes que d'Ac-2-PE lorsque les souches se développent sur un milieu Sabouraud. Lorsqu'elles sont cultivées sur milieu Sabouraud, les souches de *H. opuntiae* produisent au total 17,14 ± 1,28 mg/g de composés volatils répartis en 3 substances dont 86,9 % d'alcools sous forme de 2-PE et de 3-méthylbutan-1-ol (3-MB) et 13,1 % d'esters sous forme d'Ac-2-PE. Comme la présence de 3-MB n'a pas été observée dans la section 3 du CHAPITRE V pour cette souche, la production de cette substance par *H. opuntiae* nécessite probablement un temps de fermentation plus long comparée à la production d'Ac-2-PE et de 2-PE. Ce temps serait donc compris entre 48 et 96 h de fermentation. Ceci pourrait par exemple s'expliquer par une affinité plus faible des transaminases présentes dans ces levures pour la leucine (acide aminé précurseur du 3-MB) par rapport à la phénylalanine. Ainsi, la production de 3-MB ne démarrerait qu'après l'épuisement de phénylalanine dans le milieu.

Lorsque *H. opuntiae* se développe sur milieu SabKKOEtOH1, une perte de production totale de composés proche de 94 % est observée et le 3-MB n'est plus produit. Ce résultat suggère une forte influence du milieu cacaoté sur le mode de fonctionnement de *H. opuntiae* et vient confirmer l'hypothèse qu'il existe une substance inhibitrice des levures dans la poudre de cacao qui, bien que non létale, pourrait retarder ou dégrader leur capacité à produire des composés volatils tant du point de vue quantitatif que qualitatif. De plus, contrairement à ce qui est observé sur Sabouraud, la production d'Ac-2-PE sur milieu SabKKOEtOH1 est trois fois plus importante que celle de 2-PE. Ceci discrédite l'hypothèse émise précédemment selon laquelle l'acidité du milieu liquide entraîne une hydrolyse des acétates en alcools et en esters. En effet, le milieu SabKKOEtOH1 (pH≈5,81) étant plus acide que le milieu Sabouraud (pH=6), si cette hypothèse était avérée, le taux d'acétate hydrolysé en éthanol dans le milieu SabKKOEtOH1 aurait dû être supérieur à celui observé dans le milieu Sabouraud. Il est donc possible que la production d'Acétyl-CoA (co-substrat pour la production d'acétate avec l'éthanol) et/ou l'activité des enzymes responsables de la production d'Ac-2-PE (alcool acétyltransférase) soient augmentées en présence d'extrait de cacao. Ces augmentations peuvent être dues à une baisse de pH. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser un suivi des teneurs en Ac-2-PE, en 2-PE et en Acétyl-CoA produits pendant la fermentation en fonction du pH du milieu.

T. delbrueckii produit 19,92 ± 1,15 mg/g de composés volatils répartis en 98 % d'alcools et 2 % d'acétate. Dans ce cas également, les très faibles teneurs en acétate semblent confirmer l'hypothèse de l'inhibition de la production de ce type de composés en milieu liquide. Par rapport à l'étude précédente, *T. delbrueckii* ne produit plus de tiglate d'éthyle sur le milieu

Sabouraud. Or, la production de tiglate d'éthyle à partir d'isoleucine chez les levures est le résultat de la déviation d'acide 2-oxo-3-méthylpentanoïque produit après transamination de l'isoleucine vers une autre voie métabolique que la voie d'Ehrlich (Grondin, 2014). Les nouvelles conditions de culture ont probablement entraîné une baisse d'affinité des transaminases présentes dans les souches de *T. delbrueckii* pour l'isoleucine. Cinq nouveaux composés sont produits par les souches de *T. delbrueckii* lorsqu'elles se développent sur milieu liquide : le 3-MB, le 3-méthylthiopropan-1-ol, le 2-PE, l'Ac-2-PE et l'undécan-1-ol. Excepté pour l'undécan-1-ol, tous ces composés sont des produits issus de la voie de biosynthèse des acides aminés (voie d'Ehrlich). Il semblerait donc que l'activation de cette voie pour ces souches nécessite un milieu de culture liquide et/ou un développement plus long des levures (compris entre 48 et 96 h). En ce qui concerne la production d'undécan-1-ol, il pourrait s'agir du résultat de la réduction d'un acide gras (acide undécanoïque) de la paroi cellulaire des cellules en alcool. Ceci est d'autant plus probable qu'environ 50 % de la quantité totale d'undécan-1-ol produit par *T. delbrueckii* est retrouvé dans l'ECT, après lyse des cellules. En croissance sur le milieu SabKKOEtOH1, *T. delbrueckii* présente une diminution de 85 % de la production totale en composés volatils et seuls 3 composés sont produits, à savoir le 3-MB, le 2-PE et l'Ac-2-PE. L'extrait de cacao semble donc avoir un effet inhibiteur plus faible sur la production de 3-MB chez *T. delbrueckii* que pour *H. opuntiae*. Par contre, comme pour *H. opuntiae*, la production d'Ac-2-PE par *T. delbrueckii* est plus importante sur milieu SabKKOEtOH1 que sur milieu Sabouraud. Ceci renforce une nouvelle fois l'hypothèse de la surexpression d'une enzyme impliquée dans la production d'Ac-2-PE en présence d'extrait de cacao. De plus, contrairement aux autres souches, lorsque *T. delbrueckii* se développe sur milieu SabKKOEtOH1, la production de 2-PE est toujours plus importante que celle d'Ac-2-PE. Il semblerait donc que l'effet inhibiteur de l'extrait de cacao sur la production de 2-PE de *T. delbrueckii* soit moins important que pour les autres souches.

La comparaison des composés volatils produits par les levures sur milieu cacaoté avec ceux des fèves de cacao de Madagascar après torréfaction montre que parmi les 5 substances volatiles produites par les 2 levures étudiées, 2 ne sont pas directement retrouvées sur milieu SabKKOEtOH1 en l'occurrence le 3-méthylthiopropan-1-ol et l'undécan-1-ol. L'influence du 3-MB produit par *T. delbrueckii* sur milieu SabKKOEtOH1 sera abordée. Chez les levures, l'acétate de 3-méthylbutyle est obtenu en présence d'acide acétique sous l'action d'une alcool acétyltransférase sur du 3-MB issu de la transformation de leucine via la voie d'Ehrlich. Le 3-MB est un précurseur d'Ac-3-MB qui est associé à des odeurs fruitées retrouvées sur le cacao

de Madagascar et qui influence positivement la flaveur de ce dernier. *T. delbrueckii* semble donc exercer une influence positive sur la qualité aromatique du cacao malgache via la production d'un précurseur d'Ac-3-MB. L'Ac-3-MB peut se former lorsque la concentration en acide acétique dans le milieu augmente, c'est-à-dire lorsque la fermentation acétique prend place dans le milieu. Cependant, pour pouvoir valider cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser des co-fermentations de levures avec des bactéries acétiques et d'analyser les composés issus de cette co-fermentation.

4. Corrélation entre les souches levuriennes revivifiables et les composés volatils de la poudre de cacao

Dans cette partie, nous avons étudié la corrélation entre les souches levuriennes revivifiables et les composés volatils identifiés dans la poudre de cacao non torréfié. L'Analyse des Correspondances Multiples est l'analyse des données choisie car elle permet d'analyser des données qualitatives de natures différentes. Pour cela, les variables prises en compte sont les 16 souches de levure présentées plus haut avec le tableau « absence/présence » (Tableau XXXVI) et les composés volatils dont les teneurs sont remplacées par 3 lettres et 1 chiffre qui correspondent à l'odeur et une échelle des teneurs. Afin de réduire le nombre de composés volatils, seuls les composés d'origine fermentaire ont été conservés car ils sont produits par des souches, ainsi que ceux ayant une note olfactive de type fruité, florale, cacao ou chocolat. Les 6 composés suivants ont été éliminés car d'origine de constitution c'est-à-dire présents sur les fèves fraîches et non produites par les souches à savoir le pentan-2-ol, l'heptan-2-ol, l'heptan-2-one, la nonan-2-one, l'acétophénone et la butyrolactone. De même, les 8 composés suivants ont été éliminés car ils présentent une note olfactive différente de celles voulues ou non déterminée (ND) : le diacétate de propane-1,3-diol (ND), l'acide acétique (note d'aigre, de vinaigre), l'acide 3-méthylbutanoïque (note de sueur, de rance), l'acide hexanoïque (note de sueur, de piquant), l'éthanol (note alcoolique), le benzaldéhyde (note de noisette), l'acétoïne (note de rance) et la butyrolactone (note crémeuse) (Bonvehí, 2005; Frauendorfer et Schieberle,

2006; Afoakwa *et al.*, 2009). Au final, sur les 32 composés volatils de départ, seuls 18 présentaient un intérêt particulier et ont été sélectionnés pour cette analyse. Ces 18 composés retenus ainsi que les 16 souches de levure présentes parmi les 16 échantillons de fèves fraîches de cacao sont présentés dans le Tableau XLI. Dans ce tableau, les 3 lettres sont l'abréviation de la note olfactive issue de la littérature (Fru = Fruité ; Flo = Floral ; Cac = Cacao et Cho = Chocolat) et le chiffre correspond à une classe (en ppm) des teneurs initiales (0 = 0 ppm ; 1 =]0,1] ; 2 =]1,5] ; 3 =]5,10] ; 4 =]10,50] ; 5 =]50,100] et 6 =]100,650]).

Tableau XLI. *16 souches levuriennes revivifiables et 18 composés volatils des 16 échantillons de cacao non torréfié*

	Candida rugosa	*Candida sorbosivorans*	*Clavispora lusitaniae*	*Hanseniaspora meyeri*	*Hanseniaspora opuntiae*	*Hanseniaspora thailandica*	*Hanseniaspora valbyensis*	*Pichia galeiformis*	*Pichia manshurica*	*Pichia* sp.	*Saccharomyces cerevisiae*	*Torulaspora delbrueckii*	*Uncultured fungus*	*Wickerhamomyces anomalus*	*Zygoascus hellenicus*	*Zygoascus meyerae*	Acétate de méthyle (Est 1)	Acétate d'éthyle (Est 2)	Acétate de butyle (Est 3)	Acétate de 3-méthylbutyle (Est 4)	Hexanoate d'éthyle (Est 5)	Acétate d'heptan-2-ol (Est 6)	Octanoate d'éthyle (Est 7)	Acétate d'éthylphényle (Est 8)	Acétate de 2-phényléthyle (Est 9)	Alcool isoamylique (Alc 2)	Alcool benzylique (Alc 4)	2-phényléthanol (Alc 5)	2,3-diméthylpyrazine (Pyr 1)	2,3,5-triméthylpyrazine (Pyr 2)	Tétraméthylpyrazine (Pyr 3)	2-méthylbutanal (Ald 1)	3-méthylbutanal (Ald 2)	2-acétylpyrrole (Hét)
214-ci-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Fru 2	Fru 1	Fru 1	Fru 2	Fru 1	Fru 0	Fru 0	Flo 0	Flo 1	Cho 2	Flo 1	Flo 2	Cac 1	Cac 1	Cho 1	Cho 2	Cho 2	Cac 1
223-ci-48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Fru 4	Fru 2	Fru 1	Fru 4	Fru 2	Fru 2	Fru 1	Flo 2	Flo 2	Cho 3	Flo 1	Flo 5	Cac 2	Cac 4	Cho 6	Cho 4	Cho 4	Cac 3
227-tc-48	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	Fru 4	Fru 1	Fru 1	Fru 3	Fru 2	Fru 2	Fru 2	Flo 1	Flo 2	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 3	Cac 4	Cho 6	Cho 4	Cho 4	Cac 2
228-tc-96	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	Fru 4	Fru 6	Fru 1	Fru 4	Fru 2	Fru 2	Fru 2	Flo 2	Flo 3	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 2	Cac 4	Cho 6	Cho 3	Cho 3	Cac 3
232-tc-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Fru 4	Fru 1	Fru 1	Fru 4	Fru 2	Fru 2	Fru 3	Flo 2	Flo 2	Cho 3	Flo 1	Flo 4	Cac 2	Cac 4	Cho 6	Cho 4	Cho 4	Cac 2
233-tc-96	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	Fru 4	Fru 4	Fru 1	Fru 5	Fru 2	Fru 2	Fru 3	Flo 2	Flo 3	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 2	Cac 4	Cho 6	Cho 3	Cho 3	Cac 2
236-tc-0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	Fru 4	Fru 4	Fru 1	Fru 3	Fru 0	Fru 1	Fru 0	Flo 0	Flo 1	Cho 3	Flo 1	Flo 5	Cac 2	Cac 2	Cho 2	Cho 4	Cho 4	Cac 1
237-tc-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	Fru 4	Fru 2	Fru 2	Fru 3	Fru 2	Fru 2	Fru 2	Flo 1	Flo 1	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 2	Cac 3	Cho 5	Cho 4	Cho 4	Cac 2
241-tf-0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	Fru 2	Fru 1	Fru 1	Fru 2	Fru 1	Fru 1	Fru 0	Flo 1	Flo 1	Cho 1	Flo 0	Flo 2	Cac 1	Cac 1	Cho 2	Cho 3	Cho 2	Cac 1
242-tf-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Fru 3	Fru 4	Fru 1	Fru 4	Fru 2	Fru 2	Fru 2	Flo 1	Flo 2	Cho 2	Flo 1	Flo 3	Cac 1	Cac 2	Cho 4	Cho 2	Cho 2	Cac 2
243-tf-96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Fru 4	Fru 5	Fru 1	Fru 5	Fru 3	Fru 2	Fru 3	Flo 2	Flo 4	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 2	Cac 4	Cho 5	Cho 3	Cho 3	Cac 2
246-tf-0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	Fru 3	Fru 1	Fru 1	Fru 3	Fru 1	Fru 1	Fru 0	Flo 0	Flo 1	Cho 1	Flo 0	Flo 0	Cac 1	Cac 1	Cho 2	Cho 3	Cho 2	Cac 1
247-tf-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Fru 3	Fru 2	Fru 1	Fru 4	Fru 2	Fru 2	Fru 2	Flo 1	Flo 2	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 1	Cac 2	Cho 3	Cho 4	Cho 4	Cac 2
248-tf-96	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Fru 4	Fru 4	Fru 1	Fru 5	Fru 2	Fru 2	Fru 3	Flo 2	Flo 3	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 2	Cac 4	Cho 6	Cho 4	Cho 3	Cac 2
252-tf-48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Fru 4	Fru 2	Fru 1	Fru 4	Fru 2	Fru 2	Fru 2	Flo 1	Flo 1	Cho 2	Flo 1	Flo 3	Cac 2	Cac 4	Cho 6	Cho 4	Cho 4	Cac 2
253-tf-96	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Fru 4	Fru 5	Fru 1	Fru 5	Fru 2	Fru 3	Fru 2	Flo 2	Flo 3	Cho 2	Flo 1	Flo 4	Cac 2	Cac 4	Cho 6	Cho 4	Cho 4	Cac 3

Une représentation graphique des échantillons obtenue par l'ACM est affichée (Figure 32).

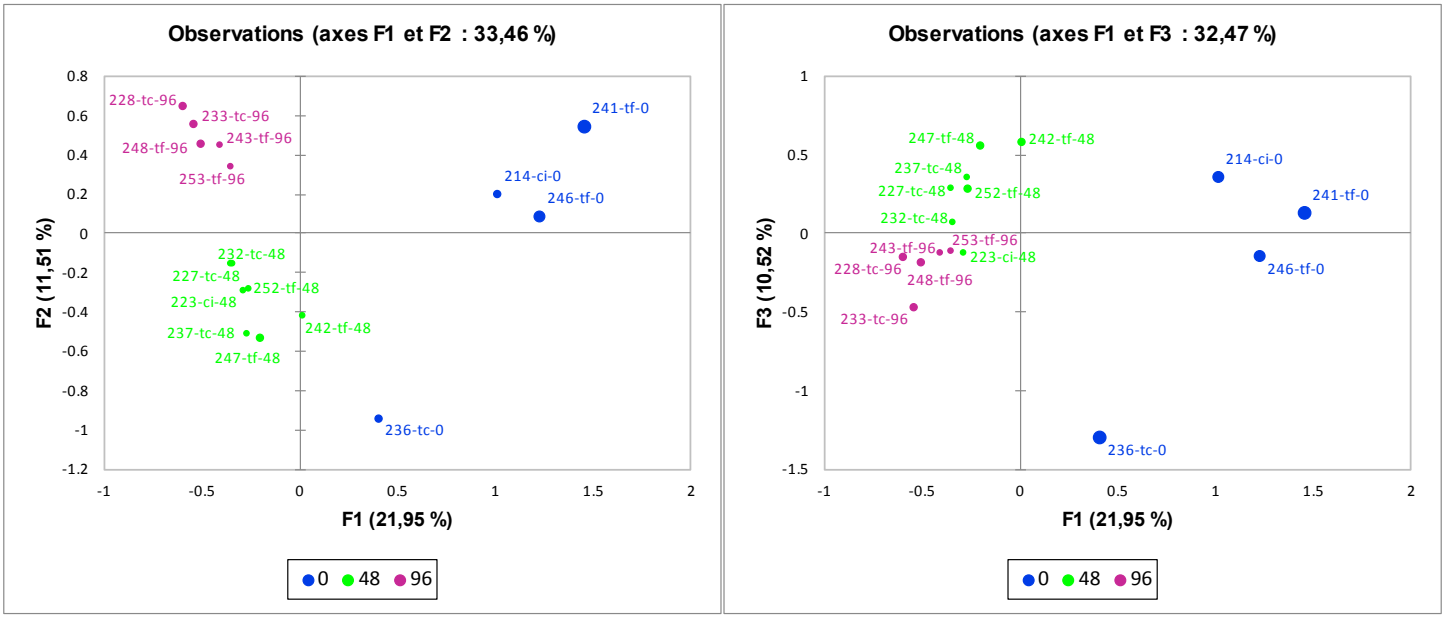


Figure 32. ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié (colorés par temps de fermentation) selon les axes F1/F2 et F1/F3

Les axes F1 et F2 représentent 33,46 % de l'information. Trois groupes distincts d'échantillons ont ainsi été extraits de cette analyse en fonction du temps de fermentation : le groupe des 0 h (avec l'échantillon 236-tc-0 séparé des 3 autres), celui des 48 h et enfin celui des 96 h particulièrement bien regroupé. La position de l'échantillon 236-tc-0 proviendrait des teneurs ayant une allure différente des autres échantillons fermentés 0 h notamment avec des concentrations élevées en éthanol, en 2-phényléthanol, en acétate de méthyle et en acétate d'éthyle. Bien que la fermentation des échantillons de Criollo dure 96 h contrairement aux Trinitario qui dure 144 h, les échantillons de 0 h et 48 h de Criollo sont regroupés avec ceux des Trinitario. Il n'y a pas d'échantillon de 96 h de Criollo.

De même, la représentation des échantillons selon les axes F1 et F3 contribue à 32, 47 % et fait apparaître les groupes suivant le temps de fermentation (l'échantillon 236-tc-0 toujours séparé des 3 autres échantillons fermentés 0 h). Cependant, les groupes d'échantillons fermentés 48 et 96 h sont proches contrairement à la représentation des axes F1 et F2 où ils sont bien distincts.

Dans la Figure 33, c'est la même que la Figure 32 avec les échantillons colorés suivant la variété.

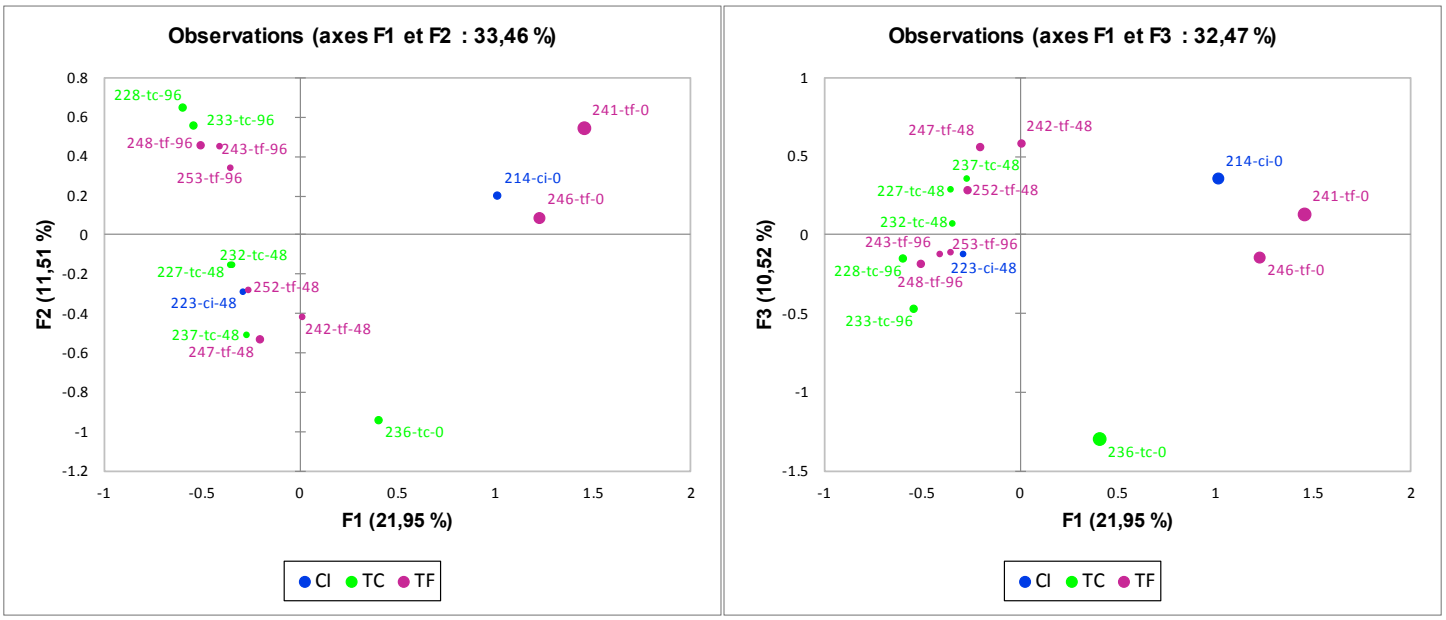


Figure 33. ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié (colorés par variété) selon les axes F1/F2 et F1/F3

Parmi les 3 groupes de fermentation, nous avons isolés plusieurs sous-groupes selon la variété : Criollo, Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée. L'échantillon de Criollo fermenté 48 h (223-ci-48) appartient au groupe des 48 h dans la représentation F1/F2 tandis qu'il appartient au groupe des 96 h dans la représentation F1/F3. Cette particularité pourrait s'expliquer par le fait que les Criollo sont fermentés moins longtemps que les Trinitario et donc que les souches levuriennes et les composés volatils sont semblables en milieu de fermentation (48 h pour les Criollo et 96 h pour les Trinitario).

En comparant la Figure 32 avec la Figure 33, nous observons que les échantillons sont principalement séparés selon le temps de fermentation et secondairement suivant la variété. L'étape suivante consiste donc à corréler les échantillons suivant les souches de levure et les composés volatils. Pour cela, la significativité des valeurs test des variables a été calculée (Tableau XLII).

Tableau XLII. *Valeurs test des différentes variables aux composantes F1 à F14 de l'ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié*

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
C. rugosa -0	0,93	-1,40	0,34	1,21	-0,76	0,97	-1,77	1,32	-0,82	-0,81	-1,36	-0,65	0,61	0,04
C. rugosa -1	-0,93	1,40	-0,34	-1,21	0,76	-0,97	1,77	-1,32	0,82	0,81	1,36	0,65	-0,61	-0,04
C. sorbosivorans -0	1,41	-1,26	0,08	1,01	-0,72	0,73	-1,42	-0,89	0,80	0,84	-1,13	-1,77	0,15	-0,51
C. sorbosivorans -1	-1,41	1,26	-0,08	-1,01	0,72	-0,73	1,42	0,89	-0,80	-0,84	1,13	1,77	-0,15	0,51
C. lusitaniae -0	-1,78	-0,83	0,31	-1,01	**-2,42**	-1,25	0,60	0,73	-0,60	0,38	0,37	0,54	-0,48	-0,65
C. lusitaniae -1	1,78	0,83	-0,31	1,01	**2,42**	1,25	-0,60	-0,73	0,60	-0,38	-0,37	-0,54	0,48	0,65
H. meyeri -0	0,84	-1,20	1,06	0,68	0,76	1,11	0,02	-0,68	-0,29	-0,26	**2,17**	1,95	-0,46	-0,10
H. meyeri -1	-0,84	1,20	-1,06	-0,68	-0,76	-1,11	-0,02	0,68	0,29	0,26	**-2,17**	-1,95	0,46	0,10
H. opuntiae -0	0,15	0,61	**2,94**	0,77	1,01	0,75	-0,17	-0,80	-0,39	-0,27	0,91	1,39	-0,29	-0,04
H. opuntiae -1	-0,15	-0,61	**-2,94**	-0,77	-1,01	-0,75	0,17	0,80	0,39	0,27	-0,91	-1,39	0,29	0,04
H. thailandica -0	-0,64	**2,04**	**2,95**	0,38	0,62	-0,08	-0,25	-0,42	-0,24	-0,11	-0,93	-0,05	0,06	0,05
H. thailandica -1	0,64	**-2,04**	**-2,95**	-0,38	-0,62	0,08	0,25	0,42	0,24	0,11	0,93	0,05	-0,06	-0,05
H. valbyensis -0	**-2,28**	-1,18	-0,30	-0,58	-0,74	-0,67	-0,35	-1,91	-1,09	-1,40	-0,17	-0,06	-0,16	-0,13
H. valbyensis -1	**2,28**	1,18	0,30	0,58	0,74	0,67	0,35	1,91	1,09	1,40	0,17	0,06	0,16	0,13
P. galeiformis -0	1,30	-1,90	1,03	1,38	0,00	1,52	-1,29	0,47	-0,81	-0,78	0,59	0,95	0,11	-0,04
P. galeiformis -1	-1,30	1,90	-1,03	-1,38	-0,00	-1,52	1,29	-0,47	0,81	0,78	-0,59	-0,95	-0,11	0,04
P. manshurica -0	1,45	-1,40	0,47	1,42	-0,45	1,60	-1,70	-0,44	0,66	-0,45	-0,10	0,82	-1,01	-0.45
P. manshurica -1	-1,45	1,40	-0,47	-1,42	0,45	-1,60	1,70	0,44	-0,66	0,45	0,10	-0,82	1,01	0,45
Pichia sp.-0	0,78	-0,97	0,43	0,01	0,33	-0,30	0,47	-1,39	-0,07	1,83	0,50	**-2,23**	1,40	-0,20
Pichia sp.-1	-0,78	0,97	-0,43	-0,01	-0,33	0,30	-0,47	1,39	0,07	-1,83	-0,50	**2,23**	-1,40	0,20
S. cerevisiae -0	0,58	1,79	-0,23	0,81	0,73	1,60	-0,38	1,79	1,20	-1,47	0,60	0,30	-0,43	0,25
S. cerevisiae -1	-0,58	-1,79	0,23	-0,81	-0,73	-1,60	0,38	-1,79	-1,20	1,47	-0,60	-0,30	0,43	-0,25
T. delbrueckii -0	-1,93	-0,19	0,34	-0,47	-1,45	1,93	0,96	1,39	0,82	1,11	0,52	-0,15	0,12	0,21
T. delbrueckii -1	1,93	0,19	-0,34	0,47	1,45	-1,93	-0,96	-1,39	-0,82	-1,11	-0,52	0,15	-0,12	-0,21
Uncultured fungus -0	**-2,28**	-1,18	-0,30	-0,58	-0,74	-0,67	-0,35	-1,91	-1,09	-1,40	-0,17	-0,06	-0,16	-0,13
Uncultured fungus -1	**2,28**	1,18	0,30	0,58	0,74	0,67	0,35	1,91	1,09	1,40	0,17	0,06	0,16	0,13
W. anomalus -0	-0,64	**2,04**	**2,95**	0,38	0,62	-0,08	-0,25	-0,42	-0,24	-0,11	-0,93	-0,05	0,06	0,05
W. anomalus -1	0,64	**-2,04**	**-2,95**	-0,38	-0,62	0,08	0,25	0,42	0,24	0,11	0,93	0,05	-0,06	-0,05
Z. hellenisus -0	0,42	1,10	-0,81	**-2,57**	0,78	0,92	-1,73	0,17	-0,85	0,35	0,56	-0,06	0,13	-0,70
Z. hellenisus -1	-0,42	-1,10	0,81	**2,57**	-0,78	-0,92	1,73	-0,17	0,85	-0,35	-0,56	0,06	-0,13	0,70
Z. meyerae -0	0,87	1,13	-1,28	0,70	-1,01	0,11	-0,02	-1,38	**2,34**	-0,48	-0,45	0,77	0,70	-0,20
Z. meyerae -1	-0,87	-1,13	1,28	-0,70	1,01	-0,11	0,02	1,38	**-2,34**	0,48	0,45	-0,77	-0,70	0,20
Est 1-Fru 2	**2,83**	1,18	0,81	-0,33	-1,12	1,35	1,03	0,57	0,07	0,57	0,01	-0,15	-0,13	0,09
Est 1-Fru 3	1,01	-1,16	1,38	-0,99	0,79	-1,78	**-1,97**	-0,59	0,47	-0,47	0,13	-0,38	-0,84	0,62
Est 1-Fru 4	**-2,87**	0,14	-1,74	1,07	0,13	0,54	0,92	0,09	-0,45	-0,01	-0,11	0,43	0,80	-0,58
Est 2-Fru 1	**2,45**	0,60	0,83	-0,29	0,57	0,02	0,63	0,58	**-2,27**	-0,06	-0,19	0,10	0,65	0,02
Est 2-Fru 2	-0,89	-1,95	1,35	1,15	0,66	0,49	0,62	-0,62	0,72	0,70	-1,05	-0,26	-1,04	-0,79
Est 2-Fru 4	-0,54	-0,43	-1,76	-1,44	-1,31	-0,77	-0,98	1,35	1,31	-0,93	-0,89	0,58	0,24	0,71
Est 2-Fru 5	-0,88	1,26	-0,38	1,67	-0,49	1,06	-1,71	-0,79	-0,07	-0,21	1,81	-1,05	0,59	0,11
Est 2-Fru 6	-0,93	1.,40	-0,34	-1,21	0,76	-0,97	1,77	-1,32	0,82	0,81	1,36	0,65	-0,61	-0,04
Est 3-Fru 1	0,42	1,10	-0,81	**-2,57**	0,78	0,92	-1,73	0,17	-0,85	0,35	0,56	-0,06	0,13	-0,70
Est 3-Fru 2	-0,42	-1,10	0,81	**2,57**	-0,78	-0,92	1,73	-0,17	0,85	-0,35	-0,56	0,06	-0,13	0,70
Est 4-Fru 2	**2,83**	1.,18	0,81	-0,33	-1,12	1,35	1,03	0,57	0,07	0,57	0,01	-0,15	-0,13	0,09
Est 4-Fru 3	0,89	-1,83	-1,02	1,27	0,43	-1,83	1,12	0,12	-1,07	-0,94	0,45	0,14	0,82	0,62
Est 4-Fru 4	-1,31	-1,11	1,36	-1,70	1,26	0,40	-0,30	-0,99	0,78	1,39	-0,31	0,56	-0,58	-0,84
Est 4-Fru 5	-1,58	**2,18**	-1,13	0,89	-0,99	0,36	-1,58	0,55	0,15	-1,04	-0,11	-0,64	-0,07	0,26
Est 5-Fru 0	0,64	**-2,04**	**-2,95**	-0,38	-0,62	0,08	0,25	0,42	0,24	0,11	0,93	0,05	-0,06	-0,05
Est 5-Fru 1	**3,59**	1,12	0,48	0,01	-0,05	-0,06	0,28	-0,38	-0,45	-0,21	-0,32	-0,03	-0,18	-0,06
Est 5-Fru 2	**-3,02**	-0,39	1,29	-0,61	1,12	0,09	0,59	0,45	0,72	-0,75	-0,83	-0,20	0,05	0,03
Est 5-Fru 3	-0,64	0,99	-0,28	1,54	-1,43	-0,17	-1,83	-0,66	-0,88	1,65	1,17	0,38	0,26	0,08

Tableau XLII (*suite*)

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
Est 6-Fru 0	1,59	0,43	0,81	-1,03	**-2,28**	1,16	1,06	-1,13	-0,99	-0,63	-0,16	-0,27	-0,33	-0,01
Est 6-Fru 1	**3,00**	-0,41	-1,85	0,41	0,97	-0,73	-0,22	0,58	0,31	0,25	0,36	0,16	-0,01	-0,09
Est 6-Fru 2	**-3,07**	-0,26	1,26	-0,20	-0,02	-0,84	-0,10	0,32	-0,15	1,13	-0,90	0,94	-0,10	0,04
Est 6-Fru 3	-0,56	0,74	-0,24	0,74	0,76	1,61	-0,50	-0,42	0,78	-1,94	1,30	-1,81	0,55	0,07
Est 7-Fru 0	**3,60**	-0,13	-1,22	-0,20	-0,40	-0,00	0,39	-0,11	-0,27	-0,13	0,23	-0,00	-0,20	-0,08
Est 7-Fru 1	-0,46	-0,62	-0,28	0,01	1,39	1,88	0,02	-1,40	0,03	0,97	-1,60	0,62	0,26	1,18
Est 7-Fru 2	-1,55	-0,96	**1,99**	-0,15	0,68	-0,75	0.,90	-0,08	1,18	-0,68	1,71	-0,76	0,49	-0,43
Est 7-Fru 3	-1,57	1,58	-0,90	0,38	-1,16	-0,19	-1,43	0,99	-1,10	0,36	-1,30	0,52	-0,51	-0,08
Est 8-Flo 0	**2,58**	-0,88	-1,54	-0,58	-0,90	-0,42	0,21	-1,30	-0,98	-1,01	0,15	-0,04	-0,32	-0,17
Est 8-Flo 1	0,30	-1,46	**2,48**	0,36	0,31	-0,75	0,46	1,74	0,95	0,58	0,50	-0,17	0,62	-0,39
Est 8-Flo 2	**-2,32**	**2,12**	-1,21	0,10	0,40	1,06	-0,62	-0,67	-0,16	0,23	-0,61	0,19	-0,35	0,52
Est 9-Flo 1	**2,80**	-0,97	-0,37	1,13	-0,69	-0,36	1,25	-0,21	0,46	-0,25	-0,22	0,20	0,09	-1,47
Est 9-Flo 2	-0,96	-1,75	1,62	-1,38	1,25	0,55	-0,76	0,39	-1,05	0,81	-0,38	0,05	0,29	1,31
Est 9-Flo 3	-1,74	**2,41**	-1,16	-0,65	0,24	-0,09	0,44	0,19	1,10	-1,51	-0,00	-0,49	-0,56	0,19
Est 9-Flo 4	-0,64	0,99	-0,28	1,54	-1,43	-0,17	-1,83	-0,66	-0,88	1,65	1,17	0,38	0,26	0,08
Alc 2-Cho 1	**3,08**	1,01	-0,03	0,77	1,60	-0,92	-0,44	0,38	0,20	0,22	-0,26	0,16	0,03	-0,06
Alc 2-Cho 2	**-2,01**	0,85	1,62	-0,26	-1,78	-0,70	0,30	0,05	0,47	-1,01	0,96	-0,61	-0,00	-0,26
Alc 2-Cho 3	-0,22	-1,86	-1,90	-0,34	0,75	1,61	0,02	-0,39	-0,73	1,02	-0,92	0,58	-0,02	0,37
Alc 4-Flo 0	**3,08**	1,01	-0,03	0,77	1,60	-0,92	-0,44	0,38	0,20	0,22	-0,26	0,16	0,03	-0,06
Alc 4-Flo 1	**-3,08**	-1,01	0,03	-0,77	-1,60	0,92	0,44	-0,38	-0,20	-0,22	0,26	-0,16	-0,03	0,06
Alc 5-Flo 0	1,93	0,19	-0,34	0,47	1,45	-1,93	-0,96	-1,39	-0,82	-1,11	-0,52	0,15	-0,12	-0,21
Alc 5-Flo 2	**2,83**	1,18	0,81	-0,33	-1,12	1,35	1,03	0,57	0,07	0,57	0,01	-0,15	-0,13	0,09
Alc 5-Flo 3	-0,29	-1,11	1,41	-1,07	-0,39	-0,32	-1,05	-0,10	1,69	-0,08	-0,11	0,77	1,54	-1,81
Alc 5-Flo 4	**-2,73**	1,16	0,26	0,89	-0,07	-0,70	0,35	0,84	-0,90	-0,31	0,65	-0,81	-0,98	0,70
Alc 5-Flo 5	0,14	-1,95	**-2,36**	-0,27	0,56	1,43	0,20	-0,72	0,19	0,79	-0,49	0,49	0,15	0,83
Pyr 1-Cac 1	**2,87**	-0,14	1,74	-1,07	-0,13	-0,54	-0,92	-0,09	0,45	0,01	0,11	-0,43	-0,80	0,58
Pyr 1-Cac 2	**-2,47**	0,30	**-1,99**	1,22	-0,24	0,78	0,39	-0,59	0,66	0,16	-0,59	0,42	-0,12	-0,89
Pyr 1-Cac 3	-0,56	-0,33	0,65	-0,40	0,73	-0,51	0,99	1,35	**-2,18**	-0,34	0,96	-0,02	1,77	0,67
Pyr 2-Cac 1	**3,59**	1,12	0,48	0,01	-0,05	-0,06	0,28	-0,38	-0,45	-0,21	-0,32	-0,03	-0,18	-0,06
Pyr 2-Cac 2	0,22	**-2,55**	-0,24	-1,52	-0,49	-0,54	-1,22	0,53	1,13	0,28	1,03	-0,44	-0,81	0,72
Pyr 2-Cac 3	-0,42	-1,10	0,81	**2,57**	-0,78	-0,92	1,73	-0,17	0,85	-0,35	-0,56	0,06	-0,13	0,70
Pyr 2-Cac 4	**-2,79**	1,66	-0,58	-0,07	0,81	0,92	-0,10	-0,04	-0,95	0,11	-0,29	0,34	0,84	-0,86
Pyr 3-Cho 1	1,59	0.43	0,81	-1,03	**-2,28**	1,16	1,06	-1,13	-0,99	-0,63	-0,16	-0,27	-0,33	-0,01
Pyr 3-Cho 2	**3,00**	-0,41	-1,85	0,41	0,97	-0,73	-0,22	0,58	0,31	0,25	0,36	0,16	-0,01	-0,09
Pyr 3-Cho 3	-0,31	-1,16	1,25	-0,56	0,47	-0,30	-0,72	0,52	-0,16	0,54	0,57	-1,48	**-2,67**	0,20
Pyr 3-Cho 4	0,01	-0,91	1,30	-1,51	-0,64	-0,65	-1,50	-0,08	1,75	-0,19	0,15	0,72	1,43	1,01
Pyr 3-Cho 5	-0,78	-0,08	0,39	**3,01**	-1,62	-0,80	-0,08	-0,61	-0,03	0,96	0,45	0,32	0,09	0,57
Pyr 3-Cho 6	**-2,46**	1,17	-0,44	-0,81	1,50	0,99	0,79	0,28	-0,51	-0,69	-0,85	0,16	0,71	-0,89
Ald 1-Cho 2	1,17	-0,35	1,55	-1,86	**-2,13**	0,37	-0,33	-0,89	0,55	-0,60	-0,00	0,33	0,81	0,74
Ald 1-Cho 3	0,93	**2,59**	-0,90	0,36	0,40	-1,83	-0,36	-0,41	0,26	1,57	0,01	-0,37	0,08	0,03
Ald 1-Cho 4	-1,65	**-2,18**	-0,19	0,90	1,05	1,46	0,55	0,97	-0,61	-1,07	-0,00	0,12	-0,61	-0,52
Ald 2-Cho 2	**3,25**	0,50	1,16	-0,83	-0,40	-0,42	-0,59	-0,39	0,57	-0,30	-0,20	0,37	0,64	0,51
Ald 2-Cho 3	-1,79	**2,55**	-1,19	-0,20	-0,99	-1,09	-0,31	0,05	0,17	0,50	-0,08	0,73	-0,72	0,19
Ald 2-Cho 4	-1,26	**-2,64**	0,02	0,90	1,20	1,30	0,77	0,29	-0,64	-0,17	0,24	-0,96	0,08	-0,61
Hét-Cac 1	**3,60**	-0,13	-1,22	-0,20	-0,40	-0,00	0,39	-0,11	-0,27	-0,13	0,23	-0,00	-0,20	-0,08
Hét-Cac 2	**-2,19**	-0,62	1,48	0,40	-1,07	-1,22	-0,97	1,63	-0,56	0,19	-0,72	0,26	0,08	-0,52
Hét-Cac 3	-1,21	0,94	-0,53	-0,29	1,80	1,56	0,80	-1,95	1,01	-0,10	0,66	-0,33	0,12	0,75
variété-CI	0,83	-0,14	0,39	-0,75	-0,65	**2,23**	0,79	-1,86	-0,71	0,25	-1,29	0,26	-0,05	0,86
variété-TC	-1,32	-0,60	-1,36	-0,14	-0,12	-1,40	**2,24**	0,66	-0,71	0,52	-0,14	-0,47	0,59	0,42
variété-TF	0,73	0,68	1,06	0,63	0,54	-0,12	**-2,69**	0,59	1,16	-0,67	0,99	0,28	-0,54	-0,97
temps fermentation (h)-0	**3,60**	-0,13	-1,22	-0,20	-0,40	-0,00	0,39	-0,11	-0,27	-0,13	0,23	-0,00	-0,20	-0,08
temps fermentation (h)-48	-1,30	**-2,47**	**2,22**	-0,01	0,84	0,17	0,17	0,25	-0,29	0,62	-0,77	0,24	0,54	-0,13
temps fermentation (h)-96	**-3,97**	**2,77**	-1,23	0,20	-0,53	-0,17	-0,55	-0,17	0,56	-0,55	0,61	-0,26	-0,39	0,22

Les valeurs test des variables significativement positives sont surlignées en bleu et celles négatives en rouge. Elles sont significatives principalement dans les axes F1, F2 et F3.

Selon l'axe F1, il y a une opposition entre les échantillons non fermentés et ceux fermentés 96 h. Les ***échantillons non fermentés*** sont caractérisés par la ***présence*** des souches *Hanseniaspora valbyensis*, l'***absence*** de composés volatils (l'octanoate d'éthyle (Est 7-Fru 0), l'éthylphénylacétate (Est 8-Flo 0), l'alcool benzylique (Alc 4-Flo 0)), ou la ***présence de composés volatils à faible teneur*** (≤ 5 ppm) (l'acétate de méthyle (Est 1-Fru 2), l'acétate d'éthyle (Est 2-Fru 1), l'acétate de 3-méthylbutyle (Est 4-Fru 2), l'hexanoate d'éthyle (Est 5-Fru 1), l'acétate d'heptan-2-ol (Est 6-Fru 1), l'acétate de 2-phényléthyle (Est 9-Flo 1) ; le 3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique) (Alc 2-Cho 1), le 2-phényléthanol (Alc 5-Flo 2) ; la 2,3-diméthylpyrazine (Pyr 1-Cac 1), la 2,3,5-triméthylpyrazine (Pyr 2-Cac 1), la tétraméthylpyrazine (Pyr 3-Cho 2) ; le 3-méthylbutanal (Ald 2-Cho 2) et le 2-acétylpyrrole (Hét-Cac 1). De même, les ***échantillons fermentés 96 h*** sont caractérisés par l'***absence*** de la souche *Hanseniaspora valbyensis*, la ***présence de composés volatils en teneur plus élevée que les échantillons non fermentés*** : l'acétate de méthyle (Est 1-Fru 4), l'hexanoate d'éthyle (Est 5-Fru 2), l'acétate d'heptan-2-ol (Est 6-Fru 2), l'acétate d'éthylphényle (Est 8-Flo 2) ; le 3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique) (Alc 2-Cho 2), l'alcool benzylique (Alc 4-Flo 1), le 2-phényléthanol (Alc 5-Flo 4) ; la 2,3-diméthylpyrazine (Pyr 1-Cac 2), la 2,3,5-triméthylpyrazine (Pyr 2-Cac 4), la tétraméthylpyrazine (Pyr 3-Cho 6) et le 2-acétylpyrrole (Hét-Cac 2).

Selon l'axe F2, il y a une opposition entre les échantillons fermentés 48 et 96 h. Les ***échantillons fermentés 48 h*** sont caractérisés par la ***présence*** des souches *Hanseniaspora thailandica* et *Wickerhamomyces anomalus*, l'***absence*** du composé volatil hexanoate d'éthyle (Est 5-Fru 0), la ***présence de composés volatils autres que les esters*** : la 2,3,5-triméthylpyrazine (Pyr 2-Cac 2), les aldéhydes aux teneurs les plus élevées avec le 2-méthylbutanal (Ald 1-Cho 4) et le 3-méthylbutanal (Ald 2-Cho 4). Les ***échantillons fermentés 96 h*** sont caractérisés par l'***absence*** des souches *Hanseniaspora thailandica* et *Wickerhamomyces anomalus*, la ***présence d'esters à des teneurs élevées*** (l'acétate de 3-méthylbutyle (Est 4-Fru 5), l'acétate d'éthylphényle (Est 8-Flo 2), l'acétate de 2-phényléthyle (Est 9-Flo 3), la ***présence d'aldéhydes à des teneurs moyennes*** (le 2-méthylbutanal (Ald 1-Cho 3) et le 3-méthylbutanal (Ald 2-Cho 3)).

Selon l'axe F3, les ***échantillons fermentés 48 h*** sont caractérisés par l'***absence*** des levures *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora thailandica* et *Wickerhamomyces anomalus* et la ***présence de 2 esters à des teneurs moyennes*** (l'octanoate d'éthyle (Est 7-Fru 2) et l'éthylphénylacétate (Est 8-Flo 1)). Les souches et composés volatils cités précédemment sont corrélés négativement avec l'absence d'hexanoate d'éthyle (Est 5-Fru 0), la présence de 2-phényléthanol (Alc 5-Flo 5) et de 2,3-diméthylpyrazine (Pyr 1-Cac 2).

Selon l'axe F4, il existe une ***corrélation*** entre la présence de la souche *Zygoascus hellenisus* et les composés volatils de type acétate de butyle (Est 3-Fru 2), 2,3,5-triméthylpyrazine (Pyr 2-Cac 3) et tétraméthylpyrazine (Pyr 3-Cho 5).

Selon l'axe F5, il y aurait une ***corrélation*** entre l'absence de la souche *Clavispora lusitaniae*, l'absence d'acétate d'heptan-2-ol (Est 6-Fru 0), la présence de la tétraméthylpyrazine (Pyr 3-Cho 1) et la faible teneur en 2-méthylbutanal (Ald 1-Cho 2).

Par ailleurs, nos résultats tendent à montrer qu'il n'y a pas de corrélation spécifique entre une variété de cacao donnée et les souches ou les composés volatils.

Tableau XLIII. *Contributions des différentes variables aux composantes F1 à F14 de l'ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié*

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
C. rugosa -0	0,03	0,11	0,01	0,12	0,05	0,09	0,33	0,22	0,09	0,10	0,32	0,09	0,09	0,00
C. rugosa -1	0,39	1,68	0,11	1,87	0,78	1,39	4,96	3,29	1,33	1,48	4,82	1,33	1,31	0,01
C. sorbosivorans -0	0,18	0,28	0,00	0,26	0,14	0,16	0,64	0,30	0,26	0,32	0,66	1,96	0,02	0,28
C. sorbosivoran s -1	0,78	1,19	0,00	1,12	0,60	0,69	2,76	1,30	1,11	1,40	2,88	8,51	0,07	1,21
C. lusitaniae -0	0,38	0,16	0,02	0,34	2,12	0,61	0,15	0,27	0,19	0,09	0,09	0,24	0,21	0,60
C. lusitaniae -1	1,14	0,48	0,07	1,03	6,36	1,84	0,46	0,81	0,58	0,26	0,28	0,73	0,63	1,79
H. meyeri -0	0,02	0,08	0,07	0,04	0,05	0,12	0,00	0,06	0,01	0,01	0,81	0,79	0,05	0,00
H. meyeri -1	0,32	1,24	1,07	0,58	0,78	1,81	0,00	0,87	0,17	0,15	12,20	11,88	0,75	0,06
H. opuntiae -0	0,00	0,04	1,09	0,10	0,19	0,11	0,01	0,16	0,04	0,02	0,29	0,81	0,04	0,00
H. opuntiae -1	0,01	0,30	7,60	0,71	1,30	0,77	0,04	1,14	0,27	0,15	2,00	5,64	0,28	0,01
H. thailandica -0	0,01	0,24	0,55	0,01	0,04	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00
H. thailandica -1	0,19	3,59	8,21	0,18	0,53	0,01	0,10	0,34	0,11	0,03	2,23	0,01	0,01	0,01
H. valbyensis -0	0,16	0,08	0,01	0,03	0,05	0,04	0,01	0,46	0,16	0,30	0,01	0,00	0,01	0,01
H. valbyensis -1	2,34	1,20	0,08	0,42	0,75	0,67	0,20	6,92	2,36	4,50	0,08	0,01	0,09	0,08
P. galeiformi s -0	0,10	0,42	0,13	0,33	0,00	0,46	0,35	0,06	0,17	0,18	0,12	0,38	0,01	0,00
P. galeiformis -1	0,71	2,91	0,93	2,28	0,00	3,19	2,43	0,39	1,22	1,28	0,84	2,63	0,04	0,01
P. manshurica -0	0,19	0,34	0,04	0,51	0,05	0,76	0,91	0,07	0,17	0,09	0,00	0,42	0,70	0,22
P. manshurica -1	0,82	1,47	0,18	2,23	0,24	3,30	3,96	0,32	0,76	0,40	0,02	1,82	3,05	0,93
Pichia sp.-0	0,02	0,05	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,25	0,00	0,51	0,04	1,04	0,46	0,01
Pichia sp.-1	0,27	0,82	0,18	0,00	0,15	0,13	0,35	3,70	0,01	7,61	0,65	15,54	6,85	0,22
S. cerevisiae -0	0,13	2,41	0,04	0,73	0,62	3,28	0,20	5,26	2,49	4,25	0,82	0,25	0,57	0,29
S. cerevisiae -1	0,03	0,56	0,01	0,17	0,14	0,76	0,05	1,21	0,57	0,98	0,19	0,06	0,13	0,07
T. delbrueckii -0	0,11	0,00	0,01	0,02	0,19	0,37	0,10	0,24	0,09	0,19	0,05	0,00	0,00	0,02
T. delbrueckii -1	1,68	0,03	0,11	0,29	2,83	5,51	1,45	3,65	1,34	2,79	0,71	0,07	0,05	0,24
Uncultured fungus -0	0,16	0,08	0,01	0,03	0,05	0,04	0,01	0,46	0,16	0,30	0,01	0,00	0,01	0,01
Uncultured fungus -1	2,34	1,20	0,08	0,42	0,75	0,67	0,20	6,92	2,36	4,50	0,08	0,01	0,09	0,08
W. anomalus -0	0,01	0,24	0,55	0,01	0,04	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00
W. anomalus -1	0,19	3,59	8,21	0,18	0,53	0,01	0,10	0,34	0,11	0,03	2,23	0,01	0,01	0,01
Z. hellenisus -0	0,01	0,07	0,04	0,56	0,05	0,08	0,31	0,00	0,09	0,02	0,05	0,00	0,00	0,17
Z. hellenisus -1	0,08	1,05	0,63	8,43	0,82	1,26	4,72	0,06	1,42	0,28	0,80	0,01	0,06	2,59
Z. meyerae -0	0,07	0,22	0,31	0,13	0,28	0,00	0,00	0,73	2,18	0,10	0,10	0,37	0,34	0,04
Z. meyerae -1	0,30	0,96	1,35	0,55	1,21	0,01	0,00	3,16	9,43	0,45	0,45	1,60	1,49	0,19
Est 1-Fru 2	3,38	1,12	0,58	0,13	1,59	2,50	1,58	0,57	0,01	0,68	0,00	0,07	0,05	0,04
Est 1-Fru 3	0,40	1,01	1,55	1,07	0,73	4,08	5,31	0,57	0,38	0,44	0,04	0,39	2,13	1,75
Est 1-Fru 4	1,24	0,01	0,95	0,48	0,01	0,15	0,45	0,00	0,13	0,00	0,01	0,19	0,74	0,60
Est 2-Fru 1	1,99	0,22	0,48	0,08	0,32	0,00	0,46	0,46	7,47	0,01	0,07	0,02	1,08	0,00
Est 2-Fru 2	0,29	2,62	1,38	1,36	0,47	0,28	0,48	0,59	0,81	0,89	2,30	0,17	3,03	2,65
Est 2-Fru 4	0,11	0,13	2,33	2,11	1,87	0,70	1,20	2,77	2,71	1,57	1,63	0,85	0,16	2,14
Est 2-Fru 5	0,33	1,28	0,13	3,32	0,31	1,54	4,30	1,12	0,01	0,09	7,90	3,18	1,13	0,06
Est 2-Fru 6	0,39	1,68	0,11	1,87	0,78	1,39	4,96	3,29	1,33	1,48	4,82	1,33	1,31	0,01
Est 3-Fru 1	0,01	0,07	0,04	0,56	0,05	0,08	0,31	0,00	0,09	0,02	0,05	0,00	0,00	0,17
Est 3-Fru 2	0,08	1,05	0,63	8,43	0,82	1,26	4,72	0,06	1,42	0,28	0,80	0,01	0,06	2,59
Est 4-Fru 2	3,38	1,12	0,58	0,13	1,59	2,50	1,58	0,57	0,01	0,68	0,00	0,07	0,05	0,04
Est 4-Fru 3	0,29	2,32	0,78	1,63	0,20	3,98	1,58	0,02	1,83	1,62	0,43	0,05	1,85	1,61
Est 4-Fru 4	0,52	0,71	1,17	2,46	1,44	0,16	0,09	1,24	0,81	2,92	0,17	0,64	0,77	2,50
Est 4-Fru 5	0,91	3,28	0,96	0,81	1,05	0,15	3,14	0,46	0,03	1,97	0,03	1,03	0,02	0,28
Est 5-Fru 0	0,19	3,59	8,21	0,18	0,53	0,01	0,10	0,34	0,11	0,03	2,23	0,01	0,01	0,01
Est 5-Fru 1	5,05	0,93	0,19	0,00	0,00	0,00	0,11	0,24	0,35	0,08	0,23	0,00	0,10	0,02
Est 5-Fru 2	1,38	0,04	0,52	0,16	0,56	0,00	0,18	0,13	0,34	0,42	0,59	0,04	0,00	0,00
Est 5-Fru 3	0,19	0,84	0,08	3,01	2,77	0,04	5,31	0,84	1,54	6,24	3,54	0,44	0,23	0,03

Tableau XLIII (*suite*)

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
Est 6-Fru 0	1,14	0,16	0,62	1,35	7,01	2,01	1,77	2,43	1,95	0,91	0,07	0,22	0,38	0,00
Est 6-Fru 1	3,54	0,13	2,81	0,19	1,11	0,68	0,07	0,56	0,17	0,12	0,29	0,07	0,00	0,03
Est 6-Fru 2	1,42	0,02	0,50	0,02	0,00	0,34	0,01	0,06	0,02	0,98	0,70	0,93	0,01	0,00
Est 6-Fru 3	0,14	0,47	0,05	0,71	0,77	3,83	0,39	0,34	1,22	8,61	4,39	10,17	1,04	0,03
Est 7-Fru 0	4,68	0,01	1,12	0,04	0,17	0,00	0,19	0,02	0,12	0,03	0,11	0,00	0,11	0,03
Est 7-Fru 1	0,09	0,34	0,07	0,00	2,61	5,21	0,00	3,75	0,00	2,14	6,66	1,22	0,24	7,31
Est 7-Fru 2	0,65	0,48	2,24	0,02	0,38	0,50	0,76	0,01	1,66	0,63	4,54	1,07	0,51	0,59
Est 7-Fru 3	0,89	1,73	0,62	0,14	1,46	0,04	2,58	1,48	1,90	0,24	3,48	0,67	0,73	0,03
Est 8-Flo 0	2,61	0,58	1,93	0,37	0,95	0,23	0,06	2,79	1,65	2,02	0,05	0,00	0,30	0,13
Est 8-Flo 1	0,03	1,23	3,86	0,11	0,09	0,55	0,22	3,82	1,20	0,50	0,44	0,06	0,88	0,55
Est 8-Flo 2	1,46	2,33	0,83	0,01	0,13	1,00	0,36	0,51	0,03	0,07	0,58	0,07	0,26	0,84
Est 9-Flo 1	2,37	0,54	0,09	1,08	0,43	0,13	1,64	0,06	0,28	0,09	0,08	0,08	0,02	7,57
Est 9-Flo 2	0,31	1,95	1,81	1,77	1,54	0,33	0,66	0,21	1,59	1,09	0,27	0,01	0,22	6,68
Est 9-Flo 3	1,10	4,01	1,02	0,43	0,06	0,01	0,24	0,05	1,91	4,18	0,00	0,59	0,88	0,15
Est 9-Flo 4	0,19	0,84	0,08	3,01	2,77	0,04	5,31	0,84	1,54	6,24	3,54	0,44	0,23	0,03
Alc 2-Cho 1	3,99	0,81	0,00	0,70	3,25	1,17	0,29	0,26	0,07	0,10	0,16	0,07	0,00	0,02
Alc 2-Cho 2	0,61	0,21	0,83	0,03	1,42	0,24	0,05	0,00	0,15	0,78	0,80	0,38	0,00	0,12
Alc 2-Cho 3	0,02	2,57	2,95	0,13	0,66	3,32	0,00	0,25	0,91	2,05	1,92	0,92	0,00	0,61
Alc 4-Flo 0	3,99	0,81	0,00	0,70	3,25	1,17	0,29	0,26	0,07	0,10	0,16	0,07	0,00	0,02
Alc 4-Flo 1	0,57	0,12	0,00	0,10	0,46	0,17	0,04	0,04	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00
Alc 5-Flo 0	1,68	0,03	0,11	0,29	2,83	5,51	1,45	3,65	1,34	2,79	0,71	0,07	0,05	0,24
Alc 5-Flo 2	3,38	1,12	0,58	0,13	1,59	2,50	1,58	0,57	0,01	0,68	0,00	0,07	0,05	0,04
Alc 5-Flo 3	0,04	0,99	1,76	1,36	0,19	0,14	1,63	0,02	5,30	0,01	0,03	1,71	7,72	16,18
Alc 5-Flo 4	1,57	0,54	0,03	0,47	0,00	0,33	0,09	0,63	0,76	0,10	0,51	0,97	1,57	1,22
Alc 5-Flo 5	0,01	3,06	4,91	0,09	0,40	2,84	0,06	0,92	0,07	1,32	0,59	0,71	0,07	3,36
Pyr 1-Cac 1	2,73	0,01	2,09	1,07	0,02	0,32	0,98	0,01	0,29	0,00	0,02	0,42	1,63	1,31
Pyr 1-Cac 2	1,10	0,03	1,50	0,76	0,03	0,36	0,10	0,27	0,34	0,02	0,36	0,22	0,02	1,68
Pyr 1-Cac 3	0,14	0,10	0,40	0,20	0,71	0,39	1,54	3,48	9,42	0,26	2,40	0,00	10,93	2,35
Pyr 2-Cac 1	5,05	0,93	0,19	0,00	0,00	0,00	0,11	0,24	0,35	0,08	0,23	0,00	0,10	0,02
Pyr 2-Cac 2	0,02	4,86	0,05	2,54	0,28	0,37	2,05	0,47	2,19	0,16	2,37	0,53	1,96	2,37
Pyr 2-Cac 3	0,08	1,05	0,63	8,43	0,82	1,26	4,72	0,06	1,42	0,28	0,80	0,01	0,06	2,59
Pyr 2-Cac 4	1,64	1,11	0,15	0,00	0,41	0,58	0,01	0,00	0,83	0,01	0,10	0,17	1,15	1,83
Pyr 3-Cho 1	1,14	0,16	0,62	1,35	7,01	2,01	1,77	2,43	1,95	0,91	0,07	0,22	0,38	0,00
Pyr 3-Cho 2	3,54	0,13	2,81	0,19	1,11	0,68	0,07	0,56	0,17	0,12	0,29	0,07	0,00	0,03
Pyr 3-Cho 3	0,04	1,16	1,49	0,40	0,29	0,13	0,81	0,51	0,05	0,68	0,86	6,86	24,78	0,20
Pyr 3-Cho 4	0,00	0,71	1,61	2,89	0,55	0,63	3,57	0,01	6,03	0,09	0,06	1,60	7,12	5,43
Pyr 3-Cho 5	0,26	0,01	0,13	10,76	3,30	0,87	0,01	0,67	0,00	1,94	0,49	0,30	0,03	1,60
Pyr 3-Cho 6	1,46	0,63	0,10	0,45	1,61	0,77	0,52	0,08	0,28	0,58	1,00	0,04	0,94	2,25
Ald 1-Cho 2	0,58	0,10	2,11	4,10	5,74	0,19	0,16	1,39	0,56	0,78	0,00	0,32	2,10	2,68
Ald 1-Cho 3	0,29	4,24	0,56	0,12	0,15	3,62	0,15	0,23	0,10	4,14	0,00	0,31	0,02	0,00
Ald 1-Cho 4	0,58	1,92	0,02	0,48	0,70	1,46	0,22	0,84	0,34	1,21	0,00	0,02	0,60	0,66
Ald 2-Cho 2	3,81	0,17	1,02	0,70	0,18	0,20	0,43	0,23	0,52	0,16	0,08	0,35	1,13	1,12
Ald 2-Cho 3	1,16	4,48	1,06	0,04	1,05	1,40	0,12	0,00	0,04	0,45	0,01	1,34	1,46	0,16
Ald 2-Cho 4	0,38	3,20	0,00	0,55	1,04	1,33	0,50	0,09	0,43	0,04	0,08	1,52	0,01	1,05
Hét-Cac 1	4,68	0,01	1,12	0,04	0,17	0,00	0,19	0,02	0,12	0,03	0,11	0,00	0,11	0,03
Hét-Cac 2	1,01	0,16	0,97	0,10	0,72	1,03	0,70	2,35	0,29	0,04	0,63	0,10	0,01	0,67
Hét-Cac 3	0,57	0,66	0,23	0,09	3,80	3,12	0,88	6,26	1,76	0,02	0,97	0,29	0,04	2,57

Dans le Tableau XLIII, les cellules colorées correspondent aux modalités dont les valeurs tests des variables sont significativement positives (en bleu) et négatives (en rouge).

D'après les valeurs tests (Tableau XLII) et les contributions des variables (Tableau XLIII), la souche *Hanseniaspora opuntiae* (en co-culture avec les souches *Hanseniaspora thailandica* et *Wickerhamomyces anomalus*) est corrélée avec une teneur élevée en 2-phényléthanol. La co-culture de *Saccharomyces cerevisiae* et *Hanseniaspora opuntiae* dans du vin de raisin permet la production de certains alcools notamment la 2-phényléthanol et le 3-méthylbutan-1-ol (Luan *et al.*, 2018). C'est une souche présente aussi bien dans la fermentation du cacao qu'en co-culture avec d'autres souches de bactéries spécifiques (*Lactobacillus fermentum* et *Acetobacter pasteurianus*) et cela permet une bonne fermentation des fèves (Papalexandratou *et al.*, 2013). *Hanseniaspora opuntiae* est avec *Saccharomyces cerevisiae* une levure majoritaire dans la fermentation du cacao (Daniel *et al.*, 2009; Papalexandratou et De Vuyst, 2011; Illeghems *et al.*, 2012; Meersman *et al.*, 2013; Papalexandratou *et al.*, 2013; Hamdouche *et al.*, 2015; Fernández Maura *et al.*, 2016; Miescher Schwenninger *et al.*, 2016) et elle apparaît généralement dans les 48 premières heures de fermentation (Papalexandratou *et al.*, 2011b; Fahrurrozi, 2015; Teng-Sin *et al.*, 2016; Visintin *et al.*, 2016). D'autres études tendent également à montrer que cette levure est présente dès le début de la fermentation (0 h) et perdure jusqu'à la fin du processus de fermentation à 144 h (Hamdouche *et al.*, 2015).

D'après les Tableaux XLII et XLIII, les souches *Hanseniaspora thailandica* et *Hanseniaspora opuntiae* sont corrélées à la 2-phényléthanol (Alc 5). Cette molécule à une note florale et sa présence est recherchée pour la qualité du cacao. Les souches *Wickerhamomyces anomalus* et *Hanseniaspora thailandica* sont corrélées à la 2-méthylbutanal et la 3-méthylbutanal. Ces deux molécules pourraient servir de marqueurs de qualité car elles sont présentes dans le cacao Criollo (Alvarez *et al.*, 2012). Les esters octanoate d'éthyle (Est 7) et acétate d'éthylphényle (Est 8) sont corrélés aux échantillons fermentés 48 h tandis que l'acétate de 3-méthylbutyle (Est 4), l'acétate d'éthylphényle (Est 8) et l'acétate de 2-phényléthyle (Est 9) sont corrélés aux échantillons fermentés 96 h. Cela confirme le regroupement des échantillons par temps de fermentation observé sur la Figure 32. Il n'y a pas de corrélation entre une variété de cacao et la présence de composé volatil spécifique. Il y a une évolution des composés volatils au niveau qualitatif et quantitatif au cours de la fermentation associée à une évolution de souches de levures.

Conclusions

70 souches de levures revivifiables ont été identifiées comprenant notamment les genres *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces* et *Torulaspora*.

Une analyse de la composition volatile est réalisée sur poudre de cacao non torréfié, non fermenté et fermenté. Les teneurs en esters sont peu élevées (< 10 ppm) sauf pour les acétates de méthyle, d'éthyle et de 3-méthylbutyle. La biosynthèse du 2-phényléthanol se déroule plus rapidement lors de la fermentation des Trinitario à casse Claire comparée à celle des Trinitario à casse Foncée.

L'activité de certaines souches de levures sur la production de composés volatils est réalisée sur différents milieux de culture dont des milieux Sabouraud et des milieux cacaotés. Nous avons choisi d'étudier les souches *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii* car celles-ci sont connues pour produire des composés volatils caractéristiques des notes olfactives fruitée et florale. De façon générale, la présence d'éthanol et d'extrait de cacao dans le milieu affecte la capacité de production de composés volatils par l'ensemble des levures, mais à des degrés différents en fonction des souches. Ce phénomène est particulièrement important pour la production d'acétate de 2-phényléthyle par *H. opuntiae* et de tiglate d'éthyle par *S.cerevisiae*. Parmi tous les milieux cacaotés, il est apparu que le milieu cacaoté le plus intéressant pour étudier la fraction de composés volatils produits par les levures est le milieu de Sabouraud avec 1 % d'Eeth-30 (Extrait éthanolique 30 °C) (SabKKOEtOH1). Sur ce milieu, *Hanseniaspora opuntiae* et *Torulaspora delbrueckii* y produisent de l'acétate de 2-phényléthyle ou de l'hexanoate d'éthyle à des teneurs élevées, molécules qui ont été retrouvées dans la fraction volatile du cacao malgache torréfié.

Pour déterminer les effets de la présence d'extrait de cacao sur le métabolisme des levures et ceux des levures sur le profil aromatique des fèves de cacao, une étude de la capacité de production de composés volatils par 2 différentes souches (*H. opuntiae* et *T. delbrueckii*) sur les milieux liquides Sabouraud et SabKKOEtOH1 a été réalisée. Pour toutes les souches, une perte de production en composés volatils de plus de 85 % a été observée, ce qui confirme la présence d'une substance inhibant la production de composés volatils par les levures dans l'extrait de cacao.

Parmi les 5 composés volatils produits par ces 2 levures sur milieu Sabouraud, seulement trois sont retrouvés sur milieu SabKKOEtOH1 : le 2-phényléthanol, l'acétate de 2-

phényléthyle et le 3-méthylbutan-1-ol. Par contre, seuls le 2-phényléthanol et l'acétate de 2-phényléthyle, qui influencent positivement la qualité aromatique du cacao marchand, sont détectés sur le cacao fermenté et torréfié.

Bien qu'il soit fortement probable que certains composés volatils, notamment les pyrazines, proviennent des réactions de Maillard pendant l'étape de torréfaction, d'autres substances (comme les alcools, les esters et les acides) doivent provenir du métabolisme d'autres levures indigènes du cacao ou de la symbiose entre 2 micro-organismes qui s'y développent.

Pour conclure, l'étude a montré que le métabolisme de certaines levures (*H. opuntiae*, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*) participent incontestablement à la qualité aromatique du cacao de Madagascar par la production de composés volatils et/ou de précurseurs de ces derniers en influençant positivement sur les propriétés organoleptiques du produit. La majeure partie de ces composés sont issus des voies d'Ehrlich et de la β-oxydation. Ceci souligne l'importance de ces deux voies pendant la fermentation du cacao.

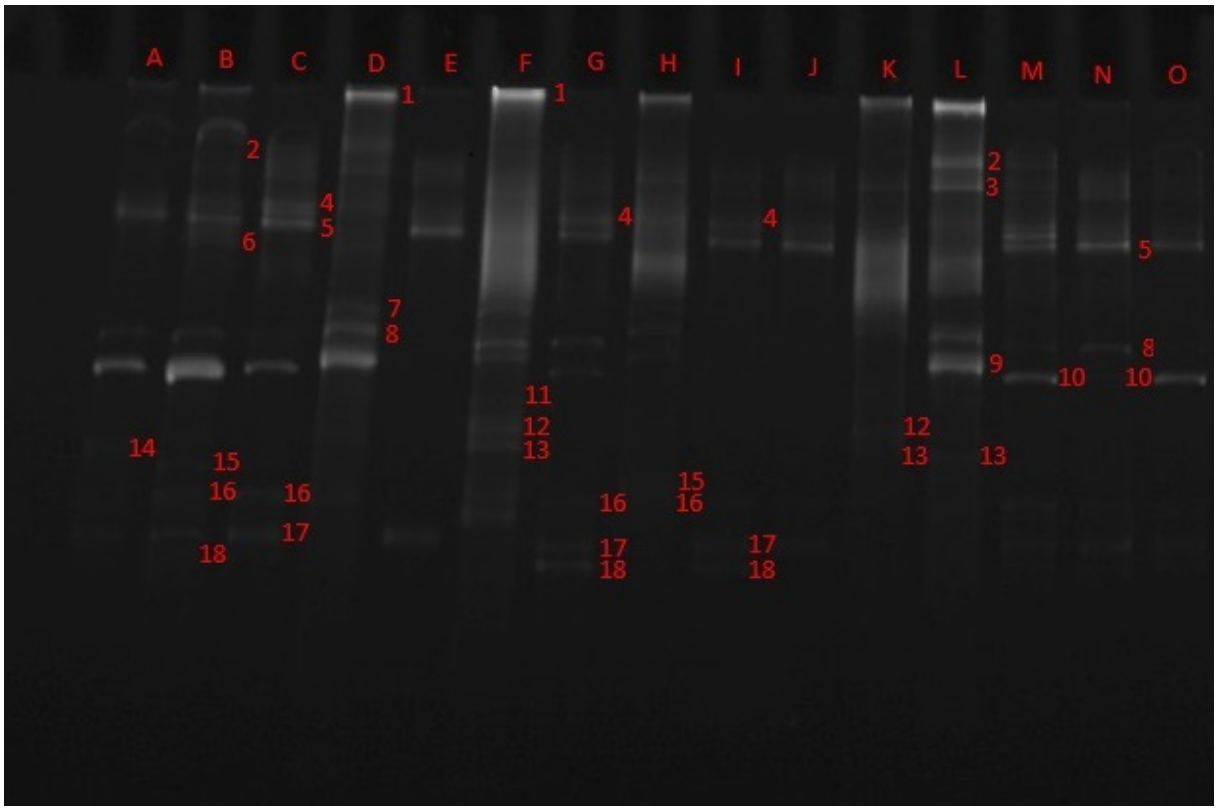
CHAPITRE VI :
Analyse moléculaire des communautés fongiques

Introduction

Le CHAPITRE V traite de la caractérisation des flores microbiennes revivifiables notamment les levures. Dans ce chapitre, nous avons cherché à caractériser l'ensemble des flores (flores revivifiables et flores non revivifiables) à l'aide d'une méthode alternative et globale permettant en principe d'identifier toutes les flores microbiennes présentes dans les échantillons de cacao. Le but est de pouvoir enrichir les résultats obtenus dans la partie précédente en identifiant des souches que nous n'aurions pas pu isoler à l'aide des méthodes classiques de microbiologie, en particulier les flores fongiques. La technique utilisée est la PCR-DGGE. Il est important de noter que les échantillons étudiés ici ne sont pas tout à fait les mêmes que ceux étudiés dans le chapitre précédent. En effet, pour l'étude des flores revivifiables, nous avons travaillé sur les échantillons de la première campagne de prélèvements à Madagascar (01/2015) tandis que l'étude de la flore totale a été effectuée sur les échantillons de la deuxième campagne de prélèvements à Madagascar (10/2015). La priorité a été donnée aux échantillons de Criollo. Les Trinitario sont des hybrides Criollo/Forastero et plus particulièrement les Trinitario à casse Foncée se rapprochent des Forastero donc proches des cacaos courants.

1. Analyse moléculaire de la flore fongique par DGGE

Parmi les échantillons de la deuxième campagne de prélèvements à Madagascar (10/2015), seuls les Criollo ont été analysés. Après avoir choisi les dilutions optimales pour procéder à l'extraction de l'ADN des micro-organismes des fèves de Criollo, une amplification de la région ITS par PCR avec le couple d'amorces ITS1/ITS4 (ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3' ; ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') puis une migration par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE ou Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est réalisée (Figure 34).



Les échantillons sont classés par ordre croissant de fermentation : A à E (0, 24, 48, 72 et 96 h de fermentation), F à J (0 à 96 h de fermentation) et K à O (0 à 96 h de fermentation).

Figure 34. Analyse par DGGE des échantillons de Criollo de Madagascar (10/2015)

Tous les échantillons possèdent des bandes avec des distances de migrations différentes. Pour chaque échantillon, une bande correspond à une séquence d'ADN unique et dans la plupart des cas correspond à une espèce de levure.

L'analyse des flores levuriennes par DGGE en cours de fermentation montre une évolution du nombre total des bandes et confirme donc la présence de souches différentes sur les échantillons. Parmi l'ensemble des échantillons, il y a 95 bandes dont 18 avec des distances de migrations différentes soit 18 souches différentes présentes. Leur nombre est maximal au début de la fermentation (48 premières heures), 11 bandes à 24 h pour le premier suivi (échantillon 2-ci-24 noté B sur la Figure 34) et 8 bandes à 24 h pour le troisième suivi (échantillon 12-ci-24 noté L) 10 bandes à 0 h pour le second suivi (échantillon 6-ci-0 noté F). Après 24 h de fermentation, le nombre de levures différentes diminue jusqu'à la fin de la fermentation pour les 3 essais. Ce résultat est cohérent avec la littérature qui indique que les souches de levures interviennent lors des 48 premières heures (Barel, 2016). La présence de levures à 0 h de fermentation peut s'expliquer par le fait que le prélèvement des fèves dans le bac de fermentation (correspondant au temps 0) inclut la phase d'écabossage qui a duré un certain

temps (transport en charrette des fèves dans des sacs tressés) pendant lequel la fermentation a déjà démarré.

Le choix des bandes à prélever pour le séquençage est motivé par l'intensité des bandes et les bandes pour lesquelles la migration est différente (en prenant généralement 2 bandes de même taille sur des échantillons différents). Au final, nous avons sélectionné 36 bandes que nous avons extraites du gel et qui sont numérotées sur le gel (Figure 34). Certaines de ces bandes ont été séquencées. Cinq de ces bandes parmi différents échantillons sont prélevées pour le séquençage parmi lesquelles les bandes 2, 4, 5, 6 et 14. Les bandes 2 et 6 sont prélevées sur l'échantillon B (2-ci-24). Les bandes 4 et 5 sont prélevées sur l'échantillon C (3-ci-48). La bande 14 est prélevée sur l''échantillon A (1-ci-0). Les 13 autres bandes ne sont pas prélevées car pas assez intenses.

L'analyse plus détaillée des différentes bandes de la Figure 34 montre que :

- La bande 2 (*Lasiodiplodia theobromae*) est retrouvée plutôt en début de fermentation (24 premières heures).
- La bande 4 (*Pichia kudriavzevii*) apparaît au cours de la fermentation : à 24 h pour le premier et deuxième suivis et présente jusqu'à 96 h tandis qu'elle est présente à 48 et 72 h pour le troisième suivi.
- La bande 5 (*Pichia manshurica*) suivant le suivi de fermentation se retrouve aux différents temps de fermentation. Il est à noter que cette souche figure parmi les plus abondantes dans l'ensemble des échantillons. Cette souche produit notamment des composés volatils caractéristiques des notes florale, fruitée et chocolat (Hamdouche, 2015).
- Les bandes 6, 11 et 14 (non identifiées) ne sont présentes que dans un seul échantillon et à 0 ou à 24 h. Le rôle de ces micro-organismes sur la qualité sensorielle et aromatique du cacao malgache semble donc assez limité.
- La bande 8 (non identifiée) est présente à différents temps de fermentation sauf à 96 h.
- La bande 9 (non identifiée) est présente de 0 à 48 h.
- La bande 10 (non identifiée) n'est présente que dans le troisième suivi de fermentation.
- Les bandes 12, 13 et 15 (non identifiées) sont peu présentes dans les échantillons et en début de fermentation.
- Les bandes 16 et 17 (non identifiées) se retrouvent aux différents temps de fermentation suivant le suivi de fermentation.

Les bandes 4, 5, 16 et 17 sont donc présentes en milieu et fin de fermentation. Les souches issues de ces bandes pourraient donc avoir une influence sur la qualité sensorielle et aromatique des cacaos fermentés 48 à 96 h.

Après identification sur BLAST, les résultats sont :

- A14 : *Fusarium* sp.
- B2 : *Lasiodiplodia theobromae*
- B6 : souche non identifiée (séquences ne sont pas exploitables (ni pour ITS1 ni pour ITS4))
- C4 : *Pichia kudriavzevii*
- C5 : *Pichia manshurica*

Dans la littérature, *Pichia manshurica* est identifiée aussi bien sur des fèves de cacao courant (Ghana, Côte d'Ivoire, Brésil, Malaisie et Cuba) que celles de cacao fin (Equateur et Bolivie).

2. Comparaison avec les composés volatils

La souche issue de la bande 6 (non identifiée) pourrait être en partie responsable de la production de 3-méthylbutan-1-ol (alcool isoamylique) en quantité importante puisque c'est la seule souche présente dans l'ensemble des échantillons de Criollo. L'alcool isoamylique est produit à partir de souches de levure telles que *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia galeiformis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Koné *et al.*, 2016). La souche issue de la bande 4 correspondant à *Pichia kudriavzevii*, il se pourrait que la souche issue de la bande 6 soit l'une des trois autres souches citées précédemment.

Une étude récente d'ensemencement de *Pichia kudriavzevii* sur des fèves fraîches stériles de cacao a montré la production d'acide 3-méthylbutanoïque (Koné *et al.*, 2016). Dans les échantillons, la souche est absente à 0 h de fermentation mais présente tout au long de la fermentation. La teneur en acide 3-méthylbutanoïque (isovalérique) augmente au cours de la fermentation. Dans cette même étude, *Pichia kudriavzevii* a produit de l'éthanol. Dans nos échantillons, la teneur en éthanol augmente au cours de la fermentation. L'acétate d'isoamyle

(acétate de 3-méthylbutyle) et l'acétate d'éthyle sont aussi produits par *Pichia kudriavzevii* avec un pic à 24 h pour l'acétate d'éthyle. Dans nos échantillons, le pic apparaît à 48 h (milieu de la fermentation). L'acétate d'éthyle est formé par estérification de l'éthanol et de l'acide acétique. *Pichia kudriavzevii* est une souche d'intérêt car produisant de l'acétate d'éthyle et de l'acétate d'isoamyle. En effet, ces deux esters sont associées à une note olfactive fruitée (Hamdouche, 2015; Koné *et al.*, 2016; Saerens et Swiegers, 2016; Pereira *et al.*, 2017). Selon l'ICCO, les cacaos ayant une note olfactive fruitée sont classés parmi les cacaos fins.

Conclusions

La PCR-DGGE a été mise en œuvre afin de pouvoir faire un suivi de l'évolution de la diversité microbienne au cours de la fermentation des aliments (Muyzer, 1999; Nicolaisen et Ramsing, 2002; Ercolini, 2004) mais aussi d'identifier des souches non revivifiables.

Parmi les 4 souches identifiées par DGGE, seules 2 sont retrouvées sur les fèves de cacao : *Pichia kudriavzevii* et *Pichia manshurica*.

Les souches *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Pichia kudriavzevii* et *Pichia manshurica* sont identifiées par DGGE et *Pichia manshurica* est la seule souche commune identifiée lors de l'analyse des flores levuriennes revivifiables. La souche *Pichia kudriavzevii* est suspectée mais n'a pas été isolée lors des repiquages et de l'isolement des flores levuriennes revivifiables. Il est probable que parmi les 15 souches non identifiées par DGGE, certaines soient communes à celles identifiées lors de l'analyse des flores levuriennes revivifiables.

Conclusion générale et perspectives

Madagascar est l'un des derniers pays à pouvoir bénéficier du classement « cacaos fins » par l'Organisation Internationale du Cacao (ICCO, 2016) pour l'ensemble de sa production. Au cours de ce travail, plusieurs points ont été abordés pour expliquer le potentiel qualitatif du cacao de Madagascar : la caractérisation des fèves de cacao marchands, l'évolution de la qualité au cours de la fermentation, la détermination et l'activité des souches microbiennes associées.

La caractérisation des cacaos marchands est le critère primordial retenu par l'ICCO pour leur classification parmi les cacaos fins. Parmi les recommandations, apparaît en particulier l'appartenance à une variété de préférence le Criollo (ou le Trinitario), l'aspect visuel indiquant une bonne fermentation et des qualités organoleptiques remarquables.

La technique de grainage utilisée dans la détermination de la taille des fèves et la spectrophotométrie proche infra-rouge mise en œuvre pour la détermination du ratio théobromine/caféine ont permis de confirmer l'appartenance des échantillons collectés à Madagascar parmi les variétés Criollo et Trinitario. Les échantillons de Trinitario à casse Foncée ont un nombre approximatif de 83 fèves pour 100 g de fèves et plus faible que celui des Criollo (101 fèves pour 100 g de fèves). Les Trinitario à casse Foncée sont par ailleurs génétiquement plus proches des cacaos Forastero, avec des fèves de grosse taille. Ce résultat est confirmé par un nombre de fève égal à 87 pour 100 g de Trinitario à casse Claire ; un nombre qui se situe entre celui des Criollo et Trinitario à casse Foncée. En effet, le Trinitario est un hybride entre le Criollo et le Forastero et le Trinitario à casse Claire est plutôt à tendance Criollo, donc avec des fèves de plus petites tailles que le Trinitario à casse Foncée. Les ratios théobromine/caféine varient de 1,54 à 2,11 pour l'ensemble des 18 échantillons de cacao marchand. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui présente des valeurs de ratio théobromine/caféine, selon les groupes génétiques du cacao, compris entre 10-15 (Forastero), 5-10 (Trinitario) et 1-2 (Criollo) (Hasing, 2004).

La technique du « cut test » a confirmé non seulement l'appartenance aux variétés Criollo/Trinitario mais aussi la bonne fermentation des fèves collectées à Madagascar. En effet, les fèves sont dans 92 % des cas de couleur brune ou claire. Peu de fèves sont ardoisées (0,3 % sur un échantillon parmi les 18 échantillons de cacao marchand), moisies (0 %) ou encore mitées (0 %).

Selon la norme ISO 2451 et les critères propres aux producteurs de cacao malgache, les échantillons de cacao marchand sont classés respectivement dans la catégorie des cacaos fins (grade 1) et dans la catégorie « supérieur » confirmant la qualité de ce cacao.

Du point de vue sensoriel, le cacao de Madagascar se caractérise par son caractère fruité, cacao, chocolat et son acidité. L'analyse de la composition volatile que nous avons menée a montré l'existence de molécules clés contribuant à ces notes : l'acide acétique, la tétraméthylpyrazine, la 2,3-diméthylpyrazine, la 2,3,5-triméthylpyrazine, l'acétate de méthyle, l'acétate d'éthyle, l'acétate de butyle, l'acétate de 3-méthylbutyle, l'hexanoate d'éthyle, l'octanoate d'éthyle, l'alcool isoamylique, le 2-méthylbutanal, le 3-méthylbutanal et le 2-acétylpyrrole.

Des différences entre la variété Criollo et la variété Trinitario ont été mises en évidence.

Les cacaos issus des fèves de Trinitario ont significativement des notes plus acide et plus fruité « Fruits frais » que comparativement aux Criollo. Par contre, les échantillons de Criollo sont plus amers et présentent une note « Fruits secs » plus prononcée que les échantillons de Trinitario.

Les Trinitario à casse Claire et les Trinitario à casse Foncée sont également caractérisés par une teneur significativement plus élevée en esters par rapport aux Criollo, confirmant la note olfactive fruitée caractérisant les Trinitario. L'analyse plus détaillée des composés volatils montre que les teneurs en acide 2-méthylpropanoïque (acide isobutyrique) et en acide 3-méthylbutanoïque sont significativement plus élevées pour les Criollo par rapport aux Trinitario. Les teneurs en acide acétique sont élevées pour les 3 variétés de cacao (127 ppm, 104 ppm, 181 ppm pour les variétés Criollo, Trinitario à casse Claire et Trinitario à casse Foncée) mais cette teneur ne présente pas de différence significative entre les 3 variétés.

L'évolution des caractéristiques sensorielles et de la composition de la fraction volatile au cours de la fermentation a fait aussi l'objet d'une étude approfondie.

L'analyse sensorielle réalisée en cours de fermentation montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les variétés pour les échantillons en début et milieu de fermentation (24 h et 48 h). En début de fermentation, les descripteurs sensoriels ont des connotations négatives : végétal, terreux, astringent, amer. En fin de fermentation, les fèves acquièrent des notes à

connotations positives tels que cacao, doux, fruité. Néanmoins, la cinétique d'apparition des notes à connotation positive est différente selon la variété. Ainsi, les échantillons de Criollo sont caractérisés par des descripteurs plaisants : Fruits frais, Acidité, Cacao, Chocolat, Doux et Floral après 72 h (ou au plus tard après 96 h de fermentation). Les variétés Trinitario à casse Claire et à casse Foncée doivent fermenter au minimum pendant 96 h pour acquérir les mêmes propriétés organoleptiques.

L'évolution de la composition volatile est plus marquée entre les variétés par rapport à l'évolution sensorielle. Pour les Criollo, certains composés importants dans la caractérisation sensorielle des cacaos de Madagascar (note cacao, chocolat, acide) sont en concentration importante en fin de fermentation (72 h et 96 h) à l'image de la tétraméthylpyrazine, l'acide acétique et l'acide 3-méthylbutanoïque. La teneur en tétraméthylpyrazine augmente à partir de 24 h pour les Criollo. Pour les Trinitario à casse Claire, les composés volatils notamment ceux qui contribuent notablement à la qualité sensorielle du cacao atteignent des concentrations du même ordre de grandeur que ceux des Criollo après 120 h de fermentation. Pour les Trinitario, la teneur en tétraméthylpyrazine n'augmente qu'à partir de 48 h. Ce résultat confirme que la fermentation se déroule plus rapidement pour les Criollo par rapport aux Trinitario, expliquant ainsi la durée de fermentation plus courte pour les Criollo. Les procédés traditionnellement utilisés sont donc parfaitement justifiés.

L'étude des micro-organismes permet de montrer la diversité initiale des souches à 0 h de fermentation puis la diminution du nombre de souches différentes, et donc une spécialisation des souches fermentaires, au cours de la fermentation. 70 souches ont été identifiées comprenant 9 genres de levure et 16 espèces différentes. La levure *S. cerevisiae* est l'une des souches les plus représentatives des échantillons de cacao malgache. Cependant, aucune souche spécifique au cacao de Madagascar n'a été identifiée.

Au cours de l'étude de la production des composés volatils par les levures revivifiables, nous avons analysé les composés volatils émis par les levures isolées à partir des cacaos non torréfiés et avons évalué la participation et l'impact du métabolisme des levures sur les propriétés aromatiques du cacao de Madagascar. Pour ce faire, un protocole optimisé de préparation d'un milieu de culture microbiologique contenant un extrait de fèves de cacao de Madagascar a été réalisé avant d'analyser les composés volatils produits par les levures par la technique SPME - CG - SM.

L'aptitude à la biosynthèse des composés volatils a été déterminée pour 3 souches caractéristiques de levures (*Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii*) sur 3 milieux cacaotés (un milieu de Sabouraud avec 1 % d'extrait éthanolique 30 °C (SabKKOEtOH1), un milieu de Sabouraud comportant 5 % d'extrait éthanolique 30 °C (SabKKOEtOH5) et un milieu de Sabouraud comportant 20 % d'extrait aqueux pH 6, 4 °C (SabKKOAq20)) et sur 2 milieux de références (Sab et SabEtOH5). Plus la teneur en extrait de cacao augmente dans le milieu, moins la production de composés volatils par les levures est élevée. Néanmoins, un milieu de culture enrichi de 1 % d'extrait de fèves de cacao permet la production d'hexanoate d'éthyle et d'acétate de 2-phényléthyle qui sont connues pour leurs notes florales et fruitées par ces trois souches. Il est probable que d'autres composés présents dans la fraction volatile soient synthétisés par d'autres levures isolées du cacao de Madagascar en particulier les souches *Hanseniaspora thailandica* et *Pichia manshurica* que nous n'avons pas encore eu le temps d'étudier. Ces dernières sont connues pour avoir ce type d'activité métabolique et sont présentes dans les cacaos de qualité (Papalexandratou *et al.*, 2013; Fernández Maura, 2015).

Une étude des communautés levuriennes par voie moléculaire a également été réalisée pour confirmer la présence des levures revivifiables isolées. 4 souches ont été identifiées à différents temps de fermentation : *Fusarium* sp. (0 h), *Lasiodiplodia theobromae* (24 h), *Pichia kudriavzevii* et *Pichia manshurica* (48 h). Pour des raisons encore inexpliquées, seule *Pichia manshurica* aura été identifiée communément par les deux méthodes d'analyse. Cette analyse devra être reproduite pour confirmer ou infirmer ce résultat.

Quelles perspectives de développement d'une filière cacao dans l'Océan Indien ?

A Madagascar, le développement de la filière cacao est d'actualité. Suite au classement de l'ICCO, la filière s'organise et un groupement d'acteurs de la filière cacao a été constitué pour harmoniser cette qualité. Cette étude réalisée en milieu industriel dans des conditions contrôlées y contribue. Elle mériterait d'être étendue à l'ensemble des transformateurs de fèves de cacao afin de confirmer les caractéristiques sensorielles du cacao de Madagascar. Ainsi, d'autres études ont été déjà menées auprès d'autres producteurs. Les études antérieures menées au laboratoire à partir des échantillons de cacao provenant de différents acteurs (paysans, coopératives, sociétés industrielles) de la filière cacao malgache et impliquant différents

procédés de transformation ont montré des similitudes fortes avec nos résultats (Bousquet, 2013; Chen-Yen-Su, 2014). Les échantillons ont un nombre de fève pour 100 g variant de 89 à 110. Les ratios théobromine/caféine varient de 1,63 à 2,97. Les fèves sont principalement de couleur brune ou claire (90 % de fèves brunes et claires). Du point de vue sensoriel, les échantillons se caractérisent par leur caractères fruité, acide et chocolat. Les composés volatils recensés notamment l'acide acétique, la tétraméthylpyrazine, l'acétate d'éthyle, l'acétate de 3-méthylbutyle, l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle sont parfaitement en accord avec les descripteurs sensoriels. L'étude des souches de levure isolées a permis l'identification de levures communes à nos analyses (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora thailandica*, *Hanseniaspora opuntiae*) et d'autres non identifiées dans nos échantillons (*Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Trigonopsis cantarellii*, *Candida jaroonii*).

Il semble également important de continuer ce travail sur d'autres types de souches, en particulier les bactéries lactiques et les bactéries acétiques. En effet, les notes acides détectées dans les échantillons proviennent généralement des bactéries acétiques qui est la flore qui succède le plus souvent aux flores levuriennes lors de la fermentation des cacaos (Ostovar et Keeney, 1973; Schwan, 1998; Pereira *et al.*, 2012; Ban Koffi *et al.*, 2013).

A La Réunion, la relance de la culture du cacao avec pour objectif la mise sur le marché des fèves de cacaos marchands même classés parmi les cacaos fins est sujet à questionnement. En effet, le prix de la tonne actuelle du cacao (2450 euros/tonne) reste dérisoire au vu du coût de la main d'œuvre plus élevée à La Réunion par rapport aux principaux pays producteurs de fèves de cacao, de la surface cultivable et des volumes de fèves disponibles. Il est donc important de travailler sur l'amélioration des méthodes de fermentation pour en améliorer la qualité en tenant compte de ces paramètres socio-géo-économiques et des pratiques de production analysées dans le cadre de ce travail sur le cacao malgache. A titre d'exemple, la méthode de fermentation en bacs en cascade employée à Madagascar est utilisée dans le cas de gros volumes (1,5 tonne de fèves fraîches). Le volume des fèves à La Réunion étant supposé beaucoup plus faible, il conviendrait d'effectuer des micro-fermentations, à l'aide de souches sélectionnées et dans des conditions plus adaptées. Un modèle économique original (de la production à la transformation en chocolat, différenciation des terroirs, attribution de mentions valorisantes tels que AB, Equitable…) reste donc à imaginer pour le lancement d'une telle filière à la Réunion afin que les cacaos de l'Océan Indien puissent être valorisés à leur juste valeur et dans un souci d'optimisation de leur qualité.

Bibliographie

Aculey P. C., Snitkjaer P., Owusu M., Bassompiere M., Takrama J., Nørgaard L., Petersen M. A. and Nielsen D. S. (2010). "Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics." *Journal of Food Science* **75**(6): 300-307.

Adler P., Frey L. J., Berger A., Bolten C. J., Hansen C. E. and Wittmanna C. (2014). "The key to acetate : metabolic fluxes of acetic acid bacteria under cocoa pulp fermentation - Simulating conditions." *Applied and Environmental Microbiology* **80**(15): 4702–4716.

Afoakwa E. O. (2010). "Chocolate science and technology." *Wiley-Blackwell, Oxford*.

Afoakwa E. O., Budu A. S., Mensah-Brown H., Takrama J. F. and Akomanyi E. (2014). "Changes in biochemical and physico-chemical qualities during drying of pulp preconditioned and fermented cocoa (Theobroma cacao) beans." *Journal of Nutritional Health & Food Science*.

Afoakwa E. O., Paterson A., Fowler M. and Ryan A. (2008). "Flavor formation and character in cocoa and chocolate : a critical review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**(9): 840-857.

Afoakwa E. O., Paterson A., Fowler M. and Ryan A. (2009). "Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry." *Food Chemistry* **113**: 208-215.

Afoakwa E. O., Quao J., Takrama J., Budu A. S. and Saalia F. K. (2011). "Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp preconditioning and fermentation." *Journal of Food Science and Technology* **47**(1): 3-11.

Almeida S. F. O., Silva L. R. C., Junior G. C. A. C., Oliveira G., Silva S. H. M., Vasconcelos S. and Lopes A. S. (2019). "Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon." *Acta Amazonica* **49**(1): 64-70.

Alvarez C., Pérez E., Boulanger R., Lares M., Assemat S., Davrieux F. and Cros E. (2012). "Aromatic compounds identification from Venezuelan Criollo cocoa, using Headspace Solid-Phase MicroExtraction and Gas Chromatography." *Vitae* **19**(1): S370-S372.

Amankwah D. (2016). Effect of different storage periods on the quality of dry cocoa beans of amelonado and mixed hybrid varieties cultivated at Wassa Amenfi West District of Western Region. Collège d'Agriculture et de Ressources naturelles ; Faculté d'Agriculture ; Département d'Horticulture. Kumasi, Ghana, Université des sciences et technologies Kwame Nkrumah. **Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies**.

Aprotosoaie A. C., Luca S. V. and Miron A. (2016). "Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—An overview." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15**(1): 73-91.

Arana-Sánchez A., Segura-García L. E., Kirchmayr M., Orozco-Ávila I., Lugo-Cervantes E. and Gschaedler-Mathis A. (2015). "Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **31**: 359-369.

Ardhana M. M. and Fleet G. H. (2003). "The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia." *International Journal of Food Microbiology* **86**: 87-99.

Are L. A. and Gwynne-Jones D. R. G. (1974). Cacao in West Africa. Harvesting and processing of Cocoa. Ibadan. Oxford, England, Oxford University Press**:** 101-114.

Assi-Clair B. J., Koné M. K., Kouamé K., Lahon M. C., Berthiot L., Durand N., Lebrun M., Julien-Ortiz A., Maraval I., Boulanger R. and Guéhi T. S. (2019). "Effect of aroma potential of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the volatile profile of raw cocoa and sensory attributes of chocolate produced thereof." *European Food Research and Technology* **245**(7): 1459-1471.

Augier F., Nganhou J., Barel M., Benet J. C. and Berthomieu G. (1998). "Réduction de l'acidité du cacao lors du séchage." *Plantations, recherche, développement* **Mars - Avril**: 127-133.

Azodanlou R., Darbellay C., Luisier J. L., Villetaz J. C. and Amadò R. (2003). "Development of a model for quality assessment of tomatoes and apricots." *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **36**(2): 223-233.

Baker D. M., Tomlins K. I. and Gay C. (1994). "Survey of Ghanian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour." *Food Chemistry* **51**(4): 425-431.

Ban Koffi L., Ouattara G. H., Karou T. G., Tagro Guehi S., Nemlin J. G. and Diopoh J. K. (2013). "Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes." *Agronomie Africaine* **25**(2): 159-170.

Barbin D. F., Maciel L. F., Bazoni C. H. V., Ribeiro M. S., Carvalho R. D. S., Bispo E. S., Miranda M. P. S. and Hirooka E. Y. (2018). "Classification and compositional characterization of different varieties of cocoa beans by near infrared spectroscopy and multivariate statistical analyses." *Journal of Food Science and Technology* **55**(7): 2457-2466.

Barel M. (2013). Qualité du cacao : L'impact du traitement post-récolte.

Barel M. (2016). Du cacao au chocolat : L'épopée d'une gourmandise. Versailles.

Barel M., Leon D. and Vincent J. C. (1985). "Influence du temps de fermentation du cacao sur la production des pyrazines du chocolat (Côte d'Ivoire)." *Café, Cacao, Thé* **29**(4): 277-286.

Bartley B. G. D. (2005). The genetic diversity of cacao and its utilization. UK: CABI Publ, Wallingford.

Bastos V. S., Santos M. F. S., Gomes L. P., Leite A. M. O., Paschoalin V. M. F. and Del Aguila E. M. (2018). "Analysis of the cocobiota and metabolites of *Moniliophthora perniciosa*-resistant *Theobroma cacao* beans during spontaneous fermentation in southern Brazil." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**: 4963-4970.

Bauermeister P. (1981). "Cocoa liquor roasting." *Manufacturing Confectioner* **61**(10): 43-45.

Beaulieu J. C. and Grimm C. C. (2001). "Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(3): 1345-1352.

Beckett S. T. (2009). Industrial chocolate manufacture and use. York, UK, Wiley-Blackwell Science.

Belitz H.-D., Grosch W. and Schieberle P. (2004). Food chemistry. Berlin–Heidelberg, Allemagne, Springer.

Belitz H.-D., Grosch W. and Schieberle P. (2009). Aroma compounds. Food Chemistry. Heidelberg, Allemagne, Springer**:** 340-402.

Berger R. G. (2007). Flavours and fragrances : Chemistry, bioprocessing and sustainability. Berlin, Springer Science & Business Media.

Biehl B. and Voigt J. (1982). Biochemistry of chocolate flavour precursors. International Cocoa Conference, Salvador de Bahia, Brésil.

Birlouez E. (2013). "Le chocolat, « nourriture des dieux »." *Phytothérapie* **11**: 74-77.

Bonaparte A., Alikhani Z., Madramootoo C. A. and Raghavan V. (1998). "Some quality characteristics of solar dried cocoa beans in St Lucia." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**: 553-558.

Bonvehí J. S. (2005). "Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder." *European Food Research and Technology* **221**(1-2): 19-29.

Bousquet E. (2013). Caractérisation et éléments de différenciation des cacaos dans la vallée du Sambirano à Madagascar. Systèmes Agricoles et Agroalimentaires Durables au Sud, Montpellier SupAgro. **Mémoire d'école d'ingénieur**.

Buamah R., Dzogbefia V. P. and Oldham J. H. (1997). "Pure yeast culture fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L) : effect on yield of sweatings and cocoa bean quality." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **13**(4): 457-462.

Büning-Pfaue H. (2003). "Analysis of water in food by near infrared spectroscopy." *Food Chemistry* **82**: 107-115.

Cadez N., Poot G. A., Raspor P. and Smith M. T. (2003). "*Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1671-1680.

Cadez N., Raspor P., de Cock A. W. A. M., Boekhout T. and Smith M. T. (2002). "Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*." *FEMS Yeast Research* **1**: 279-289.

Caligiani A., Acquotti D., Cirlini M. and Palla G. (2010). "^{1}H NMR study of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 12105-12111.

Camu N., De Winter T., Addo S. K., Takrama J. S., Bernaert H. and De Vuyst L. (2008b). "Fermentation of cocoa beans : influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**(13): 2288-2297.

Camu N., De Winter T., Verbrugghe K., Cleenwerck I., Vandamme P., Takrama J. S., Vancanneyt M. and De Vuyst L. (2007). "Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(6): 1809-1824.

Camu N., González A., De Winter T., Van Schoor A., De Bruyne K., Vandamme P., Takrama J. S., Addo S. K. and De Vuyst L. (2008a). "Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(1): 86-98.

CAOBISCO/ECA/FCC (2015). Fèves de cacao : Exigences de qualité de l'industrie du chocolat et du cacao.

Carly F. and Fickers P. (2018). "Erythritol production by yeasts : A snapshot of current knowledge." *Yeast* **35**: 455-463.

Carr J. G., Davies P. A. and Dougan J. (1979). Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia. Long Ashton, Bristol, Angleterre, Long Ashton Research Station.

Cempaka L., Aliwarga L., Purwo S. and Kresnowati M. T. A. P. (2014). "Dynamics of cocoa bean pulp degradation during cocoa bean fermentation : effects of yeast starter culture addition." *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences* **46**(1): 14-25.

Chen-Yen-Su A. (2014). Analyse morphologique et profils aromatique, sensoriel du cacao du Sambirano. Sciences du vivant. Valorisation des ressources naturelles. Saint-Denis, Université de la Réunion. **Mémoire de master 2:** 81 p.

Clapperton J. F. (1994). "A review of research to identify the origins of cocoa flavour characteristics." *Cocoa Growers' Bulletin* **48**: 7-16.

Clapperton J. F., Keung S. T. Y., Kee D. L. H. and Lockwood R. (1993). Genetic variation of cocoa flavour. Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.

Clapperton J. F., Yow S. T. K., Chan J., Lim D. H. K., Lockwood G., Romanczyk L. J. and Hammerstone J. F. (1994). "The contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour." *Tropical Agriculture (Trinidad)* **71**: 303-308.

Cleenwerck I., Gonzalez A., Camu N., Engelbeen K., De Vos P. and De Vuyst L. (2008). "*Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**: 2180-2185.

Counet C., Callemien D., Ouwerx C. and Collin S. (2002). "Use of gas chromatography - olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(8): 2385-2391.

Counet C., Ouwerx C., Rosoux D. and Collin S. (2004). "Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(20): 6243-6249.

Cozzolino D. and Moron A. (2004). "Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes." *Animal Feed Science and Technology* **111**: 161-173.

Crafack M., Keul H., Eskildsen C. E., Petersen M. A., Saerens S., Blennow A., Skovmand-Larsen M., Swiegers J. H., Petersen G. B., Heimdal H. and Nielsen D. S. (2014). "Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate." *Food Research International* **63**: 306-316.

Crafack M., Mikkelsen M. B., Saerens S., Knudsen M., Blennow A., Lowor S., Takrama J., Swiegers J. H., Petersen G. B., Heimdal H. and Nielsen D. S. (2013). "Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation." *International Journal of Food Microbiology* **167**(1): 103-116.

Crouzet J. (1998). "Arômes alimentaires." *Techniques de l'ingénieur*.

Dalmau E., Montesinos J. L., Lotti M. and Casas C. (2000). "Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*." *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 657-663.

Daniel H.-M., Vrancken G., Takrama J. F., Camu N., De Vos P. and De Vuyst L. (2009). "Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations." *FEMS Yeast Research* **9**(5): 774-783.

Davrieux F., Assemat S., Boulanger R., Sukha D. A., Eskes B., Paulin D. and Cros E. (2009). Characterization of cocoa clones from different origins for purine contents predicted by NIRS. 16th International Cocoa Research Conference. Grand Hyatt Hotel, Nusa Dua Bali, Indonesia.

Daza Safadi C. M. and Tapia Román E. A. (2017). Diseño de procesos poscosecha y evaluación de la fermentación mediante levaduras para cacao Nacional, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. **Ingenieros Agroindustriales y de Alimentos**.

De Camargo R., Leme J. and Martinelli Filho A. (1963). "General observations on the microflora of fermenting cocoa beans (*Theobroma cacao*) in Bahia (Brazil)." *Food Technology* **17**: 116-118.

De Vuyst L., Camu N., De Winter T., Vandemeulebroecke K., Van de Perre V., Vancanneyt M., De Vos P. and Cleenwerck I. (2008). "Validation of the $(GTG)_5$-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans." *International Journal of Food Microbiology* **125**: 79-90.

De Vuyst L., Lefeber T., Papalexandratou Z. and Camu N. (2010). The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. Ames, Wiley-Blackwell.

De Vuyst L. and Weckx S. (2016). "The cocoa bean fermentation process : from ecosystem analysis to starter culture development." *Journal of Applied Microbiology* **212**: 5-17.

Deak T. and Beuchat L. R. (1993). "Yeasts associated with fruit juice concentrates." *Journal of Food Protection* **56**(9): 777-782.

Dircks H. D. (2009). Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour. Sciences Chimiques et Ingénierie. Sydney, Australie, Université de Nouvelle-Galles du Sud. **Thèse de Doctorat**.

Dreosti I. E. (2000). "Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine." *Nutrition* **16**: 692-694.

Drysdale G. S. and Fleet G. H. (1988). "Acetic acid bacteria in winemaking : A review." *American Journal of Enology and Viticulture* **39**(2): 143-154.

Dzogbefia V. P., Buamah R. and Oldham J. H. (1999). "The controlled fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) using yeasts : enzymatic process and associated physico-chemical changes in cocoa sweatings." *Food Biotechnology* **13**(1): 1-12.

Enriquez G. A. (1992). Characteristics of cacao “Nacional” of Ecuador. International workshop on conservation, characterisation and utilisation of cocoa genetic resources in the 21st century. Port-d'Espagne, Trinité-et-Tobago, Cocoa Research Unit, Université des Indes occidentales**:** 269-278.

Ercolini D. (2004). "PCR-DGGE fingerprinting : novel strategies for detection of microbes in food." *Journal of Microbiological Methods* **56**: 297-314.

Escofier B. and Pagès J. (2008). Analyses factorielles simples et multiples. Paris, Dunod.

Eskes A. B., Guarda D., Garcia L. and Garcia P. (2007). "Is genetic variation for sensory traits of cocoa pulp related to fine flavor cocoa traits ?" *INGENIC Newsletter*(11): 22-28.

Fahrurrozi (2015). Microbiological and biochemical investigations of cocoa bean fermentation. Département de Chimie ; Faculté de Mathématiques, Informatiques et Sciences Naturelles. Hambourg, Université de Hambourg. **Thèse de Doctorat**.

Fernández Maura Y. (2015). Fungal diversity of cocoa (*Theobroma cacao*) in Cuba : from field to fermentation. Faculté des Bioingénieurs ; Earth and Life Institute ; Pole of Applied Microbiology (ELIM) ; Laboratory of Mycology. Louvain-la-Neuve, Université catholique de Louvain. **Thèse de Doctorat en Sciences agronomiques et ingénierie biologique**.

Fernández Maura Y., Balzarini T., Clapé Borges P., Evrard P., De Vuyst L. and Daniel H.-M. (2016). "The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations." *International Journal of Food Microbiology* **233**: 34-43.

Ferrão J. E. M. (2002). Cacau : tecnologia pós-colheita. Lisbonne, Instituto de Cooperação Portuguesa-Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Forsyth W. G. C. and Quesnel V. C. (1963). "The mechanism of cocoa curing." *Advances in Enzymology* **25**: 457-492.

Fowler M. S. (1999). Cocoa beans : from tree to factory. Oxford, Blackwell Science.

Fowler R. (1952). "Característica del cacao Nacional." *Notas técnicas* **2**: 1-165.

Frauendorfer F. and Schieberle P. (2006). "Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(15): 5521-5529.

Frauendorfer F. and Schieberle P. (2008). "Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(21): 10244-10251.

Freer S. N. and Greene R. V. (1990). "Transport of Glucose and Cellobiose by *Candida zuickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*." *The Journal of Biological Chemistry* **265**(22): 12864-12666.

Gálvez S. L., Loiseau G., Paredes J. L., Barel M. and Guiraud J.-P. (2007). "Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic." *International Journal of Food Microbiology* **114**: 124-130.

Galzy P. (1984). "Study of yeast flora from traditional cacao fermentation in Madagascar." *Revue des fermentations et des industries alimentaires*: 103-106.

Gargeya I. B., Pruitt W. R., Simmons R. B., Meyer S. A. and Ahearn D. G. (1990). "Occurrence of *Clavispora lusitaniae*, the teleomorph of *Candida lusitaniae*, among clinical isolates." *Journal of Clinical Microbiology* **28**(10): 2224-2227.

Gauthier B., Guiraud J., Vincent J. C., Parvais J. P. and Galzy P. (1977). "Remarques sur la flore de levures de la fermenation traditionnelle du cacao en Cote d’lvoire." *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires* **32**: 160-163.

Gill M. S., Mac Leod A. J. and Moreau M. (1984). "Volatile components of cocoa with particular reference to glucosinolate products." *Phytochemistry* **23**(9): 1937-1942.

Granvogl M., Bugan S. and Schieberle P. (2006). "Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems : New insights into pathways of the Strecker reaction." *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **54**(5): 1730-1739.

Grondin E. (2014). Exploration du potentiel biotechnologique des levures endémiques et indigènes de la Réunion et de Madagascar à produire des molécules d'arômes. UFR Sciences et Technologies ; Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé, Université de la Réunion. **Thèse de Doctorat**.

Guehi T. S., Dabonne S., Ban-Koffi L., Kedjebo K. D. and Irié B. Z. G. (2010a). "Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans." *Journal of Food Science and Technology* **2**(3): 163-171.

Guehi T. S., Dadie A. T., Koffi K. P. B., Dabonne S., Ban-Koffi L., Kedjebo K. D. and Nemlin G. J. (2010d). "Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans." *International Journal of Food Science and Technology* **45**: 2508-2514.

Guehi T. S., Koffi K. P. B. and Dabonne S. (2010b). "Spontaneous cocoa bean heap fermentation : Influence of the duration and turning on the quality of raw cocoa." *World Academy of Science, Engineering and Technology* **70**: 118-123.

Guehi T. S., Zahouli I. B., Ban-Koffi L., Fae M. A. and Nemlin J. G. (2010c). "Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material." *International Journal of Food Science and Technology* **45**: 1564-1571.

Guerrero S. E. G. (2012). "El cacao."

Gunasekaran V. and Das D. (2005). "Lipase fermentation : Progress and prospects." *Indian Journal of Biotechnology* **4**(4): 437-445.

Guy F., Prache S., Thomas A., Bauchart D. and Andueza D. (2011). "Prediction of lamb meat fatty acid composition using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS)." *Food Chemistry* **127**: 1280-1286.

Hamdouche Y. (2015). Discrimination des procédés de transformation post-récolte du Cacao et du Café par analyse globale de l'écologie microbienne. Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques ; Ecole doctorale Sciences des Procédés - Sciences des Aliments ; Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie. Montpellier, Montpellier SupAgro. **Thèse de Doctorat**.

Hamdouche Y., Guehi T., Durand N., Kedjebo K. B. D., Montet D. and Meile J.-C. (2015). "Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying : Towards the identification of molecular markers." *Food Control* **48**: 117-122.

Harland S. C. (1925). Studies in cacao. The method of pollination. Ninth West Indian Agr. Conf. Proc. Kingston, Jamaica**:** 61-69.

Harmon A. D. (1997). Solid-phase microextraction. New York, Marcel Decker, Inc.

Hashim L. and Chaveron H. (1994). "Extraction and determination of methylpyrazines in cocoa beans using coupled steam distillation–microdistillator." *Food Research International* **27**(6): 537-544.

Hasing M. H. (2004). Estudio de la variación en los contenidos de polifenoles y alcaloides, en almendras de cacao por efecto de los procesos de fermentación y tostado. Ecole Supérieure Polytechnique de Chimborazo. Riobamba, Equateur, Faculté de Sciences, Ecole de Biochimie et Pharmacie. **Thèse de Doctorat**.

Hernández- Hernández C., López-Andrade P. A., Ramírez-Guillermo M. A., Ramírez D. G. and Caballero Pérez J. F. (2016). "Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico." *Food Science & Nutrition* **4**(5): 690-695.

Hernández M. P. L., Núñez J. C., Gómez M. S. H. and Tovar M. D. L. (2019). "Physicochemical and microbiological dynamics of the fermentation of the CCN51 cocoa material in three maturity stages." *Revista Brasileira de Fruticultura* **41**(3).

Hirst K. K. (2011). "Chocolate domestication : The history of the domestication of chocolate." *Archaeology*.

Ho V. T. T., Fleet G. H. and Zhao J. (2018). "Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms." *International Journal of Food Microbiology* **279**: 43-56.

Ho V. T. T., Zhao J. and Fleet G. (2014). "Yeasts are essential for cocoa bean fermentation." *International Journal of Food Microbiology* **174**: 72-87.

Ho V. T. T., Zhao J. and Fleet G. (2015). "The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation." *International Journal of Food Microbiology* **205**: 54-67.

Ho V. T. T., Zhao J., Srzednicki G. and Fleet G. (2013). The functional role of microorganisms in cocoa bean fermentation. Proceedings of AFHW 2013 ; International symposium on agri-foods for health and wealth. Golden Tulip Sovereign Hotel, Bangkok, Thaïlande.

Hoskin J. and Dimick P. (1984). "Role of sulfur compounds in the development of chocolate flavours — A review." *Process Biochemistry* **19**: 150-156.

ICCO (2000). Producción mundial de cacao. Boletin Informativo SPIS/MAG/SICA**:** 1p.

ICCO. (2016, consulté le 13/11/2016). "Fine or flavour cocoa." from http://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html.

ICCO (2019). Quarterly bulletin of cocoa statistics. **XLV**.

Illeghems K., De Vuyst L., Papalexandratou Z. and Weckx S. (2012). "Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity." *PLoS ONE* **7**(5).

Illeghems K., De Vuyst L. and Weckx S. (2013). "Complete genome sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well-adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem." *BMC Genomics* **14**: 526.

Jacquet M., Vincent J.-C., Hahn J. and Lotodé R. (1980). "Le séchage artificiel des fèves de cacao." *Café, Cacao, Thé* **XXIV**(1): 43-55.

Jaeger K.-E. and Reetz M. T. (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." *Trends in Biotechnology* **16**(9): 396-403.

James S. A., Bond C. J. and Roberts I. N. (2001). "*Candida sorbosivorans* sp. nov., a new member of the genus *Candida* Berkhout." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1215-1219.

Jamili, Yanti N. A. and Susilowati P. E. (2016). "Diversity and the role of yeast in spontaneous cocoa bean fermentation from Southeast Sulawesi, Indonesia." *Biodiversitas* **17**(1): 90-95.

Jespersen L., Nielsen D. S., Hønholt S. and Jakobsen M. (2005). "Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans." *FEMS Yeast Research* **5**(4-5): 441-453.

Jinap S., Siti M. H. and Norsiati M. G. (1994). "Formation of methylpyrazine during cocoa bean fermentation." *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* **17**(1): 27-32.

Jinap S., Wan-Rosli W. I., Russly A. R. and Nordin L. M. (1998). "Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**(4): 441-448.

Jindamorakot S., Ninomiya S., Limtong S., Yongmanitchai W., Tuntirungkij M., Potacharoen W., Tanaka K., Kawasaki H. and Nakase T. (2009). "Three new species of bipolar budding yeasts of the genus *Hanseniaspora* and its anamorph *Kloeckera* isolated inThailand." *FEMS Yeast Research* **9**: 1327-1337.

Kadow D., Bohlmann J., Phillips W. and Lieberei R. (2013). "Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.)." *Journal of Applied Botany and Food Quality* **86**: 90-98.

Kaminarides S. E. and Anifantakis E. M. (1989). "Evolution of the microflora of Kopanisti cheese during ripening. Study of the yeast flora." *Lait* **69**(6): 537-546.

Kanmogne A., Jannot Y. and Nganhou J. (2012). "Description concise et analyse des systèmes utilisés dans la région Sud du Cameroun pour le séchage du cacao." *Tropicultura* **30**(2): 94-102.

Kealey K. S., Snyder R. M., Romanczyk L. J., Hammerstone J. F., Buck M. M. and Cipolla G. G. (2004). Cocoa extracts prepared from cocoa solids having high cocoa polyphenol contents. Patent US 6,737,088 B1, Mars, Incorporated.

Kedjebo K. B. D., Guehi T. S., Kouakou B., Durand N., Aguilar P., Fontana A. and Montet D. (2015). "Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin A in raw cocoa beans." *Food Additives & Contaminants : Part A* **33**(1): 157-166.

Koffi O., Samagaci L., Goualie B. and Niamke S. (2017). "Diversity of yeasts involved in cocoa fermentation of six major cocoa-producing regions in Ivory Coast." *European Scientific Journal* **13**(30): 496-516.

Koné K. M., Guéhi T. S., Durand N., Ban-Koffi L., Berthiot L., Fontana Tachon A., Brou K., Boulanger R. and Montet D. (2016). "Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation." *Food Research International* **89**: 910-917.

Kongor J. E., Hinneh M., de Walle D. V., Afoakwa E. O., Boeckx P. and Dewettinck K. (2016). "Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review." *Food Research International* **82**: 44-52.

Kouakou B. J., Irie B. Z., Dick E., Nemlin G. and Bomisso L. E. (2013). "Caractérisation des techniques de séchage du cacao dans les principales zones de production en Côte d'Ivoire et détermination de leur influence sur la qualité des fèves commercialisées." *Journal of Applied Biosciences* **64**: 4813-4821.

Krings U., Zelena K., Wu S. and Berger R. G. (2006). "Thin-layer high-vacuum distillation to isolate volatile flavour compounds of cocoa powder." *European Food Research and Technology* **223**: 675-681.

Lachance M.-A. (1995). "Yeast communities in a natural tequila fermentation." *Antonie van Leeuwenhoek* **68**(2): 151-160.

Lachenaud P. and Labouisse J.-P. (2019). Guide d'identification des cacaoyers des îles du sud-ouest de l'océan Indien. Saint-Denis, CIRAD-BIOS-UMR PVBMT.

Lagos Narváez J. F. (2017). Identificación y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (*Theobroma cacao*) provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales ; Escuela de Ciencias Biológicas. Quito, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. **Licenciado en Ciencias Biológicas**.

Lagunes-Gálvez S., Loiseau G., Paredes J. L., Barel M. and Guiraud J.-P. (2007). "Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic." *International Journal of Food Microbiology* **114**(1): 124-130.

Lanaud C. (1986). "Utilisation des marqueurs enzymatiques pour l'étude génétique du cacaoyer : *Theobroma cacao* L. I. Contrôle génétique et "linkage" de neuf marqueurs génétiques." *Café, Cacao, Thé* **30**(4): 259-270.

Lasisi D. (2014). "A comparative study of effects of drying methods on quality of cocoa beans." *International Journal of Engineering Research & Technology* **3**(1): 991-996.

Laurent V. (1993). "Etude de la diversité génétique du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) basée sur le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP)."

Leal Jr G. A., Gomes L. H., Efraim P., Tavares F. C. A. and Figueira A. (2008). "Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes." *FEMS Yeast Research* **8**: 788-798.

Lee A. H., Neilson A. P., O'Keefe S. F., Arogo Ogejo J., Huang H., Ponder M., Chu H. S. S., Jin Q., Pilot G. and Stewart A. C. (2019). "A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation." *European Food Research and Technology* **245**(2): 511-519.

Lefeber T., Gobert W., Vrancken G., Camu N. and De Vuyst L. (2011). "Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels." *Food Microbiology* **28**(3): 457-464.

Lefeber T., Janssens M., Camu N. and De Vuyst L. (2010). "Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(23): 7708-7716.

Lerceteau E., Robert T., Pétiard V. and Crouzillat D. (1997). "Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers." *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 10-19.

Li E., Liu C. and Liu Y. (2012). "Evaluation of yeast diversity during wine fermentations with direct inoculation and *pied de cuve* method at an industrial scale." *Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**(7): 960-966.

Liendo R. J. (2015). "Effect of the turning on the sensory profiles of the fermented cocoa." *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* **32**: 41-62.

Lima L. J. R., Almeida M. H., Nout M. J. R. and Zwietering M. H. (2011). "*Theobroma cacao* L., "the food of the gods" : quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of the fermentation." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**(8): 731-761.

Liu J., Liu M., He C., Song H., Guo J., Wang Y., Yang H. and Su X. (2015b). "A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate : relationship to sensory perception." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**(6): 1362-1372.

Liu Y., Ma D.-H., Wang X.-C., Liu L.-P., Fan Y.-X. and Cao J.-X. (2015a). "Prediction of chemical composition and geographical origin traceability of Chinese export tilapia fillets products by near infrared reflectance spectroscopy." *LWT - Food Science and Technology* **60**: 1214-1218.

Loor R. G., Risterucci A. M., Courtois B., Fouet O., Jeanneau M., Rosenquist E., Amores F., Vasco A., Medina M. and Lanaud C. (2009). "Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador." *Tree Genetics and Genomes* **5**(3): 421-433.

Loor Solórzano R. G. (2007). Contribution à l'étude de la domestication de la variété de cacaoyer Nacional d'Équateur : recherche de la variété native et de ses ancêtres sauvages. Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement (SIBAGHE) ; Spécialité : Biologie Intégrative des Plantes (BIP), Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier Supagro. **Thèse de Doctorat en sciences agronomiques**.

Lopez A. S. and Dimick P. S. (1995). Cocoa fermentation. Weinheim, VCH.

Luan Y., Zhang B.-Q., Duan C.-Q. and Yan G.-L. (2018). "Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*." *LWT - Food Science and Technology* **92**: 177-186.

Luna F., Crouzillat D., Cirou L. and Bucheli P. (2002). "Chemical composition and flavor of ecuadorian cocoa liquor." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(12): 3527-3532.

Maga J. A. (1982). Pyrazines in flavour. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co.

Magi E., Bono L. and Di Carro M. (2012). "Characterization of cocoa liquors by GC-MS and LC-MS/MS : focus on alkylpyrazines and flavanols." *Journal of Mass Spectrometry* **47**(9): 1191-1197.

Martin V., Valera M. J., Medina K., Boido E. and Carrau F. (2018). "Oenological impact of the *Hanseniaspora*/*Kloeckera* yeast genus on wines — A review." *Fermentation* **4**(76).

McKinney C. (2016). Accounting practices of cacao farmers in Southern Belize. Department of Accounting, Appalachian State University. **Bachelor of Science**.

Meersman E., Steensels J., Mathawan M., Wittocx P.-J., Saels V., Struyf N., Bernaert H., Vrancken G. and Verstrepen K. J. (2013). "Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota." *Plos One* **8**(12): e81559.

Melo D. L. F. M., Santos F. C., Barbosa Junior A. M., Santos P. O., Carnelossi M. A. G. and Trindade R. C. (2007). "Identification of yeasts isolated from the pulp in nature and the production of homemade "umbu" wine." *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**(5): 887-892.

Menezes A. G. T., Batista N. N., Ramos C. L., Silva A. R. A., Efraim P., Pinheiro A. C. M. and Schwan R. F. (2016). "Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*." *Food Research International* **81**: 83-90.

Meyer B., Biehl B., Said M. B. and Samarakoddy R. J. (1989). "Post harvest pod storage : A method of pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **48**(3): 285-304.

Miescher Schwenninger S., Freimüller Leischtfeld S. and Gantenbein-Demarchi C. (2016). "High-throughput identification of the microbial biodiversity of cocoa bean fermentation by MALDI-TOF MS." *Letters in Applied Microbiology* **63**: 347-355.

Moens F., Lefeber T. and De Vuyst L. (2014). "Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation." *Applied and Environmental Microbiology* **80**(6): 1848-1857.

Moreira I. M. V., Miguel M. G. C. P., Duarte W. F., Dias D. R. and Schwan R. F. (2013). "Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids." *Food Research International* **54**: 9-17.

Moreira N., Pina C., Mendes F., Couto J. A., Hogg T. and Vasconcelos I. (2011). "Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications." *Food Control* **22**: 662-667.

Mota-Gutierrez J., Botta C., Ferrocino I., Giordano M., Bertolino M., Dolci P., Cannoni M. and Cocolin L. (2018). "Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans." *Applied and Environmental Microbiology* **84**(19).

Motamayor J. C., Lachenaud P., Da Silva e Mota J. W., Loor R., Kuhn D. N., Brown J. S. and Schnell R. J. (2008). "Geographic and genetic population differentiation of the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.)." *PLoS ONE* **3**(10): e331.

Motamayor J. C., Risterucci A. M., Heath M. and Lanaud C. (2003). "Cacao domestication II : progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar." *Heredity* **91**(3): 322-330.

Muggler-Chavan F. and Reymond D. (1967). "Constituants aromatiques de cacaos de divers provenances." *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **58**: 466-472.

Muyzer G. (1999). "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." *Current Opinion in Microbiology* **2**: 317–322.

N'Goran J. A. K., Laurent V., Risterucci A. M. and Lanaud C. (1994). "Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RADP markers." *Heredity* **73**: 589-597.

Nicolaisen M. H. and Ramsing N. B. (2002). "Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria." *Journal of Microbiological Methods* **50**(2): 189-203.

Nielsen D. S., Hønholt S., Tano-Debrah K. and Jespersen L. (2005). "Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)." *Yeast* **22**: 271-284.

Nielsen D. S., Teniola O. D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T. S. and Holzapfel W. H. (2007). "The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods." *International Journal of Food Microbiology* **114**: 168-186.

Nogales J., Graziani de Fariñas L. and Ortiz de Bertorelli L. (2006). "Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera." *Agronomía Tropical* **56**(1): 5-20.

Nosti J. J. (1953). *Café, cacao, thé*: 88-91.

Oberparleiter S. and Ziegleder G. (1997). "Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality." *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A* **204**(2): 156-160.

OMEF (2008). Etude de marché de la filière cacao**:** 21 p.

Ostovar K. and Keeney P. G. (1973). "Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cocoa beans." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **38**: 611-617.

Otomfo A. T. (2014). Effect of stages of ripening and tray fermentation method on the quality of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. Collège d'Agriculture et de Ressources naturelles ; Faculté d'Agriculture. Kumasi, Ghana, Université des sciences et technologies Kwame Nkrumah. **Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies**.

Owusu M. (2010). Influence of raw material and processing on aroma in chocolate. Faculté des Sciences de la Vie, Université de Copenhague. **Thèse de Doctorat**.

Pando Bedriñana R., Querol Simón A. and Suárez Valles B. (2010). "Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias." *Food Microbiology* **27**: 503-508.

Papalexandratou Z., Camu N., Falony G. and De Vuyst L. (2011c). "Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil." *Food Microbiology* **28**: 964-973.

Papalexandratou Z. and De Vuyst L. (2011). "Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis." *FEMS Yeast Research* **11**(7): 564-574.

Papalexandratou Z., Falony G., Romanens E., Jimenez J. C., Amores F., Daniel H.-M. and De Vuyst L. (2011b). "Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations." *Applied and Environmental Microbiology* **77**(21): 7698-7714.

Papalexandratou Z., Lefeber T., Bahrim B., Lee O. S., Daniel H.-M. and De Vuyst L. (2013). "*Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance

of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process." *Food Microbiology* **35**: 73-85.

Papalexandratou Z., Vrancken G., De Bruyne K., Vandamme P. and De Vuyst L. (2011a). "Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria." *Food Microbiology* **28**: 1326-1338.

Passos F. M. L., Silva D. O., Lopez A., Ferreira C. L. L. F. and Guimarães W. V. (1984). "Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia." *Journal of Food Science* **49**: 205-208.

Patrignani F., Chinnici F., Serrazanetti D. I., Vernocchi P., Ndagijimana M., Riponi C. and Lanciotti R. (2016). "Production of volatile and sulfur compounds by 10 *Saccharomyces cerevisiae* strains inoculated in Trebbiano must." *Frontiers in Microbiology* **7**(243).

Pawliszyn J. (2001). Solid-phase microextraction. New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers.

Pereira G. V. M., Alvarez J. P., Neto D. P. C., Soccol V. T., Tanobe V. O. A., Rogez H., Góes-Neto A. and Soccol C. R. (2017). "Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans." *LWT - Food Science and Technology* **84**: 290-297.

Pereira G. V. M., Magalhães K. T., Almeida E. G., Coelho I. S. and Schwan R. F. (2013). "Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank : Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties." *International Journal of Food Microbiology* **161**: 121-133.

Pereira G. V. M., Miguel M. G. C. P., Ramos C. L. and Schwan R. F. (2012). "Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(15): 5395-5405.

Pereira G. V. M., Soccol V. T. and Soccol C. R. (2016). "Current state of research on cocoa and coffee fermentations." *Current Opinion in Food Science* **7**: 50-57.

Pérez-Brito D., Magaña-Alvarez A., Lappe-Oliveras P., Cortes-Velazquez A., Torres-Calzada C., Herrera- Suarez T., Larqué-Saavedra A. and Tapia-Tussell R. (2015). "Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA fingerprinting." *Journal of Microbiology* **53**(1): 14-20.

Pérez Piza R. (2009). La calidad del cacao. Ecuador, Quito, EC: CAMAREN/INIAP, Estación Experimental Central de la Amazonía.

Pitipone L. (2016). Global situation and prospects of the cocoa and chocolate markets. Current challenges and opportunities. 2nd Cocoa Revolution, Hô Chi Minh-Ville.

Portillo E., Graziani de Fariñas L. and Cros E. (2006). "Effect of some factors post-harvest on the sensory quality of the Criollo cocoa porcelana (*Theobroma cacao* L.)." *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* **23**: 48-55.

Portillo E., Labarca M., Grazziani L., Cros E., Assemat S., Davrieux F., Boulanger R. and Marcano M. (2009). "Aroma formation of Criollo cocoa (*Theobroma cacao* L.) in function of the post-harvest treatment in Venezuela." *Revista UDO Agrícola* **9**(2): 458-468.

Pound F. J. (1932). "Studies on fruitfulness in cacao. Evidence for partial sterility." *First annual Report on Cacao Research*: 26-28.

Preyer-Buitenzorg A. (1901). "Über kakaofermentation." *Tropenpflanzer* **5**: 157-173.

Puziah H., Jinap S., Kharidah M. and Asbi A. (1998). "Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**: 543-550.

Qin X.-W., Lai J.-X., Tan L.-H., Hao C.-Y., Li F.-P., He S.-Z. and Song Y.-H. (2017). "Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China." *International Journal of Food Properties* **20**(10): 2261-2275.

Rahaingosambatra D. H. (2014). Etude des dispositifs de cultures de cacaoyers dans le Sambirano par l'évaluation de leur potentiel de productivité et l'appréciation de la qualité des produits, Université d'Antananarivo.

Rakotomaharo P. (1973). Culture du cacaoyer en milieu paysanal dans le Sambirano. Antananarivo, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA). **Mémoire d'école d'ingénieur**.

Ramos C. L., Dias D. R., Miguel M. G. C. P. and Schwan R. F. (2014). "Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation." *Food Research International* **64**: 908-918.

Ranaivoson L. B. (2009). Etude sur l'amélioration de la qualité du cacao et l'augmentation du rendement du cacaoyer dans le district d'Ambanja. Agriculture. Antananarivo, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo. **Mémoire d'école d'ingénieur**.

Reineccius G. (2006). Flavor chemistry and technology. Boca Raton, CRC Press.

Reineccius G. A., Keeney P. G. and Weissberger W. (1972). "Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **20**(2): 202-206.

Renault P.-E. (2010). Caractérisation phénotypique de l'espèce *Torulaspora delbrueckii* en conditions oenologiques. Application à la co-inoculation avec l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Mention : Sciences, Technologie, Santé ; Option : Oenologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2. **Thèse de Doctorat**.

Riu-Aumatel M., Castellari M., Lopez-Tamames E., Galassi S. and Buxaderas S. (2004). "Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS." *Food Chemistry* **87**(4): 627-637.

Rodriguez-Campos J., Escalona-Buendía H. B., Contreras-Ramos S. M., Orozco-Avila I., Jaramillo-Flores E. and Lugo-Cervantes E. (2012). "Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa." *Food Chemistry* **132**(1): 277-288.

Rodriguez-Campos J., Escalona-Buendía H. B., Orozco-Avila I., Lugo-Cervantes E. and Jaramillo-Flores M. E. (2011). "Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis." *Food Research International* **44**(1): 250-258.

Roelofsen P. A. (1958). "Fermentation, drying and storage of cacao beans." *Advances in Food Research* **8**: 225-296.

Roelofsen P. A. and Giesberger G. (1947). "Onderzoekingen over cacaobereiding." *Archiv voor de Koffiecultur in Nederlandisch-Indie* **16**: 119-159.

Rojas V., Gil J. V., Piñaga F. and Manzanares P. (2001). "Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts." *International Journal of Food Microbiology* **70**: 283-289.

Romanens E., Freimüller Leischtfeld S., Volland A., Stevens M., Krähenmann U., Isele D., Fischer B., Meile L. and Miescher Schwenninger S. (2019). "Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted antifungal co-cultures for cocoa bean fermentation." *International Journal of Food Microbiology* **290**: 262-272.

Rombouts J. E. (1952). "Observations on the microflora of fermenting cacao beans in Trinidad." *Proceedings of the Society for Applied Bacteriology* **15**: 103-111.

Rombouts J. E. (1953). "A critical review of the yeast species previously described from cacao." *Tropical Agriculture* **30**: 34-41.

Rottiers H., Sosa D. A. T., De Winne A., Ruales J., De Clippeleer J., De Leersnyder I., De Wever J., Everaert H., Messens K. and Dewettinck K. (2019). "Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans." *European Food Research and Technology* **245**(9): 1917-1937.

Ruiz Pinargote M. A., Mera Morán O. L., Prado Cedeño A. J. and Cedeño Guzmán W. P. (2015). "Influence of harvest time on the quality of Ecuadorian cocoa liquor." *ESPAMCIENCIA* **5**(2): 79-87.

Sabik H., Fortin J. and Martin N. (2012). "Identification of pyrazine derivatives in a typical maple syrup using headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry." *Food Chemistry* **133**: 1006-1010.

Saerens S. and Swiegers J. H. (2016). Enhancement of cocoa quality and flavor by using *Pichia kluyveri* yeast starter culture for cocoa fermentation.

Saerens S. M. G., Delvaux F. R., Verstrepen K. J. and Thevelein J. M. (2010). "Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbial Biotechnology* **3**(2): 165-177.

Saltini R., Akkerman R. and Frosch S. (2013). "Optimizing chocolate production through traceability : A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality." *Food Control* **29**(1): 167-187.

Samah O. A., Putih M. F. and Selamat J. (1992). "Biochemical changes during fermentation of cocoa beans inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (wild strain)." *International Journal of Food Science and Technology* **29**(6): 341-343.

Samah O. A., Putih M. F., Selamat J. and Alimon H. (1993). "Fermentation products in cocoa beans inoculated with *Acetobacter xylinum*." *ASEAN Food Journal* **8**: 22-25.

Sanchez J., Daguenet G., Guiraud J. P., Vincent J. C. and Galzy P. (1985). "A study of the yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans." *LWT-Food Science and Technology* **18**: 69-75.

Sánchez T., Ceballos H., Dufour D., Ortiz D., Morante N., Calle F., Zum Felde T., Domínguez M. and Davrieux F. (2014). "Prediction of carotenoids, cyanide and dry matter contents in fresh cassava root using NIRS and Hunter color techniques." *Food Chemistry* **151**: 444-451.

Sandhya M. V. S., Yallappa B. S., Varadaraj M. C., Puranaik J., Jaganmohan Rao L., Janardhan P. and Murthy P. S. (2016). "Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation." *LWT - Food Science and Technology* **65**: 731-738.

Saran S., Mukherjee S., Dalal J. and Saxena R. K. (2015). "High production of erythritol from *Candida sorbosivorans* SSE-24 and its inhibitory effect on biofilm formation of *Streptococcus mutans*." *Bioresource Technology* **198**: 31-38.

Schieberle P. (1995). New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. Amsterdam, Elsevier.

Schmitz H. and Shapiro H.-Y. (2012). "The Future of chocolate." *Scientific American* **306**(2).

Schnermann P. and Schieberle P. (1997). "Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**(3): 867-872.

Schwan R. F. (1998). "Cocoa fermentation conducted with a defined microbial cocktail inoculum." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(4): 1477-1483.

Schwan R. F., Pereira G. V. M. and Fleet G. H. (2015). Microbial activities during cocoa fermentation. Floride, Etats-Unis, CRC Press.

Schwan R. F., Rose A. H. and Board R. G. (1995). "Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp." *Journal of Applied Bacteriology (Symposium Supplement)* **79**: 96-107.

Schwan R. F. and Wheals A. (2004). "The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**(4): 205-221.

Senanayake M., Jansz E. R. and Buckle K. A. (1997). "Effect of different mixing intervals on the fermentation of cocoa beans." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**: 42-48.

Serra J. L., Moura F. G., Pereira G. V. M., Soccol C. R., Rogez H. and Darnet S. (2019). "Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing." *LWT - Food Science and Technology* **106**: 229-239.

Silwar R. (1988). "Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of cocoa aroma. Quantitative determination of steam-volatile aroma constituents." *Café, Cacao, Thé* **32**(3): 243-249.

Solorzano R. G. L., Fouet O., Lemainque A., Pavek S., Boccara M., Argout X., Amores F., Courtois B., Risterucci A. M. and Lanaud C. (2012). "Insight into the wild origin, migration and domestication history of the fine flavour Nacional *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador." *Plos One* **7**(11): e48438.

Song J., Fan L. and Beaudry R. M. (1998). "Application of solid phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(9): 3721-3726.

Soria J. V. (1996). "Principales variedades cultivadas en América tropical." *Notas técnicas* **16**: 261-266.

Steffen A. and Pawlizyn J. (1996). "Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(8): 2187-2193.

Steinmann A. (1928). "Onderzoekingen over cacao-fermentatie: II. De biologie der cacao-gisten." *Arch. voor de Cacao en Andere Klainne Cultures in Nederlandsch - Indie* **3**: 71-80.

Sukha D. A., Butler D. R., Umaharan P. E. and Boult E. (2008). "The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans." *European Food Research and Technology* **226**(3): 405-413.

Taylor A. J. (2002). Food flavour technology. Royaume-Uni, Sheffield Academic Press.

Teng-Sin O., Sepiah M. and Khairul Bariah S. (2016). "Diversity of yeast species identified during spontaneous shallow box fermentation of cocoa beans in Malaysia." *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology* **3**(10): 379-385.

Thompson S. S., Miller K. B. and Lopez A. S. (2001). Cocoa and coffee. Washington, Etats-Unis, ASM Press.

Thompson S. S., Miller K. B. and Lopez A. S. (2007). Cocoa and coffee. Washington, Etats-Unis, ASM Press.

Thompson S. S., Miller K. B., Lopez A. S. and Camu N. (2013). Cocoa and coffee. Washington, Etats-Unis, ASM Press.

Tixier C. (2013). "De l'arbre à cacao au chocolat : voyage à la source des arômes et des saveurs." *Phytothérapie* **11**: 79-84.

Tofalo R., Fusco V., Böhnlein C., Kabisch J., Logrieco A. F., Habermann D., Cho G.-S., Benomar N., Abriouel H., Schmidt-Heydt M., Neve H., Bockelmann W. and Franz C. M. A. P. (2019). "The life and times of yeasts in traditional food fermentations." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Tomlins K. I., Baker D. M., Daplyn P. and Adomako D. (1993). "Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa." *Food Chemistry* **46**(3): 257-263.

Torres Moreno M. (2012). Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro. Département de Biochimie et Biotechnologie. Reus, Université Rovira i Virgili. **Thèse de Doctorat**.

Torres O., Graziani de Fariñas L., Ortiz de Bertorelli L. and Trujillo A. (2004). "Efecto del tiempo transcurrido entre la cosecha y el desgrane de la mazorca del cacao tipo forastero de Cuyagua sobre características del grano en fermentación." *Agronomía Tropical* **54**(4): 481-495.

Trindade R. C., Resende M. A., Silva C. M. and Rosa C. A. (2002). "Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits." *Systematic and Applied Microbiology* **25**(2): 294-300.

Vakhlu J. and Kour A. (2006). "Yeast lipases : Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning." *Electronic Journal of Biotechnology* **9**(1): 69-85.

van der Kooij S. (2013). Market study of fine flavour cocoa in 11 selected countries - revised version. Amsterdam, Royal Tropical Institute, KIT Development Policy & Practice.

Van Praag M., Stein H. S. and Tibetts M. S. (1968). "Steam volatile aroma constituents of roasted cocoa beans." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **16**(6): 1005-1008.

Verstrepen K. J., Van Laere S. D. M., Vanderhaegen B. M. P., Derdelinckx G., Dufour J.-P., Pretorius I. S., Winderickx J., Thevelein J. M. and Delvaux F. R. (2003). "Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(9): 5228-5237.

Vincent J. C. (1970). "Influence de différents traitements technologiques sur la fermentation du cacao et le goût du chocolat." *Café, Cacao, Thé* **14**(4): 303-322.

Visintin S., Alessandria V., Valente A., Dolci P. and Cocolin L. (2016). "Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in west Africa." *International Journal of Food Microbiology* **216**: 69-78.

Visintin S., Ramos L., Batista N., Dolci P., Schwan F. and Cocolin L. (2017). "Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation." *International Journal of Food Microbiology* **257**: 31-40.

Vitzthum O. P., Werkhoff P. and Hubert P. (1975). "Volatile components of roasted cocoa : Basic fraction." *Journal of Food Science* **40**(5): 911-915.

Wood G. A. R. and Lass R. A. (1985). Cocoa. Londres, Longman.

Wood G. A. R. and Lass R. A. (1987). Cocoa. Londres, Longman.

Xiao Z., Lu J. R., Ma C. and Xu P. (2009). "Formation and identification of trimethylimidazole during tetramethylpyrazine production from glucose by *Bacillus* strains." *Biotechnology Letters* **31**: 1421-1425.

Xiccato G., Trocino A., Tulli F. and Tibaldi E. (2004). "Prediction of chemical composition and origin identification of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)." *Food Chemistry* **86**: 275-281.

Xu P., Xiao Z., Wei Z. and Du Y. (2011). Bacillus *Pumilus* strain for high yield of tetramethylpyrazine.

Yang X. and Peppard T. (1994). "Solid-phase microextraction for flavor analysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**(9): 1925-1930.

Yu H., Zhou Y., Fu X., Xie L. and Ying Y. (2007). "Discrimination between Chinese rice wines of different geographical origins by NIRS and AAS." *European Food Research and Technology* **225**: 313-320.

Zahouli G. I. B., Guehi T. S., Fae M. A., Ban-Koffi L. and Nemlin J. G. (2010). "Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material." *Advance Journal of Food Science and Technology* **2**(4): 184-190.

Zak D. L., Ostovar K. and Keeney P. G. (1972). "Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpyrazine during fermentation of cocoa beans." *Journal of Food Science* **37**: 967-968.

Zhang B., Rong Z. Q., Shi Y., Wu J. G. and Shi C. H. (2011). "Prediction of the amino acid composition in brown rice using different sample status by near-infrared reflectance spectroscopy." *Food Chemistry* **127**: 275-281.

Ziegleder G. (1990). "Linalool contents as characteristic of some flavor grade cocoas." *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **191**: 306-309.

Ziegleder G. (1991). "Composition of flavor extracts of raw and roasted cocoas." *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **192**(6): 521-525.

Ziegleder G. (2009). Flavour development in cocoa and chocolate, Blackwell Publishing Ltd.

Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques morphologiques des cabosses et des fèves de cacao Criollo, Forastero et Trinitario (Are et Gwynne-Jones, 1974; Wood et Lass, 1985)..... 21

Tableau II. Composés volatils produits par des souches de levures et leurs notes olfactives associées 47

Tableau III. Critères de classification des cacaos 56

Tableau IV. Résumé des échantillons prélevés à Madagascar 62

Tableau V. Conditions des réactions de la PCR pour les ADN fongiques avant la RFLP..... 71

Tableau VI. Conditions des réactions de la PCR pour les ADN fongiques avant le séquençage..... 72

Tableau VII. Conditions des réactions de la PCR pour les ADN fongiques avant DGGE..... 79

Tableau VIII. Solutions dénaturantes à 70 % (solution 1) et à 40 % (solution 2)..... 80

Tableau IX. Conditions des réactions de la PCR après DGGE..... 81

Tableau X. Nombre de fève pour 100 g des 18 échantillons de cacao par variété..... 86

Tableau XI. Ratio théobromine/caféine des 18 échantillons de cacao 88

Tableau XII. Classification interne des fèves fermentées de cacao selon les pays producteurs (norme ISO 2451)..... 90

Tableau XIII. Classification internationale des fèves fermentées de cacao (norme ISO 2451)..... 91

Tableau XIV. Pourcentages des fèves violettes, claires, brunes et plates des 18 échantillons de cacao 92

Tableau XV. Moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires, brunes et plates pour les deux campagnes pour les 3 variétés de cacao..... 92

Tableau XVI. Différences significatives des moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires et brunes au seuil de risque 5 % entre les deux campagnes des échantillons de Criollo 93

Tableau XVII. Différences significatives des moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires et brunes au seuil de risque 5 % entre les deux campagnes des échantillons de Trinitario à casse Claire..... 93

Tableau XVIII. Différences significatives des moyennes des pourcentages des fèves violettes, claires et brunes au seuil de risque 5 % entre les deux campagnes des échantillons de Trinitario à casse Foncée 94

Tableau XIX. Grade des 18 échantillons selon la norme ISO 2451..... 95

Tableau XX. Classification des fèves de cacao marchand à Madagascar..... 95

Tableau XXI. Grade des 18 échantillons selon la classification de Madagascar 96

Tableau XXII. Proposition de classification des fèves de cacao à l'exportation de Madagascar..... 97

Tableau XXIII. Classification malgache des fèves fermentées de cacao..... 97

Tableau XXIV. Moyenne des notes des descripteurs pour les 3 variétés de cacao (test de Tukey)..... 100

Tableau XXV. Répartition des 18 liqueurs selon la CAH 103

Tableau XXVI. Moyenne des concentrations des composés volatils des 18 échantillons de cacao torréfié (ppm)..... 106

Tableau XXVII. Liste de composés responsables de l'arôme du cacao avec leur teneur exprimée en ppm et leur valeur OAV respective..... 108

Tableau XXVIII. Moyenne des concentrations des familles chimiques des composés volatils pour les 3 variétés de cacao (test de Tukey) (ppm)..... 110

Tableau XXIX. Moyenne des concentrations des composés volatils pour les 3 variétés de cacao (test de Tukey) (ppm)..... 112

Tableau XXX. Moyenne des concentrations des composés volatils des 27 échantillons de cacao torréfié de Criollo (ppm)..... 130

Tableau XXXI. Liste des 33 composés volatils retenus 132

Tableau XXXII. Matrice de corrélation de Pearson issue de l'ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire 137

Tableau XXXIII. Moyenne des concentrations des composés volatils des 36 échantillons de cacao torréfié de Trinitario à casse Claire (ppm) 140

Tableau XXXIV. Matrice de corrélation par Pearson issue de l'ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée 146

Tableau XXXV. Moyenne des concentrations des composés volatils des 36 échantillons de cacao torréfié de Trinitario à casse Foncée (ppm) 149

Tableau XXXVI. Flores levuriennes revivifiables issues de fèves fraîches de 16 échantillons de Madagascar identifiées 159

Tableau XXXVII. Moyenne des concentrations des composés volatils des 16 échantillons de cacao non torréfié (ppm) 165

Tableau XXXVIII. Somme des concentrations des 32 composés volatils par famille chimique des 16 échantillons de cacao non torréfié (ppm) 170

Tableau XXXIX. Résultats d'analyse en CG-SM après SPME des composés volatils produits par les levures étudiées sur milieux Sab, SabEtOH5, SabKKOEtOH5, SabKKOEtOH1 et SabKKOAq20 173

Tableau XL. Capacité de *H. opuntiae* et de *T. delbrueckii* à produire des composés volatils sur milieu Sabouraud et Sabouraud enrichie en extrait de cacao et éthanol à 1 % (SabKKOEtOH1) 176

Tableau XLI. 16 souches levuriennes revivifiables et 18 composés volatils des 16 échantillons de cacao non torréfié 181

Tableau XLII. Valeurs test des différentes variables aux composantes F1 à F14 de l'ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié 184

Tableau XLIII. Contributions des différentes variables aux composantes F1 à F14 de l'ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié 188

Liste des figures

Figure 1. Les formes de cabosse (Lachenaud et Labouisse, 2019) ... 22
Figure 2. Broyeur pour fèves de cacao (marque Capco) ... 31
Figure 3. Catador pour séparation des coques et du grué (marque Capco) ... 31
Figure 4. Pétrin pour le broyage du grué (marque Capco) ... 32
Figure 5. Raffineur à 3 rouleaux (marque Exakt) ... 33
Figure 6. Coupe de 50 fèves à l'aide d'une guillotine (Magra 12, Teserba) ... 35
Figure 7. Organisation de la collecte de cacao dans le Sambirano ... 51
Figure 8. Fermentation des fèves dans des bacs en cascade ... 61
Figure 9. Séchage des fèves sur aire cimentée ... 62
Figure 10. Comparaison des 18 échantillons de Madagascar par rapport aux variétés de cacao grâce au ratio théobromine/caféine ... 88
Figure 11. Couleur des fèves au cut test ... 89
Figure 12. ACP des 18 échantillons ... 103
Figure 13. Pourcentage des familles de composés volatils par variété ... 110
Figure 14. Dendogramme des 21 liqueurs de Criollo selon la CAH ... 124
Figure 15. Profil des classes des 21 liqueurs de Criollo selon la CAH ... 125
Figure 16. Caractérisation sensorielle des produits 3-ci-48, 5-ci-96 et 10-ci-96 ... 126
Figure 17. ACP des 21 liqueurs de Criollo ... 127
Figure 18. PLS-DA des 22 descripteurs sensoriels des 21 échantillons de Criollo ... 128
Figure 19. PLS-DA des 33 composés volatils des 21 échantillons de Criollo ... 133
Figure 20. Dendogramme des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire selon la CAH ... 134
Figure 21. Profil des classes des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire selon la CAH ... 135
Figure 22. ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Claire ... 136
Figure 23. PLS-DA des 22 descripteurs des 30 échantillons de Trinitario à casse Claire ... 139
Figure 24. PLS-DA des 33 composés volatils des 30 échantillons de Trinitario à casse Claire ... 141
Figure 25. Dendogramme des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée selon la CAH ... 142
Figure 26. Profil des classes des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée selon la CAH ... 143
Figure 27. Caractérisation sensorielle du produit 53-tf-48 ... 144
Figure 28. ACP des 30 liqueurs de Trinitario à casse Foncée ... 144
Figure 29. PLS-DA des 22 descripteurs des 30 échantillons de Trinitario à casse Foncée ... 147
Figure 30. PLS-DA des 33 composés volatils des 30 échantillons de Trinitario à casse Foncée ... 150
Figure 31. ACP des 16 échantillons de cacao non torréfié selon les familles de composés chimiques ... 170
Figure 32. ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié (colorés par temps de fermentation) selon les axes F1/F2 et F1/F3 ... 182
Figure 33. ACM des 16 échantillons de cacao non torréfié (colorés par variété) selon les axes F1/F2 et F1/F3 ... 183
Figure 34. Analyse par DGGE des échantillons de Criollo de Madagascar (10/2015) ... 196

Annexes

Annexe 1. Données sur les 99 échantillons de Madagascar

Code	Variété	Temps de fermentation (h)	Répétition	Récolte
214-ci-0	Criollo	0	R1	1
215-ci-48	Criollo	48	R1	1
216-ci-72	Criollo	72	R1	1
217-ci-96	Criollo	96	R1	1
218-ci-0	Criollo	0	R2	1
219-ci-48	Criollo	48	R2	1
220-ci-72	Criollo	72	R2	1
221-ci-96	Criollo	96	R2	1
222-ci-0	Criollo	0	R3	1
223-ci-48	Criollo	48	R3	1
224-ci-72	Criollo	72	R3	1
225-ci-96	Criollo	96	R3	1
226-tc-0	Trinitario à casse Claire	0	R1	1
227-tc-48	Trinitario à casse Claire	48	R1	1
228-tc-96	Trinitario à casse Claire	96	R1	1
229-tc-120	Trinitario à casse Claire	120	R1	1
230-tc-144	Trinitario à casse Claire	144	R1	1
231-tc-0	Trinitario à casse Claire	0	R2	1
232-tc-48	Trinitario à casse Claire	48	R2	1
233-tc-96	Trinitario à casse Claire	96	R2	1
234-tc-120	Trinitario à casse Claire	120	R2	1
235-tc-144	Trinitario à casse Claire	144	R2	1
236-tc-0	Trinitario à casse Claire	0	R3	1
237-tc-48	Trinitario à casse Claire	48	R3	1
238-tc-96	Trinitario à casse Claire	96	R3	1
239-tc-120	Trinitario à casse Claire	120	R3	1
240-tc-144	Trinitario à casse Claire	144	R3	1
241-tf-0	Trinitario à casse Foncée	0	R1	1
242-tf-48	Trinitario à casse Foncée	48	R1	1
243-tf-96	Trinitario à casse Foncée	96	R1	1
244-tf-120	Trinitario à casse Foncée	120	R1	1
245-tf-144	Trinitario à casse Foncée	144	R1	1
246-tf-0	Trinitario à casse Foncée	0	R2	1
247-tf-48	Trinitario à casse Foncée	48	R2	1
248-tf-96	Trinitario à casse Foncée	96	R2	1
249-tf-120	Trinitario à casse Foncée	120	R2	1
250-tf-144	Trinitario à casse Foncée	144	R2	1
251-tf-0	Trinitario à casse Foncée	0	R3	1
252-tf-48	Trinitario à casse Foncée	48	R3	1
253-tf-96	Trinitario à casse Foncée	96	R3	1
254-tf-120	Trinitario à casse Foncée	120	R3	1
255-tf-144	Trinitario à casse Foncée	144	R3	1

Annexe 1 (*suite*)

Code	Variété	Temps de fermentation (h)	Répétition	Récolte
1-ci-0	Criollo	0	R1	2
2-ci-24	Criollo	24	R1	2
3-ci-48	Criollo	48	R1	2
4-ci-72	Criollo	72	R1	2
5-ci-96	Criollo	96	R1	2
6-ci-0	Criollo	0	R2	2
7-ci-24	Criollo	24	R2	2
8-ci-48	Criollo	48	R2	2
9-ci-72	Criollo	72	R2	2
10-ci-96	Criollo	96	R2	2
11-ci-0	Criollo	0	R3	2
12-ci-24	Criollo	24	R3	2
13-ci-48	Criollo	48	R3	2
14-ci-72	Criollo	72	R3	2
15-ci-96	Criollo	96	R3	2
16-tc-0	Trinitario à casse Claire	0	R1	2
17-tc-24	Trinitario à casse Claire	24	R1	2
18-tc-48	Trinitario à casse Claire	48	R1	2
19-tc-72	Trinitario à casse Claire	72	R1	2
20-tc-96	Trinitario à casse Claire	96	R1	2
21-tc-120	Trinitario à casse Claire	120	R1	2
22-tc-144	Trinitario à casse Claire	144	R1	2
23-tc-0	Trinitario à casse Claire	0	R2	2
24-tc-24	Trinitario à casse Claire	24	R2	2
25-tc-48	Trinitario à casse Claire	48	R2	2
26-tc-72	Trinitario à casse Claire	72	R2	2
27-tc-96	Trinitario à casse Claire	96	R2	2
28-tc-120	Trinitario à casse Claire	120	R2	2
29-tc-144	Trinitario à casse Claire	144	R2	2
30-tc-0	Trinitario à casse Claire	0	R3	2
31-tc-24	Trinitario à casse Claire	24	R3	2
32-tc-48	Trinitario à casse Claire	48	R3	2
33-tc-72	Trinitario à casse Claire	72	R3	2
34-tc-96	Trinitario à casse Claire	96	R3	2
35-tc-120	Trinitario à casse Claire	120	R3	2
36-tc-144	Trinitario à casse Claire	144	R3	2
37-tf-0	Trinitario à casse Foncée	0	R1	2
38-tf-24	Trinitario à casse Foncée	24	R1	2
39-tf-48	Trinitario à casse Foncée	48	R1	2
40-tf-72	Trinitario à casse Foncée	72	R1	2
41-tf-96	Trinitario à casse Foncée	96	R1	2
42-tf-120	Trinitario à casse Foncée	120	R1	2
43-tf-144	Trinitario à casse Foncée	144	R1	2
44-tf-0	Trinitario à casse Foncée	0	R2	2
45-tf-24	Trinitario à casse Foncée	24	R2	2
46-tf-48	Trinitario à casse Foncée	48	R2	2
47-tf-72	Trinitario à casse Foncée	72	R2	2
48-tf-96	Trinitario à casse Foncée	96	R2	2
49-tf-120	Trinitario à casse Foncée	120	R2	2
50-tf-144	Trinitario à casse Foncée	144	R2	2
51-tf-0	Trinitario à casse Foncée	0	R3	2
52-tf-24	Trinitario à casse Foncée	24	R3	2
53-tf-48	Trinitario à casse Foncée	48	R3	2
54-tf-72	Trinitario à casse Foncée	72	R3	2
55-tf-96	Trinitario à casse Foncée	96	R3	2
56-tf-120	Trinitario à casse Foncée	120	R3	2
57-tf-144	Trinitario à casse Foncée	144	R3	2

Annexe 2. Séquences des souches de levure dont l'ADN a été amplifié par NL1

>A1_NL1 (27-tc-96)
GAACGGGGTGCCTGAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTGCTGCGCGAAGCTTTTGACGCCCTGCTG
ACCAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCGAG

>A2_NL1 (44-tf-0)
GCCTTAGTACGGCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTT
GTAATTTGTAGAAGGTAACTTTGGGGCTGGTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGA
GGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTTCTTTGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTT
TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTGGGG
GAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCAGGATAAATCTGCAGGAATGTAGCTT
GCCTCGGTAAGTGTTATATCCTGTAGAAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACTTTACGTC
AAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAT

>B1_NL1 (37-tf-0)
CCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAA
GGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCC
CCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCT
CTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
GTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
AGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAGCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCG
AGAATGTGGCGCGCACCTTCGGGCGCGCGTGTTATAGCTCGTGTTGACGCCTCCATCCCTTTTCGAG
GCCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTAATGGTTGCAAGCCGCCCGTCTTAAATC

>B2_NL1 (37-tf-0)
GCGGTAAAAGCTCAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAA

>D1_NL1 (37-tf-0)
GCCTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAA
GGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCC
CCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCT
CTGAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAG

>D2_NL1 (27-tc-96)
GCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGT
TGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAG
AGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGG
GGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCT
TGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTC
AAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAA

>E1_NL1 (20-tc-96)
TGCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAG
TTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAG
AGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGG
GGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCT
TGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTC
AAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTGAA

>E2_NL1 (46-tf-48)
CTTATAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAATCTGGTTTCT

>F1_NL1 (20-tc-96)
GCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTTCGGCACGAGTTGTAG
AGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTGCCTGAGAGGG
TGAGAGCCCCGTAGGGTGCTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCCCAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC
AAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTG
AAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGGGGTGCGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGG
GCGCCCTCTGGGCCAGCATCGGTTCCTGCTGCGGGAGAAGGGGCTCCGGAAAGTGGCTCATCGGA
GTGTTATAGCCGGGGCCAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCTCGGATGCTG
GCATAACGGCGCAATACCGCCCGTCTTGAA

>F2_NL1 (46-tf-48)
GTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAA
AGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCG
CATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGT
AAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCT
GGCAATAA

>G_NL1 (25-tc-48)
CCTGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTTTCTTC

>G1_NL1 (20-tc-96)
GCCCTAGTATGGCGAATGAACAGGCAAAAGCTCAGATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATCTGGAG
ACCTGGATTTGGCACGCTGACCAAGTCTTCTGGAACGGAGCGCCATGGAGGGTGACAGCCCCGTAG
CAGCAGCCACTGTAAATCCGGGTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
ATGCTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGAT
GAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAATGGAAGGCAATGAGGTG
CGATTGAACCGGACGTTTGCGGGCAGGACAAAAGCGCAGGCCGCCTCGGCATTGCCTGCGTGCAT
ACTGCCTCGCGGACTACCAGTTCTAACAACGCCTTATTGCACCCGTCTTGAACCCGGAC

>H_NL1 (25-tc-48)
CCTTATAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAATCTGGTTTCTT

>H1_NL1 (20-tc-96)
AGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAAGGTTT
CGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGT
ATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAA
G

>I1_NL1 (27-tc-96)
TTACCTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTG
TAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAG
GGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGG
GAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTT
GCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCA
AGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAACCCC

>I2_NL1 (53-tf-48)
ATTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGG

>I3_NL1 (1-ci-0)
TTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAG

>J_NL1 (18-tc-48)

ATGCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGA
GTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATA
GAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTG
TTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAG
GGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGC
TTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGT
CAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTGAA

>K_NL1 (25-tc-48)
CCTTGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAATCTGGTTTCTT

>K2_NL1 (53-tf-48)
CCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTT
GTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGA
GGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTT
TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGG
GAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTT
GCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCA
AGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTGAA

>L1_NL1 (27-tc-96)
ACCTTCGGAGTGTTATAGCCGGGGCCAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCT
CGGATGCTGGCATAACGGCGCAATACCGCCCGTCTTGA

>M_NL1 (18-tc-48)
CGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGA
AGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCC
CGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGC
TCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
AGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATT
TCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGT
ATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGC
ATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAACAACGGA

>M1_NL1 (37-tf-0)
CCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAA
GGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCC
CCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCT
CTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
GTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
AGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAGCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCG
AGAATGTGGCGCGCACCTTCGGGCGCGCGTGTTATAGCTCGTGTTGACGCCTCCATCCCTTTTCGAG
GCCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTAATGGTTGCAAGCCGCCCGTCTTGACAC

>M2_NL1 (53-tf-48)
GCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGT
TGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAG
AGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGG
GGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCT
TGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTC
AAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTAA

>N_NL1 (18-tc-48)
CCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTTCGGCACGAGTTGTAGA
GTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTGCCTGAGAGGGT
GAGAGCCCCGTACGGTGCTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAAT
GCAGCTCCGAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACA
AGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGA
AAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGGGGTGCGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGGG
CGCCCTCTGGGCCAGCATCGGTTCCTGCTGCGGGAGAAGGGGCTCCGGAAAGTGGCTCTTCGGAGT
GTTATAGCCGGGGCCAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCTCGGATGCTGGC
ATAACGGCGCAATACCGCCCGTCT

>N1_NL1 (46-tf-48)
ATGCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGA
GTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATA
GAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTG
TTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAG
GGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGC
TTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGT
CAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTAA

>O_NL1 (30-tc-0)
CCTCGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTT
GTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAG
GGTGAGAATCCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTCTCTTCTTGAGTTGTG
CACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATAATGGCAGTTGAATGTGGCTTCA
CTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTA
GGATGCTGGCGTAATGATCTAATGCCGCCCGTCTGAA

>O1_NL1 (20-tc-96)
GCCTCGTACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAAGCCCGCGGGCGTTGTAATTTGCAG
GCGGATGTTTTGGGGCGGGCGCTGTCTACGTTCCTTGGAACAGGACGCCGCAGAGGGTGAGAGCCC
CGTGCGATGGCGCCTCTAACCGCGTAAAACTCCGCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTC
CAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAG
TGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GGGTATGCGATTAGCGGCCAGCAGGAGGTGCCTTCTCGTGAAAAGGCCGTGCACCGTCTTCGGACA
CCGTGCGCGGAGATGGCGAGGGGGCGCCTGAGGTCTGCGAACTCGAGGTTGCTGGCGTAATGATT
GCATACCACCCGTCTTAACTG

>P1_NL1 (20-tc-96)
GCCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTTCGGCACGAGTTGTA
GAGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTGCCTGAGAGG
GTGAGAGCCCCGTAGGGTGCTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGA
ATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAA
CAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTT
GAAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGGGGTGCGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTG
GGCGCCCTCTGGGCCAGCATCGGTTCCTGCTGCGGGAGAAGGGGCTCCGGAAAGTGGCTCTTCGGA
GTGTTATAGCCGGGGCCAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCTCGGATGCTG
GCATAACGGCGCAATACCGCCCGTTTAA

>Q_NL1 (25-tc-48)
CCTTATAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTTTCTTC

>Q1_NL1 (27-tc-96)
ATACCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGA
GTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAG

AGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTT
TGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCT
TGGGCCTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGTAGGATAAATCATTAAGAATGT
AGCTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGGGATTGAGGACTGCGCTTCGGC
AAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTTTGA

>R_NL1 (25-tc-48)
CTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTG
A

>R1_NL1 (27-tc-96)
ACCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGT
TGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAG
GGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
GGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGC
GAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTG
GGCCTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGTAGGATAAATCATTAAGAATGTAG
CTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGGGATTGAGGACTGCGCTTCGGCAA
GGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTGAAA

>S_NL1 (32-tc-48)
GCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGT
TGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAG
AGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGG
GGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCT
TGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTC
AAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAA

>S1_NL1 (20-tc-96)
ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA
GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAATGGAAGGCAATGAGGTGCGATTGAACCGGACGTTTG
CGGGCAGGACAAAAGCGCAGGCCGCCTCGGCATTGCCTGCGTGCATACTGCCTCGCGGACTACCA
GTTCTAACAACGCCTTATTGCACCCGTCTTGA

>T_NL1 (32-tc-48)
CCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTT
GTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGA
GGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTT
TGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGG
GAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTT
GCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCA
AGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAC

>T1_NL1 (20-tc-96)
GCCCTAGTATGGCGAATGAACAGGCAAAAGCTCAGATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATCTGGAG
ACCTGGATTTGGCACGCTGACCAAGTCTTCTGGAACGGAGCGCCATGGAGGGTGACAGCCCCGTAG
CAGCAGCCACTGTAAATCCGGGTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
ATGCTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGAT
GAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAATGGAAGGCAATGAGGTG
CGATTGAACCGGACGTTTGCGGGCAGGACAAAAGCGCAGGCCGCCTCGGCATTGCCTGCGTGCAT
ACTGCCTCGCGGACTACCAGTTCTAACAACGCCTTATTGCACCCGTCTTGAACACGGA

>U_NL1 (44-tf-0)
CCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAA
GGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCC
CCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCT

>U1_NL1 (27-tc-96)
GCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGT
TGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAG
AGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGG
GGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCT
TGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTC
AAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAACCA

>V1_NL1 (27-tc-96)
ATGCCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGA
GTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATA
GAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTG
TTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAG
GGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGC
TTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGT
CAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTG

>W_NL1 (20-tc-96)
CCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTTCGGCACGAGTTGTAG
AGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTGCCTGAGAGGG
TGAGAGCCCCGTAGGGTGCTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC
AAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTG
AAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGGGGTGCGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGG
GCGCCCTCTGGGCCAGCATCGGTTCCTGCTGCGGGAGAAGGGGCTCCGGAAAGTGGCTCTTCGGAG
TGTTATAGCCGGGGCCAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCTCGGATGCTGG
CATAACGGCGCAATACCGCCCGTCTGAA

>W1_NL1 (32-tc-48)
CTTGTAGCGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAATCTGGTTTCTT

>X_NL1 (20-tc-96)
CCTAGTATGGCGAATGAACAGGCAAAAGCTCAGATTTGAAACCCTCGGGATTGTAATCTGGAGACC
TGGATTTGGCACGCTGACCAAGTCTTCTGGAACGGAGCGCCATGGAGGGTGACAGCCCCGTAGCA
GCAGCCACTGTAAATCCGGGTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAT
GCTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGA
AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAATGGAAGGCAATGAGGTGCG
ATTGAACCGGACGTTTGCGGGCAGGACAAAAGCGCAGGCCGCCTCGGCATTGCCTGCGTGCATACT
GCCTCGCGGACTACCAGTTCTAACAACGCCTTATTGCACCCGTCTTGATAC

>X1_NL1 (32-tc-48)
TGCTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGT
TGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAG
AGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGT
TTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGG
GGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCT
TGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTC
AAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAACAC

>Y_NL1 (27-tc-96)
CCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGTTTCGGCACGAGTTGTAG
AGTGTAGGCGGGAGTCTCTGTGGAGCGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGTGCCTGAGAGGG
TGAGAGCCCCGTAGGGTGCTGCGCGAAGCTTTTGAGGCCCTGCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC
AAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTG
AAAGGGAAGGGTATTGGGCTCGACATGGGGGGTGCGCACCGCTGTCTCTTGTAGGCGGCGCTCTGG
GCGCCCTCTGGGCCAGCATCGGTTCCTGCTGCGGGAGAAGGGGCTCCGGAAAGTGGCTCTTCGGAG
TGTTATAGCCGGGGCCAGATGCCGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCTTCTGTCTCGGATGCTGG
CATAACGGCGCAATACCGCCCGTCTTAAACC

>Y1_NL1 (44-tf-0)
TGCCAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAA
GGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCC
CCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCT
CTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
GTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
AGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAGCGTCAAATAGGGGGGAGGAACAAGAACT

>Z_NL1 (27-tc-96)
CTTAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGA

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

POLE RECHERCHE
Ecoles Doctorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(~~e~~) CHEN-YEN-SU Alexandre,
en ma qualité de doctorant(~~e~~) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(~~e~~) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Sainte-Clotilde, le (date) 15/01/2020

Signature : CYSA

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.
Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

Résumé :
Le cacao est la 3ème denrée la plus commercialisée dans le monde et 23 pays sont classés selon l'ICCO comme producteurs de cacao fin, dont Madagascar. Le cacao de Madagascar est classé cacao fin à 100 % selon l'ICCO. Il est un des plus réputés au monde, même s'il ne représente que 0,2 % de la production mondiale.
Peu d'études existent concernant la caractérisation du cacao malgache et sa fermentation. La fermentation est une étape post-récolte pour l'obtention des caractéristiques aromatiques et sensorielles d'un cacao de qualité. Ce travail a permis de déterminer les critères de qualité et de suivre les évolutions des critères organoleptiques, de la composition volatile et les micro-organismes au cours de la fermentation.
Le cacao produit à Madagascar appartient principalement aux variétés Criollo et Trinitario. Le suivi de la fermentation montre qu'au niveau sensoriel, les descripteurs « végétal, terreux, astringent, amer » des fèves de cacao non ou peu fermentées (24-48 h) s'estompent pour laisser place aux descripteurs cacao, chocolat, fruité, acide pour des fèves de cacao en fin de fermentation (96 h-144 h). De même, les teneurs en composés volatils liés aux descripteurs sensoriels recherchés tels que l'acétate de 3-méthylbutyle, l'acétate d'éthyle, le benzaldéhyde, la tétraméthylpyrazine, l'acide acétique augmentent au cours de la fermentation.
L'étude de la flore microbienne a permis d'identifier l'origine de la production de certains composés volatils. Notamment, la levure *Hanseniaspora opuntiae* présente un intérêt particulier car elle est associée à la production de 2-phényléthanol. L'étude des communautés levuriennes par voie moléculaire a confirmé la présence des levures isolées et a mis en évidence d'autres souches notamment du genre *Pichia* qui sont aussi productrices de molécules volatiles telles que l'acétate de 2-phényléthyle et l'acétate d'éthyle.

Mots-clés : Cacao fins ; Analyse sensorielle ; Arômes ; Levures ; Qualité ; Madagascar.

Abstract :
Cocoa is the third most traded commodity in the world and 23 countries are classified as fine cocoa producers according to the ICCO, including Madagascar. The Malagasy cocoa production is classified as 100 % fine cocoa by the ICCO. It is one of the most famous in the world, even though it only represents about 0.2 % of the world production.
Few studies exist concerning the characterization of Malagasy cocoa and its fermentation. Fermentation is a crucial post-harvest treatment step for obtaining the specific aromatic and sensory quality of cocoa. In this work, the quality criteria could be determined and the changes in organoleptic criteria, volatile composition and microorganisms during fermentation were monitored.
Most of the cocoa produced in Madagascar belongs to the Criollo and Trinitario varieties. The monitoring of fermentation showed that the sensory negative descriptors « vegetal, earthy, astringent, bitter » of incompletely fermented cocoa beans (24-48 h) were progressively replaced by positive descriptors "cocoa, chocolate, fruity, acid" as measured in cocoa beans at the end of fermentation (96 h-144 h). Likewise, the contents of volatile compounds such as 3-methylbutyl acetate, ethyl acetate, benzaldehyde, tetramethylpyrazine, acetic acid increase during fermentation.
The study of microbial flora has made it possible to identify the origin of the production of certain volatile compounds. The *Hanseniaspora opuntiae* yeast is of particular interest because it is associated with the production of 2-phenylethanol. The study of the yeast communities at the molecular level confirmed the presence of the yeasts identified and highlighted other strains in particular of the *Pichia* gender which also are potential producers of volatile compounds such as 2-phenylethyl acetate and ethyl acetate.

Key words : Fine cocoa ; Sensory analysis ; Flavour ; Yeast ; Quality ; Madagascar.