ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

DOCUMENTATION

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire
option Sciences Alimentaires

20 AOUT 1991

ETUDE DE LA MATIERE COLORANTE DEVELOPPEE AU COURS DU PROCEDE D'ALCALINISATION DU CACAO

par

JACQUELINE BIANCHI

Soutenue le 17 décembre 1990 devant le jury composé de :

MM. J.	CROUZET	Président
E.	CROS	
J.L.	CUQ	
M.	MOUTOUNET	
J.	PONTILLON	

CIDARC I.S.T. BIBLIOTHEQUE

CP950541 TH765

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire
option Sciences Alimentaires

ETUDE DE LA MATIERE COLORANTE DEVELOPPEE AU COURS DU PROCEDE D'ALCALINISATION DU CACAO

par

JACQUELINE BIANCHI

Soutenue le 17 décembre 1990 devant le jury composé de :

MM. J.	CROUZET	Président
E.	CROS	
J.L.	CUQ	
M.	MOUTOUNET	
J.	PONTILLON	

TH00765

CIDARC I.S.T. BIBLIOTHEQUE

TH00765

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire
option Sciences Alimentaires

ETUDE DE LA MATIERE COLORANTE DEVELOPPEE AU COURS DU PROCEDE D'ALCALINISATION DU CACAO

par

JACQUELINE BIANCHI

Soutenue le 17 décembre 1990 devant le jury composé de :

MM.	J.	CROUZET	Président
	E.	CROS	
	J.L.	CUQ	
	M.	MOUTOUNET	
	J.	PONTILLON	

Les travaux qui ont conduit à la réalisation de cette thèse ont été effectués à l'Institut de Recherche du Café et du Cacao au sein du service de Chimie-Technologie dirigé par Mr Jean-Claude VINCENT que je remercie vivement.

La Société BARRY a été l'instigatrice de ces recherches et en assuré le financement. J'exprime toute ma reconnaissance à Mr Jean PONTILLON, Directeur du Centre de Recherche et de Contrôle de cette entreprise, pour m'avoir accueillie à plusieurs reprises avec bienveillance et m'avoir permis d'aborder l'aspect industriel du problème.

Mr Jean CROUZET, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, s'est toujours montré disponible pour conseiller et orienter ce travail. Je l'en remercie sincèrement.

Mr Jean-Louis CUQ, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc et Mr Michel MOUTOUNET, Directeur de Recherche à l'INRA, malgré leur emploi du temps chargé, m'ont accordé leur attention et ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens à leur témoigner ma gratitude.

Les conseils et l'aide de Mr Emile CROS ont beaucoup contribué au bon déroulement de cette thèse.
Emile, pour m'avoir fait confiance, pour ta disponibilité, pour ta bonne humeur et ta sympathie, merci infiniment.

Je remercie vivement Nadine, Marie-Claude et Jacques pour leur collaboration efficace.

Enfin, à toute la "joyeuse équipe" de l'IRCC grâce à qui ces quelques années sont passées très (trop) vite et agréablement, j'adresse mes remerciements et ma sympathie.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Employées pour la fabrication de tous les produits chocolatés à l'exception du chocolat lui même, les poudres de cacao constituent une matière première indispensable à l'industrie alimentaire. Elles sont recherchées pour leurs caractéristiques aromatiques mais également pour leur pouvoir colorant.

L'influence de la couleur d'un produit alimentaire sur l'impression gustative provoquée n'est plus à démontrer. Selon l'idée générale, un produit cacaoté doit présenter une teinte "chocolat". Plus la teinte sera intense plus la saveur paraîtra "corsée". Les poudres de cacao partiellement dégraissées (donc sous leur forme d'utilisation) sont brun clair et ne correspondent pas tout à fait à cette attente. Cependant, depuis le début du 19ème siècle existe un procédé industriel permettant de conférer aux poudres une teinte plus foncée et une nuance brun rouge plus ou moins marquée. Ce procédé, appelé "dutch process" car originaire des PAYS-BAS, correspond à une étape d'alcalinisation : le cacao est chauffé en présence d'une solution alcaline dont la nature et la quantité maximale sont fixées par une législation. La couleur obtenue après ce traitement varie en fonction des conditions utilisées (durée, température, nature et concentration de l'agent alcalin, etc...). L'alcalinisation du cacao est un procédé très apprécié des industriels puisqu'ils disposent ainsi d'une palette de couleurs adaptables aux différents produits.

Ce procédé reste totalement empirique. Quelques ouvrages traitent de l'aspect technologique du problème mais ces études sont incomplètes ou contradictoires. Quelques brevets présentent différentes variantes du procédé. Par contre, aucune étude n'a été publiée sur l'identification des mécanismes chimiques impliqués.

Pour satisfaire les demandes des utilisateurs, les industriels sont toujours à la recherche de nouvelles nuances et surtout de teintes plus foncées (ceci pour des raisons économiques évidentes) ce qui les oblige à modifier leur technique. Le but de ce travail a été de procéder à une étude des mécanismes impliqués dans la réaction d'alcalinisation afin d'acquérir une meilleure maîtrise du procédé et ainsi de pouvoir s'adapter plus rapidement aux différentes demandes.

La première partie de ce travail correspond à l'étude de l'influence des conditions d'alcalinisation sur la couleur finale des poudres de cacao ce qui permettra de préciser les paramètres de traitement déterminants pour l'intensité et la nuance de la couleur. Dans le cadre de cette étude, nous avons également cherché à compléter ou à remplacer le procédé classique d'alcalinisation par un traitement enzymatique, possibilité sous-entendue par certains auteurs sans jamais avoir été démontrée.

L'étude chimique de la coloration développée à l'alcalinisation a été abordée dans la deuxième partie, les objectifs étant l'identification des précurseurs de cette coloration et la caractérisation de cette dernière.

GENERALITES

GENERALITES

1. Quelques données économiques

Longtemps considéré comme un produit exotique de luxe, le cacao est aujourd'hui l'une des grandes matières premières du négoce international.

L'économie des pays producteurs, pays en voie de développement, repose en grande partie sur les revenus du commerce du cacao ; pour les pays industrialisés, principaux consommateurs, la chocolaterie représente l'un des premiers secteurs de l'agro-alimentaire par l'importance du chiffre d'affaires réalisé (11,9 milliards de francs pour la chocolaterie française en 1988 selon les statistiques de l'Union des Confiseurs et Chocolatiers).

La production mondiale de fèves de cacao a progressé de façon régulière, à l'exception de quelques brusques diminutions liées aux fluctuations des cours : elle a doublé au cours des 25 dernières années, pour atteindre en 1988-1989, 2,4 millions de tonnes (Bulletin de statistiques de l'Organisation Internationale du Cacao) .

Les principaux pays producteurs sont la COTE D'IVOIRE, le BRESIL et le GHANA. Ces trois pays assurent 60 % de la production mondiale. Il faut souligner la percée du continent asiatique avec la MALAISIE qui a multiplié par 5 sa production depuis 1980 et se place ainsi au quatrième rang des pays producteurs.

La modification des habitudes alimentaires et la diversification des produits de chocolaterie sont responsables de l'augmentation continuelle de la consommation des produits dérivés du cacao. Ainsi depuis 1930, la masse de fèves broyées annuellement a quadruplé (WOOD and LASS 1987). En 1987-1988, la consommation mondiale de cacao a été de 1,9 millions de tonnes. La FRANCE en a consommé 126 000 tonnes soit 2,2 kg/habitant (Bulletin de statistiques de l'OIC).

En dépit de la progression constante de la consommation, en 1989 la production a été excédentaire pour la 6ème année consécutive ce qui a entraîné un fléchissement des cours, néfaste pour l'économie des pays producteurs. Jusqu'à présent, les différentes tentatives de rationalisation du marché menées au cours des années passées (création d'organismes régulateurs, accords internationaux) ont échouées.

Le développement industriel du cacao n'a eu lieu qu'à partir de l'implantation d'une culture cacaoyère sur le territoire africain, c'est à dire au début du 19ème siècle. Depuis, les industries de transformation du cacao ont connu un essor exemplaire. Elles ont longtemps été localisées uniquement dans les pays industrialisés mais à partir des années 70, les pays producteurs ont cherché à améliorer leur revenu en assurant eux-même la transformation en produits demi-finis (beurre, pâte et poudre) d'une partie de leur récolte (Mensuel Economie - Géographie, juin 1989).

Les PAYS BAS, où se développèrent les premières fabrications industrielles de cacao en poudre, restent le premier exportateur mondial de ce produit demi-fini. En 1988, La FRANCE, pour sa part, en a produit 15 551 tonnes dont 5 391 ont été exportées (Statistiques de l'Union des Confiseurs et Chocolatiers).

2. Du cacaoyer au cacao marchand

L'industrie du cacao et les industries alimentaires dérivées reposent sur la culture d'une espèce botanique originaire d'Amérique centrale mais actuellement présente dans de nombreux pays tropicaux : le cacaoyer (Theobroma cacao, famille des Sterculiacées).

Cet arbre donne de gros fruits ovoides appelés "cabosses" et renfermant à maturité une quarantaine de graines logées dans une pulpe mucilagineuse.

Ces fèves fraiches récupérées après ouverture manuelle ou mécanique des cabosses doivent subir successivement les opérations de fermentation et de séchage pour aboutir au cacao marchand. Ces deux étapes ont lieu dans les pays de production et sont essentielles au bon développement des qualités organoleptiques du cacao.

2.1 La fermentation

La fermentation proprement dite ne concerne que le mucilage encore présent autour des graines mais elle aura des conséquences importantes sur la biochimie de la fève.

Des flores de levures et de bactéries provenant de contaminations externes se succèdent au fur et à mesure des modifications de pH, de température, d'aération et de composition que subit le milieu (JONES et al. 1984) et sont responsables des différentes étapes de fermentation : alcoolique, lactique et acétique.

L'élévation de température et surtout la diffusion à l'intérieur des cotylédons de l'éthanol et de l'acide acétique produits au cours de ces différents stades provoquent la mort de l'embryon (QUESNEL 1965 et MORETON 1985) et la lyse des parois cellulaires. Le contenu cellulaire peut alors diffuser librement. La mise en contact entre enzymes et substrats sera à l'origine de nombreuses modifications biochimiques.

Evolution de la composition chimique des fèves au cours de la fermentation

La composition des fèves de cacao "fermenté" varie dans certaines limites en fonction de la variété de cacao, de leur origine géographique, de la date de la récolte et des conditions de fermentation et de séchage mais les résultats d'études analytiques réalisées par différents auteurs permettent d'avoir un aperçu de la composition qualitative et quantitative moyenne.

Fèves "fermentées" (en % par rapport au poids sec) :

Cendres	: 2,6 à 4,2	(PEARSON cité par MINIFIE 1989)
Matière grasse	: 48 à 57	(PEARSON cité par MINIFIE 1989)
Bases puriques		
Théobromine	: 1,3 à 1,5	(HAMANN et al.1984)
Caféine	: 0,1 à 0,7	(PEARSON cité par MINIFIE 1989)
Protéines	: 9	(BAREL 1983)
Acides aminés libres	: 0,8	(MERMET 1989)
Sucres simples		
Glucose	: 0,1	(MERMET 1989)

Fructose	: 0,4 à 0,6	
Amidon	: 4,5 à 7	(SCHMIEDER et al.1980)
Pectines	: 4,1	(KNAPP cité par MINIFIE 1989)
Cellulose	: 9	(FINCKE 1965)
Acides organiques		
Ac. citrique	:) entre 0,05 et 0,5 pour chaque acide	
Ac. acétique	:) mais assez variable selon les	
Ac. lactique	:) conditions de fermentation et de	
Ac. oxalique	:) séchage.	
Ac. malique	:)	(NUYKEN-HAMELMANN et al. 1987)
Composés phénoliques	: 10	(GEERTS et KNOL, 1984)

Cette composition finale, différente de la composition des fèves non fermentées, est le résultat d'une série de phénomènes enzymatiques, chimiques et physiques :

- Pendant la fermentation, la teneur en protéines extractibles diminue (KEENEY 1972, ZAK 1973, BAREL et al. 1983) en raison d'une part, de l'activité protéasique et d'autre part, d'un tannage rendu possible par la mise en contact protéines/polyphénols.

- La protéolyse a pour conséquence une augmentation de la quantité de peptides et d'acides aminés libres (de 0,2 à 0,7 % selon MERMET 1989). La leucine, la phénylalanine, la valine et la tyrosine sont particulièrement concernées par cette augmentation (SEIKI 1973).

- L'hydrolyse totale du saccharose, sucre majeur de la fève fraîche, conduit à une élévation de la teneur en sucres réducteurs : glucose et fructose (REINECCIUS et al. 1972, MERMET 1989).

- Sucres réducteurs, peptides et acides aminés sont des précurseurs essentiels de certains composés de l'arôme chocolat (dont la formation aura lieu principalement au cours de la torréfaction), cependant certains composés de l'arôme tels que des aldéhydes et des alkylpyrazines sont formés en quantité non négligeable au cours de la fermentation (MERMET 1989).

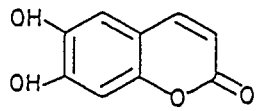
- L'augmentation de la perméabilité cellulaire entraîne la diffusion de certains composés :
  . perte d'une partie des bases puriques contribuant ainsi à une diminution de l'amertume (OBIAKOR et al. 1977)
  . migration d'une partie des acides organiques présents dans le mucilage vers les cotylédons (WEISSBERGER et al. 1971).

- Evolution des composés polyphénoliques :

Dans les fèves fraîches, les composés phénoliques sont localisés dans des cellules à pigments contenant également les bases puriques. L'identification de ces composés, 8 à 18 % des fèves non fermentées, a fait l'objet de nombreux travaux : FORSYTH (1952, 1955), GRIFFITHS (1958, 1960), QUESNEL et ROBERTS (1963), QUESNEL (1968), THOMPSON et al. (1972), JALAL et COLLIN (1977).

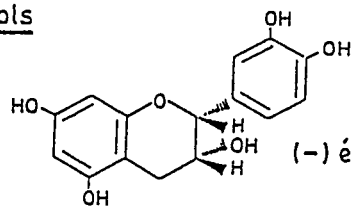
Plus récemment, les travaux de VILLENEUVE (1982, 1989), MERMET (1985), PORTER (1986) et BASTIDE (1987) permettent de donner une composition phénolique plus précise du cacao non fermenté (figure 1) avec par ordre d'importance :

Coumarine



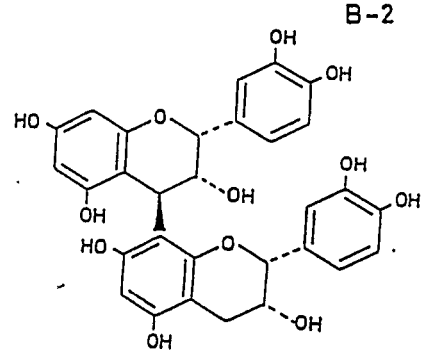
Aesculétine

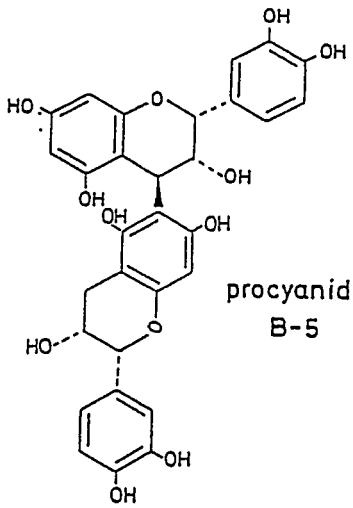
Flavanols



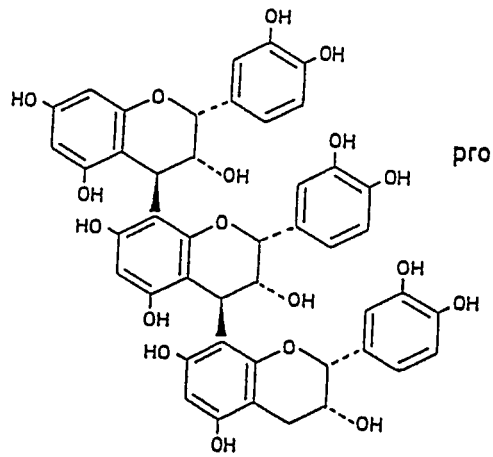
(-) épicatechol

procyanidol B-2



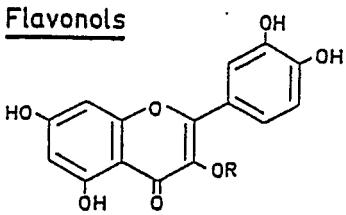


procyanidol B-5



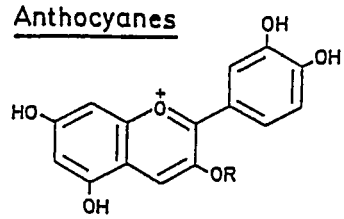
procyanidol C-1

Flavonols



R = H : quercétol
R = glucose : 3.0 glucosyl quercétol
R = 3.0 galactosyl quercétol

Anthocyanes



R = H : cyanidol
R = α-L arabinose : 3 α-L arabinosyl cyanidol
R = β-D galactose : 3β-D galactosyl cyanidol

Figure 1 : Structure des composés phénoliques identifiés dans les fèves de cacao (BASTIDE 1987)

- les flavanols : (composés incolores)
  . (-) épicatéchol
    il s'agit du constituant polyphénolique majeur et de l'unité de base des procyanidols oligomères (longtemps désignés par le terme de leucocyanidols L)
  . procyanidols dimères B2 et B5
  . procyanidol trimère C1
  . procyanidol tétramère (PORTER, 1986)

- les anthocyanidols : (responsables de la couleur violette des fèves)
  . 3β-D galactosyl cyanidol
  . 3α-L arabinosyl cyanidol (FORSYTH et QUESNEL, 1957(a))
  . un troisième anthocyanidol non identifié (BASTIDE, 1987)

- les flavonols : (pigments jaunes)
  . 3.0 glucosyl quercétol (ou isoquercétine)
  . 3.0 galactosyl quercétol (ou hyperoside)
  . un autre dérivé du quercétol mais non identifié (BASTIDE 1987)

- les dérivés hydroxycinnamiques
  Ce sont les composés les moins connus : il s'agit de dérivés d'acides caféique, para coumarique et férulique (BASTIDE 1987)

- les coumarines
  . aesculétine (évoqué par QUESNEL (1968) mais identifiée par BASTIDE (1987)

Certains composés font l'objet d'une polémique : l'acide chlorogénique et l'acide para coumaroyl 5.0 quinique ont été identifiés par JALAL et COLLIN (1977) mais n'ont été retrouvés ni par VILLENEUVE (1982) ni par BASTIDE (1987).

Il faut également signaler des différences de composition selon les variétés :

- Les anthocyanidols sont absents des fèves de la variété "Criollo" dite "casse claire".

- Suite aux travaux de THOMPSON et al.(1972), il existerait selon VILLENEUVE (1982), des variétés contenant, outre les flavanols indiqués ci-dessus, du (+) catéchol. Cette hypothèse a été infirmée par MERMET (1986).

L'évolution des composés phénoliques au cours de la fermentation a été particulièrement étudiée par VILLENEUVE (1982).

La teneur globale en phénols et en tanins totaux diminue de 70 %

Les glycosides d'anthocyanidols subiraient une hydrolyse enzymatique (FORSYTH et QUESNEL 1957, b).

Les dérivés hydroxycinnamiques sont particulièrement stables

Après 8 jours de fermentation, la teneur en flavanols diminue de 90 % ce qui entraîne une diminution notable de l'astringence du cacao (due aux propriétés tannantes des flavanols oligomères). La quantité d'épicatéchol, composé principal, passe ainsi de 13 à 2 % du poids de cacao délipidé.

Selon VILLENEUVE et al. (1989), cette "perte" en flavanols est due principalement à une polymérisation oxydative (non enzymatique) de l'épicatéchol en dimères puis disparition des dimères par tannage et par polymérisation ultérieure.

Des phénomènes d'oxydation enzymatique des phénols sont également souvent mentionnés dans la littérature. La fève de cacao non fermentée présente effectivement une activité polyphénoloxydasique et peroxydasique mais VILLENEUVE et al. (1985) ont montré qu'après deux jours de fermentation ces activités sont très faibles or ce n'est qu'après cette période que la perte en flavanols est observée.

2.2 Le séchage

Au cours de cette phase, l'humidité passe de 60 % à 6-7 %. Certains processus enzymatiques pourraient également se poursuivre à condition que la température ne soit pas trop élevée.

En fonction du type de séchage utilisé (solaire ou artificiel) une partie des acides volatiles apparus au cours de la fermentation est plus ou moins éliminée.

3. Utilisation du cacao marchand

Le cacao est principalement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire. Ses usages en pharmacie et en cosmétique (sous forme de beurre) ne représentent qu'une faible part du marché. Des sous produits de traitement du cacao peuvent également être utilisés pour l'alimentation du bétail, la fabrique d'engrais ou la savonnerie.

Dans l'industrie alimentaire, deux types de produits peuvent être préparés à partir des fèves de cacao marchand :

- les produits demi-finis :
  - . pâte de cacao (ou "masse" ou "liqueur")
    résultant du simple broyage de la fève torréfiée et décortiquée
  - . beurre de cacao
    matière grasse obtenue par pression de la pâte.
  - . tourteau
    correspond à de la pâte partiellement dégraissée par pression ; pulvérisé, il donne la poudre de cacao.

- les produits finis :
  - . le chocolat sous toutes ces formes.

Schéma de traitement du cacao marchand (figure 2)

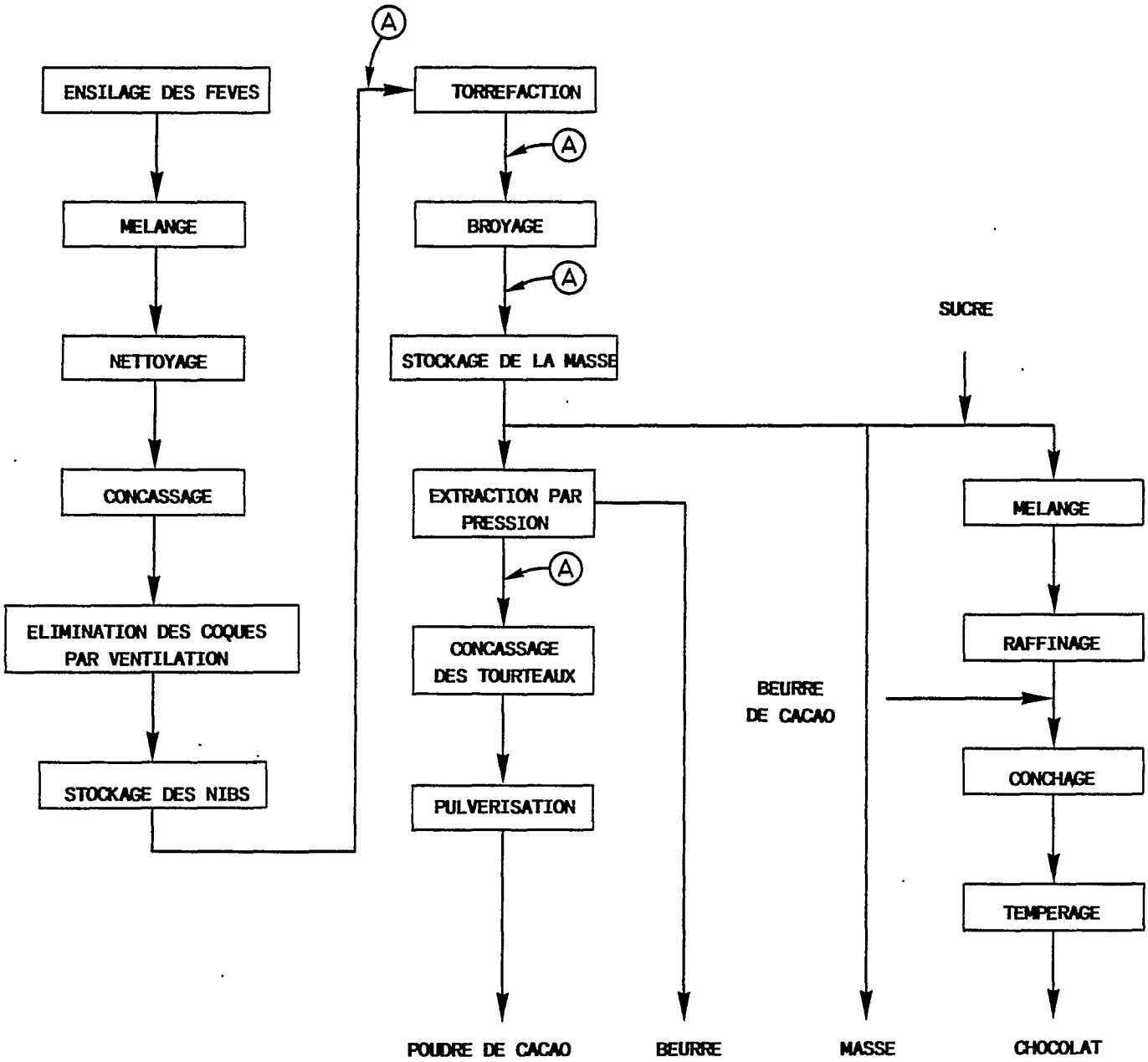
Les poudres de cacao

Le cacao en poudre est employé pour la fabrication de tous les produits chocolatés à l'exception du chocolat lui-même.

La plupart des poudres fabriquées font intervenir le procédé d'alcalinisation. Il peut être appliqué avant ou après torréfaction sur nibs sur masse ou sur tourteau. Les poudres non traitées sont appelées poudres naturelles.

On distingue les poudres à haute teneur en matière grasse (20 à 25 %) qui sont surtout utilisées pour la préparation des boissons (dans quelques pays, elles interviennent aussi dans la fabrication de cigarettes comme agent de sapidité) et les poudres à basse teneur en matière grasse (10 à 13 %) qui entrent dans la composition des produits chocolatés faisant intervenir d'autres sources de matière grasse (WOOD and LASS, 1987).

La poudre de cacao est utilisée pour son pouvoir aromatique mais aussi pour son pouvoir colorant. C'est la variation des paramètres d'alcalinisation qui permet d'obtenir toute une gamme de teintes allant du brun rouge clair au brun foncé parmi lesquelles les utilisateurs choisiront celles qui convient le mieux à leurs produits :
- crèmes glacées
- crèmes
- boissons
- desserts lactés
- biscuits, gâteaux
- enrobage pour glaces ou gâteaux
- fourrage
- petits déjeuners instantannés, etc...



Ⓐ : Etape d'alcalinisation/séchage (intervient uniquement lors de la fabrication des poudres)

Figure 2 : Les principales étapes technologiques de la fabrication des produits de chocolaterie

4. Le procédé d'alcalinisation

4.1 Origine et définition

En 1828, le chocolatier hollandais C.J. VAN HOUTEN, premier détenteur d'un brevet de fabrication du "chocolat en poudre", souhaitant améliorer la digestibilité et la dispersibilité de ses produits, traita son cacao par un agent alcalin. Selon la légende, il en eut l'idée en observant un vieux guérisseur mexicain qui donnait à ses patients convalescents une boisson chocolatée additionnée de cendres de bois tamisées, cet apport naturel de potasse rendant la boisson plus digeste. VAN HOUTEN découvrit ainsi les effets bénéfiques de son traitement sur la couleur et la flaveur (COOK et MEURSING 1982).

Depuis, l'alcalinisation du cacao est devenue un procédé industriel, modifié et adapté par les différents utilisateurs et intervenant pour la fabrication d'une grande majorité des poudres mises sur le marché.

Cette méthode consiste à traiter le cacao sous forme de nibs, de masse ou de tourteau par une solution ou une suspension d'un ou de plusieurs agents alcalins, à température plus ou moins élevée.

4.2 Conséquences du procédé

La modification de couleur du cacao entrainée par ce traitement est le principal effet recherché. Alors que les poudres naturelles sont marron clair, la couleur des poudres alcalinisées, bien que variant beaucoup en fonction des conditions de traitement, est toujours plus foncée et d'une nuance brun rouge. Les poudres de cacao étant utilisées aussi bien pour leur pouvoir aromatisant que pour leur pouvoir colorant, l'avantage d'un tel procédé est évident.

L'alcalinisation a d'autres conséquences intéressantes :

- Elle neutralise l'acidité naturelle du cacao fermenté. Par conséquent, elle corrigera la saveur des fèves trop acides.

- Les poudres "alcalinisées" sont préférentiellement utilisées lorsqu'elles doivent être mélangées à des produits pouvant s'altérer à pH acide comme par exemple le lait. D'après COOK et MEURSING (1982), la plupart des poudres naturelles ont un pH compris entre 5,2 et 5,6 ; après alcalinisation et en fonction des conditions de traitement, le pH varie généralement de 6,8 à 8,0.

- L'alcalinisation améliore la dispersibilité des poudres dans les liquides. Cette propriété a valu aux poudres alcalinisées le qualificatif erroné de poudres "solubles". La formation de substances émulsifiantes résultant de la neutralisation des acides gras libres par l'agent alcalin serait responsable de cette "solubilisation". SCHENKEL (1973) préfère invoquer une destruction des structures cellulaires ce qui entraîne un taux de sédimentation plus faible.

- La flaveur chocolat est également affectée par ce procédé mais dans ce domaine les avis sont partagés : pour certains la flaveur est renforcée (d'après COOK et MEURSING 1982, cette hypothèse repose uniquement sur le fait qu'une couleur plus foncée suggère un goût plus corsé), pour d'autres, elle s'estompe. MARTIN (1987) constate une diminution du

bouquet chocolat avec apparition de notes "noisettes grillées" ainsi qu'une saveur ligneuse et métallique. Un goût de "savon" peut même apparaître en cas d'alcalinisation poussée. La nature et la quantité d'agent alcalin utilisé sont vraisemblablement très déterminantes.

- Une diminution des contaminations bactériennes est également citée comme avantage par SCHENKEL (1973).

4.3 Législation

L'alcalinisation fait l'objet d'une législation plus ou moins différente selon les pays. Au niveau de la CEE, une directive fixe :

- la nature de l'agent alcalin :
peuvent être employés seul ou en mélange les carbonates et hydroxydes alcalins, le carbonate et l'oxyde de magnésium et les solutions ammoniacales ;

- la quantité d'agent alcalin :
exprimée en carbonate de potassium, elle doit être inférieure à 5 % du poids de matière séche et dégraissée ;

- la teneur maximale en cendres du produit traité :
14 % de la matière sèche et dégraissée ;

- la nature et la quantité d'agent acidifiant pouvant être rajouté après traitement pour rectifier le pH :
acide tartrique et acide citrique en quantité inférieure à 0,5 % du poids total de produit.

4.4 Les différentes technologies

Les divers procédés d'alcalinisation utilisés par les industriels sont généralement tenus secrets. Cependant, quelques brevets ont été déposés et les grandes lignes des procédés sont décrites dans quelques ouvrages dont ceux de MINIFIE 1989, MARTIN 1987, COOK et MEURSING 1982, CLARKE 1949.

Les différentes technologies pouvant être employées reposent essentiellement sur l'état du cacao au moment du traitement : fèves, nibs, masse ou tourteau.

Traitement sur fèves :

Ce mode de traitement n'est plus utilisé étant donné la présence des coques qui absorbent une grande partie de la solution alcaline et qui représentent une source de contamination chimique (pesticides) et microbienne.

Traitement sur nibs

Cette technique est très utilisée car l'absorption de la solution alcaline et le séchage sont faciles et elle permet d'obtenir une bonne qualité de poudre au point de vue couleur et flaveur. Cependant, ce procédé est lent et coûteux.

Il peut s'agir soit d'un procédé en "batch" soit d'un procédé continu (alcalinisation, séchage et torréfaction se font à la suite ce qui permet d'éviter les transferts dans différents réacteurs responsables de l'écrasement des nibs et de la séparation d'une partie de la matière grasse).

Brevet CARLE ET MONTANARI 1971 :
Un traitement sous vide préalable permet d'améliorer l'imprégnation des nibs par la solution alcaline

Procédé NARS (Nibs Alkalizing, Roasting and Sterilizing, Brevet 1979, Anonyme)
La solution alcaline préchauffée est pulvérisée au sein des nibs, puis la couleur se développe au cours d'un traitement à température inférieure à 100°C.

Traitement sur masse

La méthode est facile, rapide et économique mais ne permet pas d'obtenir un produit de haute qualité. La matière grasse réagit avec la solution alcaline et est responsable de saveur "savonneuse". De plus, la quantité d'eau utilisée doit être moins importante et la température plus élevée que pour les traitements sur nibs sinon l'évaporation serait très longue.

Là encore deux méthodes sont possibles : en "batch" ou en procédé continu (la solution alcaline arrive en continu sur la masse étalée en couche mince).

Traitement sur tourteau

C'est le procédé qui permet d'obtenir les poudres les plus foncées : les réactions sont plus complètes étant donné une surface de contact plus grande et une moins grande intervention de la matière grasse.

Cependant, cette technique pose certains problèmes : le tourteau étant très hydroscopique, il est nécessaire d'employer entre 50 et 100 % d'eau pour assurer une distribution homogène de l'agent alcalin. Cette eau doit ensuite être évaporée. Au cours du séchage les particules ont tendance à s'agglomérer. Plusieurs "variantes" de ce procédé permettent d'éviter ces inconvénients. Les brevets les plus récents concernent uniquement ce procédé.

Brevet SHIMATANI 1977 - Brevet WISSGOTT 1986
Alcalinisation de tourteau sous pression pour développer une teinte très rouge.

Brevet CHALIN 1977
Traitement d'un mélange tourteau/solution alcaline par un procédé de cuisson/extrusion ce qui permet de réduire la quantité d'eau utilisée.

Brevet RABOUT 1982
Injection sous pression d'une solution concentrée de carbonate alcalin et de vapeur dans le cacao sous forme de masse ou de tourteau, chauffage à au moins 120°C sous pression puis détente brutale du mélange.

4.5 Influence de la variation des paramètres d'alcalinisation sur la couleur finale des poudres

Aucune étude complète de la relation existant entre les différents paramètres du procédé et la couleur développée n'a été publiée. Généralement, les auteurs qui font référence à l'influence de tel ou tel paramètre reprennent les commentaires de MINIFIE (1989). Celui-ci n'a testé que l'effet de la quantité et de la concentration en carbonate de potassium lors du traitement de nibs ou de masse. Cependant, les conditions exactes de température et de durée ne sont pas précisées. De plus, l'évaluation des couleurs n'a pas été effectuée au moyen d'un colorimètre, il s'agit d'une appréciation visuelle.

ABO-BAKR T. et SHEKIB L. (1987) ont réalisé le traitement de nibs par le carbonate de sodium ou le carbonate de potassium ou le bicarbonate de sodium. Pour chaque agent alcalin, ils ont testés quatre concentrations.

Qualité du cacao

- Origine des fèves

La plupart des auteurs s'accordent pour dire que l'origine des fèves a une grande influence sur la couleur développée mais sans plus de précision. SCHENKEL (1973) rapporte que les fèves "rouges" telles les fèves en provenance de BAHIA ou de SAO THOME donnent des couleurs plus foncées. Il précise également que les fèves de la variété Criollo, c'est à dire des fèves très claires puisque ne contenant pas d'anthocyanes, donnent après alcalinisation des couleurs brunes comparables à celles obtenues avec la variété Forastero.

- Etat du cacao au moment du traitement

Selon que l'alcalinisation a été conduite sur nibs sur masse ou sur tourteau, la couleur obtenue présente des nuances différentes mais la comparaison n'a jamais été effectuée avec des conditions opératoires identiques :
le traitement sur nibs permettrait d'obtenir des couleurs rouges à brun sombre avec des flaveurs agréables ; sur masse les teintes sont plus jaunes (MINIFIE 1989) et la saveur moins agréable (apparition de goût de "savon") et c'est en travaillant sur tourteau que l'on obtient les poudres les plus foncées (ex. : obtention des poudres "noires" utilisées comme colorant et non pas en tant que matière de base en raison d'une saveur désagréable).

Quantité d'eau

Plus la quantité d'eau est élevée plus la nuance rouge est marquée (MINIFIE 1989, ABO-BAKR et al. 1987).

Quantité d'agent alcalin

Selon MINIFIE (1989), lorsque l'alcalinisation a lieu sur nibs, plus la quantité d'agent alcalin est élevée plus la couleur est foncée. Si le traitement est réalisé sur masse, une plus grande quantité d'agent alcalin ne conduit pas à un renforcement de la teinte mais à une modification de nuance.

Nature de l'agent alcalin

Le carbonate de potassium est l'agent alcalin le plus utilisé car c'est avec ce produit que les poudres alcalinisées auraient la meilleure saveur.

Les expériences menées par ABO-BAKR et al. (1987) ont montré que les nibs traités avec le carbonate ou le bicarbonate de sodium donnent des poudres plus foncées que celles obtenues avec le carbonate de potassium mais la comparaison est effectuée en se basant sur des équivalences de concentration massique et ne tient compte ni du pH ni de la normalité.

Température

La température d'alcalinisation doit rester relativement basse pour assurer le développement d'une teinte rouge et 80-85°C doit être considérée comme une température maximum (MINIFIE 1989).
Une augmentation de la température ne permettrait pas d'accélérer le développement de couleur de façon significative (SCHENKEL 1973).

Pression

Certains procédés font appel à l'utilisation de pression plus ou moins élevée au cours de la phase d'alcalinisation pour accélérer la réaction (RICHARDSON 1982) ou favoriser la pénétration de la solution alcaline (KLEINERT cité par SCHENKEL 1973) ou améliorer la teinte rouge développée (Brevet WISSGOTT 1986).

Oxygénation

La teinte rouge ne peut être obtenue sans un courant d'air suffisant durant le procédé (MARTIN 1987).

Torréfaction

Que la torréfaction soit conduite avant ou après alcalinisation, les couleurs finales obtenues sont similaires (SCHENKEL 1973). Pour MINIFIE (1989) des températures basses de torréfaction donnent des couleurs "rougissantes" alors que des hautes températures sont responsables de couleurs brun foncé. Il ne précise cependant pas à quel moment à lieu cette phase.

Conditions de séchage

Selon SCHENKEL 1873, la couleur a tendance à foncer au cours de l'alcalinisation : un séchage prudent effectué à basse température a un effet bénéfique sur la couleur, particulièrement sur la couleur rouge.

4.6 Effets de l'alcalinisation sur la composition chimique

Très peu d'ouvrages font référence aux modifications chimiques entraînées par l'alcalinisation. Le plus souvent, il s'agit d'hypothèses basées sur la nature des substances en présence. Ainsi, CLARKE (1949) donne une liste des réactions susceptibles d'intervenir, certaines de ses hypothèses étant assez invraisemblables (ex. : formation de globulines, dégénération cellulosique ...).

Ce même auteur souligne que pour certaines réactions, le solvant lui-même (eau) peut être l'agent actif.

TANERI C. E. (1977) a montré que même pour des concentrations optimales permises en agent alcalin, il n'y a pas d'augmentation de la teneur en acides gras libres (donc pas d'hydrolyse des glycérides).

Une étude de SCHMIEDER et KEENEY (1980) indique que le traitement d'alcalinisation n'affecte pas la teneur en amidon.

En ce qui concerne l'origine de la couleur développée au cours de l'alcalinisation, les quelques auteurs qui y font référence sont d'accord pour suspecter le rôle des composés phénoliques (sans préciser lesquels) en raison de leur participation à la pigmentation naturelle du cacao.

MITCHELL (cité par COOK et MEURSING 1982) indique que les pigments du cacao fonctionnent comme des indicateurs colorés et changent de couleur en fonction du pH.

Pour JENSEN (cité par COOK et MEURSING 1982) : "les composés glycosidiques des tanins sont décomposés par le traitement alcalin et les produits solubilisés développent des pigments par oxydation alcaline".

SCHENKEL (1973) invoque la participation de mécanismes similaires à ceux se produisant au cours de la fermentation (oxydation puis condensation) mais ses explications sur la nature des phénols réagissant ne sont pas toujours exactes.

En dehors de ces quelques hypothèses, ZOUBCHENKO (1979) a réalisé une analyse chromatographique (CCM) afin de préciser le devenir au cours de l'alcalinisation du principal phénol du cacao : l'épicatéchol. Selon ses résultats, la teneur en ce composé diminue de moitié.

Des travaux préliminaires (BIANCHI 1987) ont montré l'importance de l'oxygène et la participation des flavanols à la formation pendant l'alcalinisation de produits colorés de poids moléculaires élevés, uniquement extractibles par l'eau et dont la coloration est très dépendante du pH.

4.7 Autres procédés de modification de couleur

4.7.1 Traitement à l'eau

MINIFIE 1989 rapporte qu'un traitement à l'eau sans agent alcalin réalisé sur masse ou sur tourteau entraîne le développement d'une teinte légèrement plus rouge que celle d'un cacao naturel.

Un procédé mis au point en Hollande est brièvement décrit par PERRY (1964) : après torréfaction légère des fèves et élimination des coques, les nibs obtenus sont torréfiés à température modérée (non précisée) en présence de 15 l d'eau pour 100 kg de cacao jusqu'à ce que le beurre commence à exsuder. Ce traitement permettrait d'obtenir une coloration brun rouge.

Les références les plus complètes aux procédés utilisant uniquement de l'eau sont données par WOJCIK S. et WARZECHA S. (1971 et 1973) en introduction de leur étude sur l'humidification et le séchage de poudres

de cacao : ces auteurs ont testé l'influence sur la couleur et sur les caractères organoleptiques de l'humidification à 15, 25 ou 30 % de poudres de cacao à 10 ou 16 % de matière grasse. C'est l'humidification à 30 % des poudres à 16 % de matière grasse qui leur a permis de renforcer le plus la teinte de leur produit. Les caractères organoleptiques n'en auraient pas été affectés.

4.7.2 Traitement enzymatique

Selon MARTIN R. (1987), l'utilisation d'enzymes est un procédé d'avenir. Cependant, si un certain nombre de brevets de procédé faisant intervenir des enzymes ont été déposés, très peu ont pour objectif de modifier la couleur. Pour la plupart, il s'agit de procédés destinés à développer la formation des composés aromatiques ou améliorer la solubilisation des produits. A notre connaissance, seuls trois brevets japonais décrivent le traitement du cacao par une enzyme responsable de phénomènes de brunissement (polyphénoloxydase) : brevets JP 75 037 742, JP 82 037 301 et JP 54 143 561). Malheureusement, seuls les titres et le résumé d'un des trois brevets sont disponibles en langue anglaise. Il semblerait que ces traitements soient effectués sur cacao non fermenté et soient destinés à remplacer la phase de fermentation.

Un article de MOTODA S. (1982) rend également compte d'essais de traitement par une polyphénoloxydase mais uniquement sur extrait de cacao ou sur fèves de cacao non fermenté.

CHAPITRE I

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIEL ET METHODES

1. Préparation des échantillons de travail

1.1 Matière première

Sauf indications particulières, les échantillons de cacao utilisés pour les différentes expériences proviennent d'un lot de fèves fermentées ou d'un lot de fèves non fermentées, tous deux originaires de COTE D'IVOIRE.

1.2 Préparation des nibs

Les fèves sont broyées grossièrement et les coques sont éliminées par ventilation. Après tamisage, seuls les fragments (nibs) de diamètre moyen compris entre 4 et 6 mm sont conservés.

1.3 Préparation des poudres

Les nibs congelés dans l'azote liquide sont broyés au moulin à hélice. La poudre obtenue est tamisée (taille inférieure à 0,5 mm).

1.4 Préparation des tourteaux

La poudre est partiellement dégraissée au moyen d'une presse manuelle (presse de laboratoire CARVER modèle M). Les palets compacts de tourteau sont ensuite rebroyés dans un moulin à hélice.

1.5 Préparation des poudres délipidées

Les poudres sont délipidées 8 h à l'hexane dans un extracteur de SOXHLET.

1.6 Préparation des poudres déphénolées

100 g de cacao non fermenté ou fermenté broyé puis délipidé sont extraits plusieurs fois par du méthanol aqueux à 70 % Les suspensions sont centrifugées après chaque extraction. Lorsque l'extrait est devenu incolore, le culot de centrifugation est lyophilisé.

2. Techniques d'alcalinisation

2.1 Matériel

- Alcalinisation de nibs ou de poudres délipidées déphénolées ou non

Réacteur en verre à double paroi muni d'un agitateur hélicoidal entraîné par un moteur (figure 3). Grâce au réfrigérant, il est possible de réaliser des traitements sous atmosphère ambiante sans évaporation. Le dispositif permet aussi d'effectuer des alcalinisations sous oxygène ou sous azote.

- Etude de l'influence de la température et de la pression

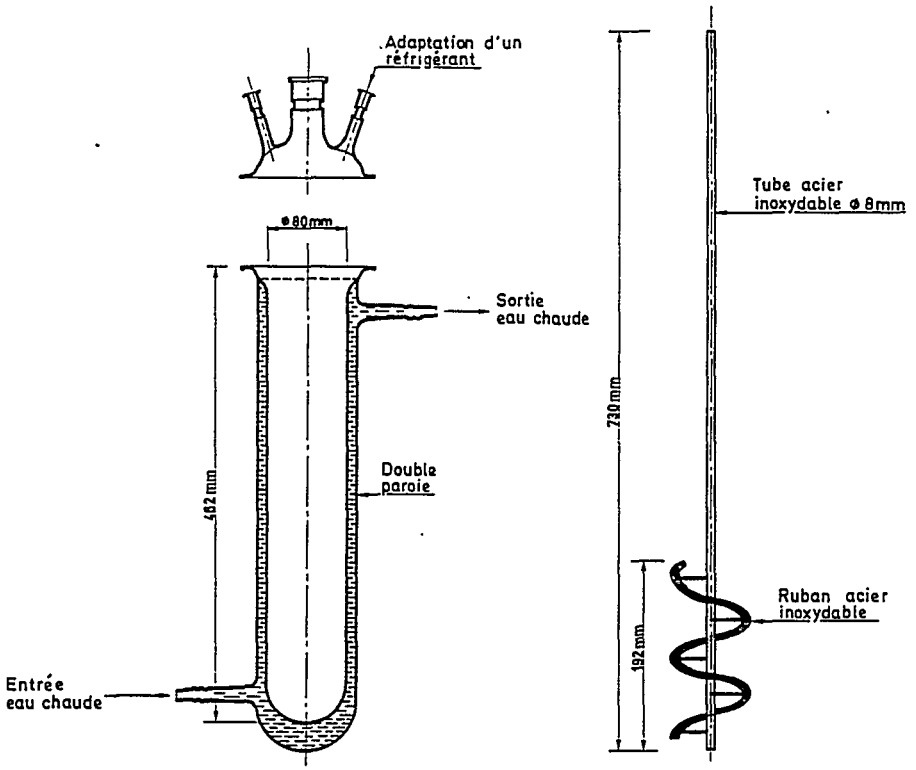


Figure 3 : Schéma du réacteur en verre utilisé pour l'alcalinisation du cacao

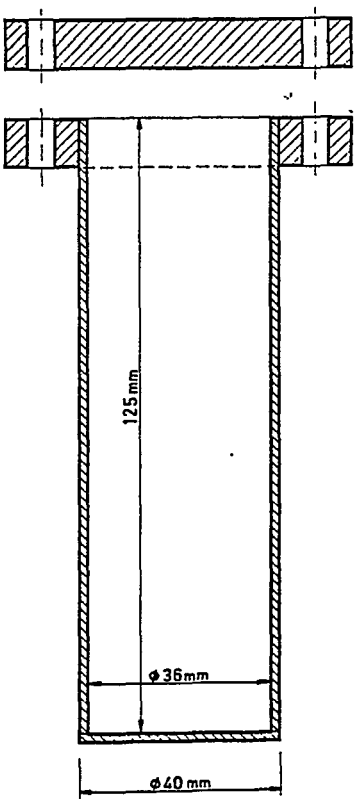


Figure 4 : Schéma du réacteur métallique utilisé pour l'étude de l'influence de la pression et de la température sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation du cacao

Réacteur métallique placé dans un four thermostaté (figure 4)

- Alcalinisation de tourteau ou de masse :

Conche horizontale FRIWESSA type PPC.

- Alcalinisation de solutions :

Fiole Erlenmeyer bouchée immergée dans un bain-marie agité.

2.2 Conditions standard

Des conditions standard ont été utilisées pour la plupart des études :

Nature de l'agent alcalin : carbonate de potassium
Quantité d'agent alcalin : 5 % de la masse de cacao sec et dégraissé
Quantité d'eau : 50 % de la masse de cacao entier

Chaque fois que les traitements se font sur du cacao "non entier", les teneurs en matière grasse, les humidités et la quantité de matière éliminée (par exemple, lors de la préparation des poudres déphénolées) sont prises en considération pour calculer les quantités de carbonate et d'eau à utiliser.

Température : 90°C
Durée : 1 h 30

Lorsque les alcalinisations sont conduites dans la conche horizontale, la température de traitement est de 80°C et la durée de 2 h.

2.3 Techniques particulières

2.3.1 Infiltration de la solution alcaline

100 g de nibs sont placés dans un ballon à deux cols, raccordé à une pompe. Un vide de 0,25 mbar est maintenu pendant 15 min puis 100 ml d'une solution à 4,6 % de carbonate de potassium (correspond à 5 % de la masse de cacao sec et dégraissé) sont introduits dans le ballon et le vide est "cassé" brutalement. Le cacao est agité 10 min à température ambiante puis 1 h 30 à 90°C. Deux essais sont ainsi réalisés.
Un cacao témoin est alcalinisé dans les mêmes conditions à l'exception de l'étape vide/aspiration.

2.3.2 Utilisation d'un savon

	Masse de cacao en g	Volume d'eau en ml	K2 CO3 en g	Beurre de cacao en g
témoin	300	300	6,9	0
essai 1	300	300	6,9	30
essai 2	300	300	6,9	10

Le carbonate de potassium, l'eau et le beurre préalablement fondu sont chauffés à reflux pendant 1 h. Après décantation, la phase aqueuse

est ajoutée aux nibs. Le mélange est chauffé à 90°C et agité pendant 1 h 30 dans le réacteur en verre.

3. Techniques de séchage

3.1 Séchage en étuve

Sauf cas particuliers précisés au niveau de la partie "résultats", après traitement, les échantillons sont étalés en couche mince puis séchés en étuve ventilée à 40°C.

3.2 Lyophilisation

Les échantillons sont congelés par immersion dans l'azote liquide puis lyophilisés (lyophilisateur CHRIST ALPHA 1/6).

4. Technique de torréfaction

Les nibs sont étalés en couche mince et torréfiés dans une étuve ventilée à 140°C pendant 35 min.

5. Traitements enzymatiques

Pour chaque traitement enzymatique effectué, un témoin est réalisé en suivant le même mode opératoire à l'exception de la présence d'enzyme.

5.1 Traitements enzymatiques sans alcalinisation

Action d'une polyphénoloxydase (Tyrosinase EC 1.14.18.1. SIGMA)

Essai sur nibs :

30 g de nibs fermentés et 50 ml d'eau contenant quelques mg de Tyrosinase sont homogénéisés dans une fiole Erlenmeyer et placés au bain-marie à 40°C pendant 2 h 30.
Les nibs sont ensuite séchés à l'étuve à 40°C.

Essai sur poudre délipidée :

10 g de cacao fermenté broyé délipidé et 20 ml de tampon 0,1 M pH 6,5 (pH d'activité optimale) contenant quelques mg de Tyrosinase sont mélangés puis sont étalés dans une boîte de Pétri qui est ensuite fermée de façon étanche et placée à l'étuve à 40°C pendant 2 h. Le mélange est ensuite séché à 40°C puis rebroyé et tamisé.

Action de levures : Saccharomyces cerevisiae

300 g de nibs fermentés sont mélangés dans le réacteur en verre à 3 g de levures et 200 ml d'eau distillée pendant 4 h à 30°C.

5.2 Traitements enzymatiques avant alcalinisation

Action d'une cellulase (EC 3.2.1.4 SIGMA)

50 g de nibs fermentés, 100 ml d'eau distillée, 2 gouttes d'acide chlorhydrique 0,1 N (pour ramener le pH à 5 qui correspond au pH d'activité maximale) et quelques mg d'enzyme sont mélangés dans une fiole Erlenmeyer et placés au bain-marie à 37°C pendant 3 h.

2 g de carbonate de potassium dissous dans 10 ml d'eau sont rajoutés. Les nibs sont alors chauffés pendant 3 h à 80°C sous réfrigérant, puis séchés à l'étuve à 40°C.

Action d'une amylase (α amylase EC 3.2.1.1 SIGMA)

100 g de nibs fermentés et 200 ml d'eau contenant 1 g d'α amylase sont placés dans un ballon à 37°C pendant 5 h 30.

2,3 g de carbonate de potassium (correspond à 5 % du poids de matière sèche et dégraissée) sont rajoutés au mélange qui est alors chauffé à 90°C sous réfrigérant pendant 1 h 30 puis séché à l'étuve à 40°C.

Action de levures (Saccharomyces cerevisiae)

300 g de nibs fermentés sont mélangés dans le réacteur en verre à 100 ml d'eau distillée et à 3 g de levures pendant 1 h à 30°C puis 100 ml d'eau sont rajoutés et le mélange est maintenu à 30°C pendant encore 1 h.

20 ml d'eau contenant 6,9 g de carbonate de potassium sont versés dans le réacteur et l'agitation des nibs est réalisée pendant 2 h à 90°C sous réfrigérant.

5.3 traitement enzymatique après alcalinisation

15 g de cacao alcalinisé selon les conditions standard. puis séché, broyé et délipidé sont mélangés à 30 ml de tampon 0,1 M pH 6,5 contenant quelques mg de Tyrosinase (EC 1.14.18.1 SIGMA). Le mélange est placé au bain-marie à 40°C pendant 4 h puis lyophilisé.

6. Développement de la matière colorante insoluble

6.1 Influence de l'humidité

Evolution de la MCI au cours du séchage

130 g de cacao fermenté pulvérulent et délipidé sont chauffés à 95°C en présence de 300 ml d'eau pendant 1 h 30 dans un ballon de 1 l sous réfrigérant.

Le cacao est ensuite étalé en couche mince et séché à l'étuve à 60°C. Des prélèvements sont effectués tout au long du séchage et sont lyophilisés. L'humidité des différents prélèvements est déterminée par pesée avant et après lyophilisation.

Les différentes poudres obtenues sont rebroyées et tamisées (63 µm) avant détermination des valeurs L a b.

Développement de la MCI à différentes humidités

Des échantillons de 10 g de cacao fermenté délipidé pulvérulent sont mélangés à des quantités croissantes d'eau de façon à obtenir des humidités de 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45, 50 et 60 % (l'humidité initiale de la poudre est prise en compte).

L'homogénéisation poudre/eau est réalisée dans un moulin à hélice puis les poudres humidifiées sont placées dans des ballons de 250 ml bouchés, à 60°C pendant 3 h.

Après traitement, les mélanges sont lyophilisés puis rebroyés et tamisés.

6.2 Influence de la durée

130 g de cacao fermenté délipidé pulvérulent et 56 ml d'eau sont homogénéisés au moulin à café (humidité finale : 35 %). Le mélange est placé dans un ballon bouché de 1 l dans une étuve à 60°C pendant 7 h. Des prélèvements sont effectués tout au long du traitement et lyophilisés.

6.3 Influence de l'oxygène

Traitement en présence d'un antioxydant

Un essai identique au précédent est effectué mais cette fois-ci en présence d'un antioxydant : 1 g de métabisulfite de sodium dissous dans l'eau.

Traitement sous azote

15 g de cacao fermenté délipidé pulvérulent sont placés pendant deux heures sous un courant d'azote. 35 ml d'eau préalablement dégazée puis saturée par barbotage d'azote sont ajoutés et le mélange est séché sous courant d'azote dans une étuve à 60°C.

Un témoin est réalisé en opérant de la même façon mais le séchage a lieu en atmosphère naturelle.

6.4 Influence de la température

5 lots de 10 g de cacao fermenté délipidé sont mélangés dans un moulin à hélice chacun à 3 ml d'eau (en tenant compte de l'humidité initiale du cacao, l'humidité finale est de 30 %). Les mélanges sont placés dans des ballons bouchés pendant 3 h à 6, 20, 40, 60 ou 80°C.

7. Evaluation des couleurs

7.1 Détermination de la couleur globale des poudres

Préparation des échantillons :

La granulométrie, la quantité de matière grasse et son état de cristallisation (dépendant des traitements thermiques subis par le cacao) ont une grande influence sur la couleur apparente des poudres. Ainsi, une poudre paraîtra d'autant plus foncée que sa teneur en beurre est élevée. Par conséquent, pour normaliser les mesures, toutes les déterminations de couleur se font après broyage (moulin à hélice), raffinage (raffineuse trois cylindres) et délipidation totale par extraction à l'hexane.

Rq. : dans le cas d'échantillon traité déjà sous forme broyé et délipidé, un rebroyage et un tamisage avant détermination de la couleur sont nécessaires.

Evaluation de la couleur :

Les couleurs des poudres sont déterminées au moyen d'un colorimètre HUNTERLAB LABSCAN (illuminant D) et exprimées en valeurs L, a, b.

Ce système d'expression numérique des couleurs a été établi en 1976 par la commission internationale de l'éclairage et repose sur des mesures de réflectance.

La valeur L de la luminance varie de 100 (blanc parfait) à 0 (noir). Plus L est bas, plus les poudres sont foncées.

Les paramètres a et b représentent la teinte :

a : mesure le rouge lorsqu'il est positif, le gris lorsqu'il est nul et le vert lorsqu'il est négatif.

b : mesure le jaune lorsqu'il est positif, le gris lorsqu'il est nul et le bleu lorsqu'il est négatif.

Dans le cas des poudres de cacao, a et b sont toujours positifs.

Il est assez difficile de traduire les variations des paramètres en terme d'évolution de couleur. L'aspect rouge d'une poudre peut augmenter soit parce que sa composante rouge augmente soit parce que sa composante jaune diminue. Nous avons préféré utiliser le rapport a/b qui est plus représentatif de l'évolution de la teinte : plus le rapport est élevé, plus la teinte est rouge.

7.2 Appréciation de la matière colorante soluble (MCS)

0,5 g de poudre fermentée délipidée est extrait par 25 ml de tampon citrate - phosphate 0,1 M pH 7 pendant 15 min. La suspension est filtrée et l'absorbance est déterminée après 15 min. à 500 nm (correspond à l'un des maxima d'absorption de la matière colorante soluble).

Ces valeurs ne sont utilisées qu'à titre comparatif.

8. Techniques de supplémentation

8.1 Supplémentation en fructose

200 g de nibs de cacao fermenté sont introduits dans un ballon de 1 l. Le vide est effectué grâce à un évaporateur rotatif, 200 ml d'une solution de fructose à 60 g/l sont aspirés dans le ballon puis le vide est "cassé" brutalement pour permettre une bonne pénétration de la solution dans les nibs.

Un cacao témoin est traité de la même façon en utilisant 200 ml d'eau à la place de la solution de fructose.

8.2 Supplémentation en fructose et acides aminés

La technique utilisée précédemment est appliquée pour supplémenter 4 lots de 300 g de nibs fermentés avec les solutions suivantes :

Solutions		Témoin	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Eau	en ml	100	100	100	100
Fructose)				2	6
LYS)				1	
HIS)			0,2		0,2
ALA)	en g		0,6		0,6
MET)			0,2		0,2
LEU)			1		1
GLY)			0,1		0,1

Après introduction de la solution de supplémentation, l'agitation est maintenue pendant 30 min.

9. Techniques d'extraction

9.1 Extraction des cellules à pigments

Nous avons adapté la méthode décrite par BROWN (1954) afin de pouvoir séparer les cellules pigmentées, contenant les composés phénoliques, des autres cellules.
Cette séparation n'est possible que dans le cas d'un cacao non fermenté séché au soleil car la fermentation ou la lyophilisation sont responsables de lyses cellulaires.

300 g de fèves fermentées sont décortiqués, dégermés puis broyés dans l'éther de pétrole (broyeur à couteaux SORVAL). La matière grasse est éliminée par agitation dans le solvant et filtrations successives. Le cacao broyé délipidé est remis en suspension dans l'éther de pétrole. Après plusieurs décantations, avec à chaque fois récupération des cellules blanches surnageantes, le sédiment riche en cellules pigmentées est isolé par filtration, séché puis purifié par tamisage sur tamis 40 µm (théoriquement, seules les cellules pigmentées traversent les mailles du tamis).

9.2 Extraction de l'amidon

SCHMIEDER et KEENEY (1980) décrivent une méthode d'isolement de l'amidon à partir de fèves de cacao. Etant donné que les grains d'amidon sont localisés exclusivement dans les cellules non pigmentées, nous avons adapté leur méthode en partant directement de ce type cellulaire (préalablement séparé des cellules à pigments selon la méthode décrite au paragraphe précédent) ce qui devrait permettre une meilleure purification.

20 g de cellules non pigmentées obtenues à partir d'un cacao non fermenté sont mis en suspension dans 400 ml d'eau distillée. Après agitation, la suspension est filtrée au travers d'un filtre WHATMANN n° 4 (leur diamètre moyen étant compris entre 2 et 12 µm, les grains d'amidon

passent au travers du filtre). Le filtre est changé plusieurs fois pour éviter les phénomènes de colmatage.

Le filtrat est centrifugé pendant 10 min. à 5000 tours/min. Le culot de centrifugation est lavé 2 fois avec 100 ml d'eau, 2 fois avec 100 ml de méthanol. Centrifugation après chaque lavage. Le sédiment est agité dans un mélange eau/toluène 15/10. La suspension est centrifugée et le surnageant est écarté (selon les auteurs de cette méthode, cette étape est destinée à éliminer les protéines). Après un dernier lavage au méthanol, la fraction "amidon" est séchée.

Un examen au microscope optique après coloration des grains d'amidon au liquide de LUGOL de la poudre de départ et de la poudre finale indique qu'il y a eu une bonne concentration des grains d'amidon et une élimination de la majorité des fragments cellulaires (seuls subsistent des fragments de taille égale ou inférieure à celle des grains d'amidon).

9.3 Extraction des phénols

Une prise d'essai exacte voisine de 1 g de poudre de cacao délipidé est extraite pendant 45 min. par 75 ml de méthanol aqueux à 70 % à température ambiante. Après centrifugation, l'extrait est complété à 100 ml par de l'eau (solution X).

9.4 Extraction des flavanols

50 g de cacao non fermenté délipidé sont extraits 2 fois par 500 ml d'un mélange acétone/eau (75/25) pendant 1 h à température ambiante.

La suspension est filtrée. Après saturation en chlorure de sodium, deux phases se séparent. La phase acétonique supérieure est évaporée à sec. Le résidu est repris par 400 ml d'eau. La solution est lavée quatre fois (V/V) par du chloroforme (élimination de la théobromine) puis extraite quatre fois (V/V) par de l'acétate d'éthyle.

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée.

9.5 Extraction des protéines

0,5 g de poudre délipidée, 2 g de polyvinylpyrolidone, 0,6 g de PEG 6000, 10 µl de mercapto éthanol et 50 ml d'un tampon citrate - phosphate 0,075 M pH 5,2 sont agités pendant 15 min. à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est filtré sur papier.

Dessalage de l'extrait :

Dessalage par une technique chromatographique :

10 ml de surnageant sont déposés sur une colonne ULTROGEL ACA 202 (2,2 x 21 cm) puis élués par un tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 . Après élimination du volume mort, 25 ml d'éluat sont récupérés.

Dessalage par dialyse :

Le surnageant est dialysé contre de l'eau distillée (tube à dialyse de porosité 6000 - 8000 daltons) pendant 8 h. L'extrait est lyophilisé.

9.6 Extraction de la MCS

9.6.1 Influence du pH sur l'extraction de la MCS

1 g de cacao alcalinisé, séché, broyé, délipidé est extrait à température ambiante pendant 15 min. par :

1) 20 ml d'eau extrait 1

ou

2) 20 ml de tampon borate 0,1 M pH 10 extrait 2

Les solutions suivantes sont préparées :

Solutions		A	B	C
Extrait 1	)	4	4	
Extrait 2	) en ml			4
Eau	)	26	1	5
Tampon pH 10	)		25	21
Temps de repos après extraction (en min.)		15	30	15

Solution A : MCS extraite par l'eau et laissée au pH de l'eau
Solution B : MCS extraite par l'eau et ramenée à pH 10
Solution C : MCS extraite par tampon pH 10 et maintenu à pH 10

Rq. : Les différents temps de repos sont tels que les MCS des solutions B et C restent à pH 10 durant des périodes identiques.

les spectres d'absorption en lumière visible des 3 solutions sont tracés.

9.6.2 Extraction

La matière colorante d'un cacao fermenté, alcalinisé, broyé et délipidé est extraite par un tampon borate 0,1 M pH 10 puis par de l'eau.

L'extrait brut est lyophilisé puis lavé à l'éthanol, au méthanol, au chloroforme puis à l'acétone. Cette MCS est ensuite solubilisée dans l'eau (10 g/ 250 ml) et dialysée contre de l'eau distillée (tube à dialyse de porosité 6000-8000) pendant 54 h. Après centrifugation et élimination du précipité, la solution est lyophilisée.

10. Méthodes de dosage

10.1 Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau se fait après dessication jusqu'à poids constant d'une quantité donnée d'échantillon, à l'étuve à 103°C.

10.2 Détermination de la teneur en matière grasse

Une masse exacte de cacao broyé et raffiné est délipidée à l'hexane pendant 16h dans un extracteur de SOXHLET. Après évaporation du solvant, la quantité de matière grasse récupérée est pesée.

10.3 Dosage de l'acidité libre

5 g de poudre de cacao, préalablement tamisée (tamis de porosité de 0,5 mm) sont mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée bouillie et refroidie.

Après une heure d'agitation, l'acidité libre est dosée dans la totalité de la solution avec de la soude N/10. Le dosage est arrêté à pH 8,3.

Les résultats sont exprimés en ml de soude N/10 nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans 1 g de fèves de cacao.

10.4 Détermination du pH

10 g de poudre de cacao sont mélangés à 90 ml d'eau distillée bouillante. Après refroidissement, le pH de la suspension est déterminé.

10.5 Dosage de la théobromine

Une prise d'essai P g est extraite par 100 ml d'eau à 80°C pendant 15 min. Après centrifugation et filtration, la teneur en théobromine de l'extrait est déterminée par chromatographie liquide haute pression après étalonnage externe, dans les conditions suivantes :

Chromatographe	: VARIAN 5000					
Précolonne	: Lichrosorb RP 18, 30 µm, 10 x 4,6 mm					
Colonne	: Lichrosphère RP 18, 5 µm, 250 x 4,6 mm					
Solvants	: A : acide phosphorique 2mM					
	B : méthanol					
Gradient	: temps (min.)	: 0	27	35	38	43
	% de B	: 5	59	100	100	5
Débit	: 1 ml/ min.					
Détecteur	: Détecteur UV HEWLETT PACKARD 1040 A. 280 nm					

Pour le cacao broyé délipidé : P = 0,3 g
Pour les cellules non pigmentées : P = 1 g
Pour les cellules pigmentées : P = 0,1 g

10.6 Dosage des phénols totaux, tanins et non tanins

- 5 ml de la solution X (I.9.3) sont complétés à 50 ml par de l'eau (solution A)

- 10 ml de la solution X sont dilués avec 10 ml d'eau puis amenés à pH 3,5 avec de l'acide chlorhydrique. La solution est agitée pendant 10 min. en présence de 2 g de POLYCLAR AT (permet l'adsorption des composés phénoliques). La suspension est filtrée (solution B).

- 10 ml de la solution X sont amenés à pH 4 par de l'acide chlorhydrique. Une solution de gélatine 1 % et chlorure de sodium 10 % est ajoutée goutte à goutte jusqu'à absence de floculation (précipitation des

tanins). Après centrifugation, la solution est complétée à 100 ml (solution C).

Dosage par la méthode de FOLIN CIOCALTEU

Une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution d'acide gallique à 200 µg/ml.

Dans des tubes à essai, sont versés successivement :

- 1 ml des solutions A, B, C ou solution étalon
- 6 ml d'eau
- 1 ml de réactif de FOLIN CIOCALTEU

Après 3 min. :

- 2 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 20 %

Les solutions sont placées 20 min. à 40°C. puis la coloration bleue est mesurée au spectrophotomètre à 760 nm.

Résultats :

Les concentrations de chaque solution sont déterminées en se rapportant à la gamme d'étalonnage. Les résultats sont calculés en tenant compte des dilutions et de la prise d'essai et sont exprimés en m.eq. acide gallique/g de cacao délipidé :

phénols totaux = A - B
non tanins = C - B
tanins = phénols totaux - non tanins

10.7 Dosage des flavanols

Une prise d'essai de 1 g de poudre de cacao délipidé est extraite selon protocole établi paragraphe I.9.4. 2 mg d'acide gallique, rajoutés juste après séparation de la phase acétonique constituent l'étalon interne.

L'extrait est analysé par chromatographie liquide haute pression dans les conditions décrites en 10.5

Une calibration est effectuée par injection d'une solution d'acide gallique et d'épicatéchol en concentration connue. Les coefficients de réponse des procyanidols oligomères sont considérés comme identiques à celui de l'épicatéchol. Les résultats sont exprimés en equivalent mg épicatéchol / g de cacao délipidé.

10.8 Dosage des protéines

Une prise d'essai de 0,5 g de cacao délipidé est extraite et dessalée (technique chromatographique) selon le mode opératoire défini paragraphe 9.5

Dosage par la méthode de BRADFORD :

Une solution de sérum albumine bovine à 0,2 mg/ml permet de réaliser une gamme d'étalonnage.

A 1 ml d'extrait et à 1 ml de chaque solution étalon sont rajoutés 5 ml de réactif de BRADFORD. Après 2 min., la densité optique est déterminée à 595 nm. La coloration est stable pendant 1 h.

Réactif de BRADFORD :

Bleu de Coomassie G 250	: 100 mg
Ethanol 95°C	: 50 ml
Acide o. phosphorique à 85 %	: 100 ml
Eau	: q.s.p. 1000 ml

10.9 Dosage des acides aminés libres et totaux

Acides aminés libres :

2 g de poudre délipidée sont extraits par 30 ml de tampon citrate pH 2,2 pendant 5 h. Après filtration, la solution est analysée par chromatographie liquide haute pression.

Conditions chromatographiques :

Dérivation précolonne à l'orthophtaldialdéhyde
Colonne : Ultrasphère C 18, 3 µm, 4,6 x 75 mm
Eluants : A : acétate de sodium 0,01M + 1 % de THF
B : méthanol

Gradient :											
tps (min.)	0	0,5	8	10	13	15	17	18	21	24	35
% de B	25	25	40	40	45	45	55	55	80	80	25

Détection : fluorescence. Excitation : 360 nm, émission : 455 nm

Acides aminés totaux :

La poudre délipidée est hydrolysée (HCl 6 N, 110°C, 24h). Les acides aminés libérés sont analysés comme précédemment.

10.10 Dosage des sucres

Fructose :

5 g de poudre délipidée sont extraits par 30 ml d'un mélange éthanol/eau (80/20) à reflux pendant 1 h. L'opération est renouvelée une seconde fois. Après filtration, la solution est clarifiée en ajoutant 2 ml d'une solution de ferrocyanure de potassium à 150 g/l (solution de CAREZ I) et 2 ml d'une solution d'acétate de zinc à 300 g/l (solution de CAREZ II). Après filtration sur Büchner et évaporation, le résidu est complété à 10 ml et refiltré sur membrane MILLIPORE* 0,5 µm.

La solution est dosée par chromatographie liquide haute pression.

Colonne : silice greffée NH2, 5 µm, 0,4 cm x 25 cm
Solvant : acétonitrile / eau (80/20)
Débit : 1 ml/min.
Détecteur : réfractomètre

Maltose et glucose

Une prise d'essai de 2 g de poudre délipidée est extraite pendant 30 min. par 50 ml d'eau à 60°C. Après filtration, le dosage est effectué par une méthode enzymatique (kit enzymatique BOEHRINGER n° 1113950)

Principe du dosage :

$$\text{Maltose + eau} \xrightarrow{\alpha\ \text{glucosidase}} \text{2 D-glucose}$$

$$\text{D-glucose + ATP} \xrightarrow{\text{hexokinase}} \text{Glucose-6-phosphate + ADP}$$

$$\text{G-6-P + NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-P déshydrogénase}} \text{gluconate-6-phosphate + NADPH + H}^+$$

La quantité de NADPH formé est stoechiométrique avec la quantité de glucose et avec la moitié de la teneur en maltose. L'augmentation du NADPH est déterminée par mesure de l'absorbance à 334, 340 ou 365 nm.

10.11 Dosage de l'amidon

Une prise d'essai de 1 g de poudre délipidée est mélangée à 20 ml de diméthylsulfoxyde et 5 ml d'acide chlorhydrique 8 M. La suspension est incubée 30 min. à 60°C sous agitation. Après refroidissement jusqu'à température ambiante, 50 ml d'eau sont rajoutés. Le pH est ajusté à 4,5 avec de la soude 5 M. La solution est versée dans une ballon jaugé de 100 ml et complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau puis filtrée sur papier.

L'amidon est dosé par une méthode enzymatique (Kit BOEHRINGER n° 207 748).

Principe du dosage :

$$\text{Amidon + (n-1) H2O} \xrightarrow{\text{amyloglucosidase}} \text{n D-glucose}$$

$$\text{D-glucose + ATP} \xrightarrow{\text{hexokinase}} \text{glucose-6-phosphate + ADP}$$

$$\text{G-6-P + NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6P-déshydrogénase}} \text{gluconate-6-phosphate + NADPH + H}^+$$

La quantité de NADPH formée est stoechiométrique avec la quantité de glucose libéré par hydrolyse de l'amidon. L'absorbance du NADPH est déterminée à 340 nm.

11. Fractionnement de la matière colorante soluble (MCS)

11.1 Chromatographie par échange d'ions

La charge électrique de la matière colorante à un pH donné est déterminée au cours d'une électrophorèse (gel de polyacryalamide dans un tampon pH 8,3).

Quelques mg de MCS sont solubilisés dans un tampon borate 0,1 M pH 8 ou dans une solution 0,1 M de chlorure de sodium puis déposés sur une colonne (1 x 15 cm) de Spherodex DEAE (diéthylaminoéthyl). Différents essais d'élution ont été effectués en faisant varier la nature, la force ionique et le pH de l'éluant : tampon borate 0,1 M pH 8, tampon citrate 0,05 M pH 4, chlorure de sodium 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,5 M et 1 M.

11.2 Chromatographie par filtration sur gel

Matériel :

Colonne PHARMACIA D = 2,5 cm

Pompe péristaltique PHARMACIA P-1

Spectrophotomètre BECKMAN modèle 25, muni d'une microcellule en quartz permettant une détection continue

Collecteur de fractions PHARMACIA Frac-100

Enregistreur BECKMAN

Gels employés:

	Limites d'exclusion	
	Protéines globulaires (daltons)	dextranes (daltons)
Trisacryl GF 05	300-2500	
Sephadex G 25	1000-5000	500-1000
Sephadex G 50	1500-30000	500-10000
Sephadex G 75	3000-70000	1000-50000
Ultrogel ACA 34	20000- 350000	

Les limites d'exclusion de ce tableau ne sont données qu'à titre indicatif car les molécules utilisées pour étalonner ces gels n'ont pas forcemment le même encombrement stérique que les molécules constituant la MCS.

Techniques

Le volume mort des colonnes est déterminé par le volume d'élution du bleu Dextran (2 000 000 daltons).

Le volume des dépôts est inférieur à 4 % du volume total de la colonne.

L'éluant est de l'eau distillée dégazée et son débit est réglé à 70 % du débit naturel des colonnes.

L'élution des différentes fractions est suivie par mesure des densités optiques à 500 ou 280 nm.

12. Réalisation de systèmes modèles

12.1 Alcalinisation d'épicatéchol

5 ml d'une solution aqueuse 0,002 M d'épicatéchol est mélangé à 5 ml d'une solution de carbonate de potassium à 1 %.
Une solution identique est préparée en rajoutant quelques mg de métabisulfite de sodium. Les deux solutions sont chauffées 1 h à 60°C.

Les spectres d'absorption en lumière visible des solutions avant et après chauffage sont tracés.

12.2 Alcalinisation d'un extrait de flavanols purifiés, seul ou en présence d'un extrait protéique

Préparation de l'extrait purifié de flavanols

150 g de cacao pulvérulent non fermenté délipidé sont extraits et purifiés comme indiqué paragraphe 9.4. Un lavage à l'éther éthylique (4 fois V/V) vient cependant compléter l'étape de purification. Rendement : 5 %

2 g de l'extrait de flavanols sont dissous dans de l'acide acétique à 5 % et déposé sur colonne SEPHADEX LH 20 (2,5 X 60 cm). L'élution des différents composés est suivie par une détection à 280 nm. Les solvants d'élution sont tout d'abord l'acide acétique à 5 % (335 ml) puis le méthanol. L'éluat méthanolique est récupéré dans des tubes à essai par fraction de 20 ml. Une analyse par HPLC (I.10.7) de certains tubes permet de localiser les fractions les plus pures en flavanols. Ces fractions sont réunies et évaporées. Rendement : 50 %

Préparation de l'extrait protéique

3 g de cacao fermenté pulvérulent sont extraits et purifiés par dialyse comme indiqué paragraphe I.9.5.

Alcalinisations

Conditions 1 :
100 mg de l'extrait de flavanols sont dissous dans 5 ml d'une solution de carbonate de potassium pH 9,5. La solution est maintenue 1 h au bain-marie à 70°C.

Conditions 2 :
100 mg de l'extrait de flavanols sont dissous dans 5 ml d'une solution à 1 % de carbonate de potassium (pH 10,9). La solution est maintenue 15 min. à 40°C puis neutralisée avec une solution d'acide chlorhydrique. (Le gel utilisé ultérieurement ne supporte pas des pH trop élevés)

Fractionnement des flavanols alcalinisés

Les solutions de flavanols alcalinisés seuls ou en présence d'un extrait protéique ainsi qu'une solution de MCS (200 mg/5 ml) sont déposées tour à tour sur une colonne de TRYSACRYL GF 05 et éluées selon les conditions définies paragraphe I.11.2.

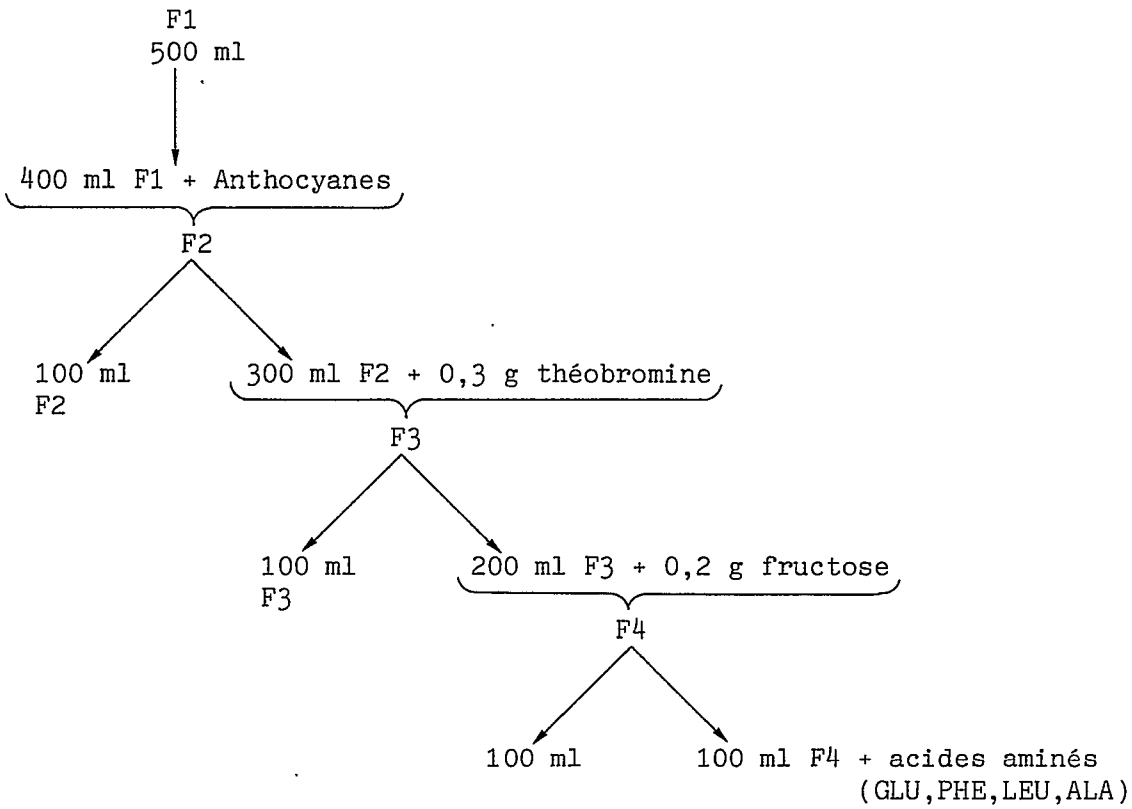
12.3 Alcalinisation d'un mélange extrait de flavanols et différents constituants du cacao

Extraction des flavanols :

10 g de cacao délipidé sont extraits selon le protocole défini paragraphe 9.4. La solution finale est complétée à 500 ml par de l'eau (solution S1).

Préparation des différentes solutions :

les quantités des composés rajoutés correspondent environ à leur teneur dans le cacao.



F1 : flavanols
F2 : flavanols + anthocyanes
F3 : flavanols + anthocyanes + théobromine
F4 : flavanols + anthocyanes + théobromine + fructose
F5 : flavanols + anthocyanes + théobromine + fructose + acides aminés

Alcalinisation des solutions :

25 ml des différentes solutions sont alcalinisés par 25 ml d'une solution à 10 % de carbonate de potassium pendant 1 h à 70°C.

Les spectres en lumière visible (400 - 600 nm) des solutions sont tracés.

12.4 Alcalinisation d'un mélange extrait protéique/extrait phénolique

- préparation de l'extrait phénolique

1 g de poudre de cacao délipidé est extrait selon protocole établi au paragraphe I.9.3

- préparation de l'extrait protéique

1 g de poudre de cacao délipidé est extrait et dessalé sur une colonne ACA 202 comme indiqué au paragraphe I.9.5.

- alcalinisation :

tube A : 5 ml extrait phénolique
10 ml extrait protéique
5 ml solution de K_2CO_3 à 10 %

tube B : 5 ml extrait phénolique
10 ml d'eau
5 ml solution de K_2CO_3 à 10 %

tube C : 5 ml d'eau
10 ml extrait protéique
5 ml solution de K_2CO_3 à 10 %.

les 3 mélanges sont chauffés pendant 1 h à 80° C.
Après refroidissement, les spectres en lumière visible des différentes solutions sont tracés (dilution au 1/3).

12.5 Alcalinisation d'une solution de fructose

Une solution à 2 % de fructose et 4,6 % de carbonate de potassium est chauffée 1 h à 80°C.

Après dilution au 1/6 ème par de l'eau, le spectre d'absorption en lumière visible de cette solution est tracé.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS DE TRAITEMENT SUR LA COULEUR DES POUDRES DE CACAO

II. ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS DE TRAITEMENT SUR LA COULEUR DES POUDRES DE CACAO

La pratique du procédé d'alcalinisation au niveau industriel a clairement démontré que la couleur des poudres de cacao est très influencée par les conditions de traitement. Chaque industriel, par expérience, fixe les conditions lui permettant d'obtenir la nuance souhaitée. Cependant, aucune étude rigoureuse et systématique de l'influence des différents paramètres de traitement sur la couleur développée n'a, à notre connaissance, été publiée. Cette étude fera l'objet de ce premier chapitre.

Des essais seront également conduits afin de déterminer s'il est possible d'obtenir des couleurs plus intenses en remplaçant ou tout au moins en complétant le procédé classique d'alcalinisation par un traitement enzymatique.

1. Signification des mesures

L'appréciation des variations de couleur est un problème délicat. Les mesures colorimétriques (paramètres L a b) permettent d'effectuer des comparaisons objectives. Cependant, même en exploitant des valeurs numériques, il est parfois difficile de conclure à une identité ou à une différence de couleur. Une étude de la variabilité aléatoire du procédé est réalisée afin de préciser l'écart de valeurs à partir duquel une différence de couleur sera admise.

Un même lot de nibs est réparti en 8 échantillons. Chacun d'entre eux est alcalinisé selon les conditions standard (paragraphe I.2.2).

Tableau 1 : Coloration de 8 poudres de cacao obtenues après alcalinisation standard

	L	a	b	a/b
1	51,4	16,1	20,8	0,77
2	51,4	15,5	20,4	0,76
3	51,9	15,7	20,6	0,76
4	51,2	15,8	20,5	0,77
5	51,8	15,6	20,9	0,75
6	51,5	14,0	20,2	0,69
7	51,6	15,1	20,4	0,74
8	53,0	14,0	20,8	0,67
$\bar{x}$	51,7	15,2	20,6	0,74
s	0,56	0,81	0,24	0,038

L'intervalle de confiance pour chaque paramètre est donné par la formule suivante :

$$x - t_{\alpha} \frac{s}{\sqrt{n}} < \bar{x} < x + t_{\alpha} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

avec $\bar{x}$: moyenne des mesures
s : écart type
n : nombres de mesures (8)
t_α : valeur de t donnée par la table de Student-Fisher pour n-1 degrés de liberté et pour un seuil de confiance de α %

Pour un seuil de confiance de 95 % et 7 degrés de liberté, t = 2,365 et les intervalles pour les différents paramètres sont les suivants :

$$51,2 < L < 52,2$$

$$14,5 < a < 15,9$$

$$20,4 < b < 20,8$$

$$0,71 < a/b < 0,77$$

Lorsque les conditions d'alcalinisation ne sont pas identiques à celles utilisées pour cette détermination, ces intervalles ne sont théoriquement pas applicables mais ils permettent d'avoir une idée de l'importance des variations à prendre en compte. En particulier, il apparaît que la variation de la luminance est plus importante que celle du rapport a/b (1 point contre 0,06).

2. Paramètres d'alcalinisation

L'influence des conditions d'alcalinisation a été étudiée en considérant séparemment chaque paramètre.

Les expériences sont effectuées sur nibs de cacao fermenté. En dehors du paramètre étudié dont les valeurs sont précisées à chaque fois, les conditions utilisées sont celles établies au paragraphe I.2.2.

Immédiatement après alcalinisation, le cacao est séché à l'étuve et la détermination des couleurs se fait après préparation des échantillons comme indiqué paragraphe I.7.1.

2.1. Influence de la nature de l'agent alcalin

Industriellement, le carbonate de potassium est l'agent alcalin le plus employé. C'est également l'agent de référence au niveau de la législation. Nous l'avons choisi pour la suite de notre étude. Cependant nous avons tenu à testé quelques uns des autres agents autorisés par la législation européenne (carbonates et hydroxydes alcalins, carbonate et oxyde de magnésium et solutions ammoniacales).

Les quantités de chaque agent employé sont calculées de façon à ce qu'il y ait soit équivalence de normalité soit équivalence de pH avec la quantité de carbonate de potassium (utilisé à la concentration de 5 % par rapport au poids de matière sèche et dégraissé).

Dans les deux cas, les conclusions ne diffèrent pas (tableau 2) :

- le carbonate de potassium permet d'obtenir la teinte la plus rouge ;

- les solutions ammoniacales et le carbonate d'ammonium donnent au contraire les teintes les moins rouges, leur luminance étant légèrement plus élevée que celle obtenue avec le carbonate de potassium ;

- avec l'oxyde de magnésium, les poudres obtenues sont moins rouges mais légèrement plus foncées que celles obtenues avec le carbonate de potassium.

- le carbonate de sodium, la soude et la potasse donnent des poudres dont les luminances sont très proches de celle de la poudre "carbonate de potassium", leur aspect rouge est un peu moins intense.

Tableau 2 : Influence de la nature de l'agent alcalin sur la couleur du cacao alcalinisé (correspondance basée sur des équivalences de normalité).

Agent alcalin	L	a	b	a/b	pH
K2 CO3	51,1	16,1	21,4	0,75	8,25
MgO	47,3	11,7	18,1	0,65	8,50
Na2 CO3	52,4	15,1	21,3	0,71	7,50
Na OH	52,1	15,4	20,9	0,74	7,25
KOH	50,6	15,3	21,2	0,72	7,10
(Mg CO3)4 Mg(OH)2	53,6	14,1	21,6	0,65	8,15
NH4 CO3	52,4	14,2	21,9	0,65	6,70

2.2. Influence de la durée de traitement

Des nibs sont alcalinisés selon les conditions standard pendant 8 h. Au cours de ce traitement, des prélèvements sont effectués à intervalle de temps régulier puis sont séchés en étuve.

Au cours de l'alcalinisation, la luminance diminue linéairement et le rapport a/b augmente de façon exponentielle (figure 5, annexe 1). Aucune valeur limite n'apparaît au cours de la durée d'observation choisie.

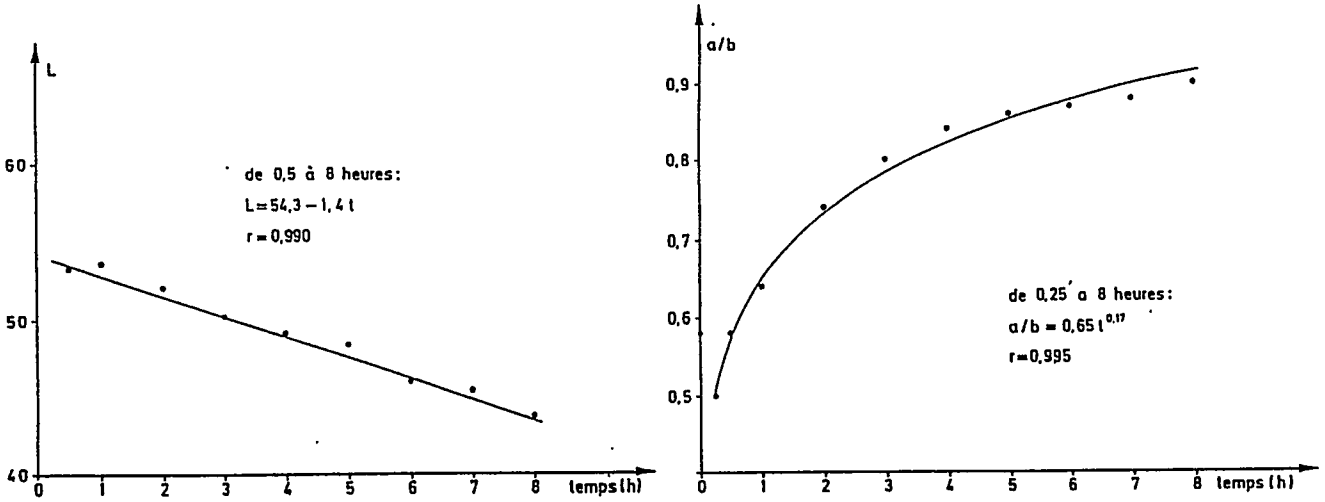


Figure 5 : Influence de la durée d'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues

2.3. Influence de la température

Des alcalinisations sont réalisées à 30, 60, 90, 120 et 150°C.

La luminance décroît linéairement quand la température d'alcalinisation augmente (figure 6,annexe 2). Cette décroissance est relativement faible : 7 points pour un écart de 120°C.

L'évolution du rapport a/b montre trois phases distinctes : augmentation, stabilisation puis diminution. Par conséquent, à partir d'une certaine température, qui dans nos conditions se situe vers 90°C, il est possible de dissocier baisse de la luminance et augmentation de a/b ce qui peut être intéressant pour obtenir des poudres sombres à composante rouge peu marquée.

Toutefois, la température ne doit pas être trop élevée car pour des conditions données, il existe une valeur limite à partir de laquelle il y a altération de la saveur. Dans nos conditions, le cacao traité à 150°C présente une flaveur désagréable.

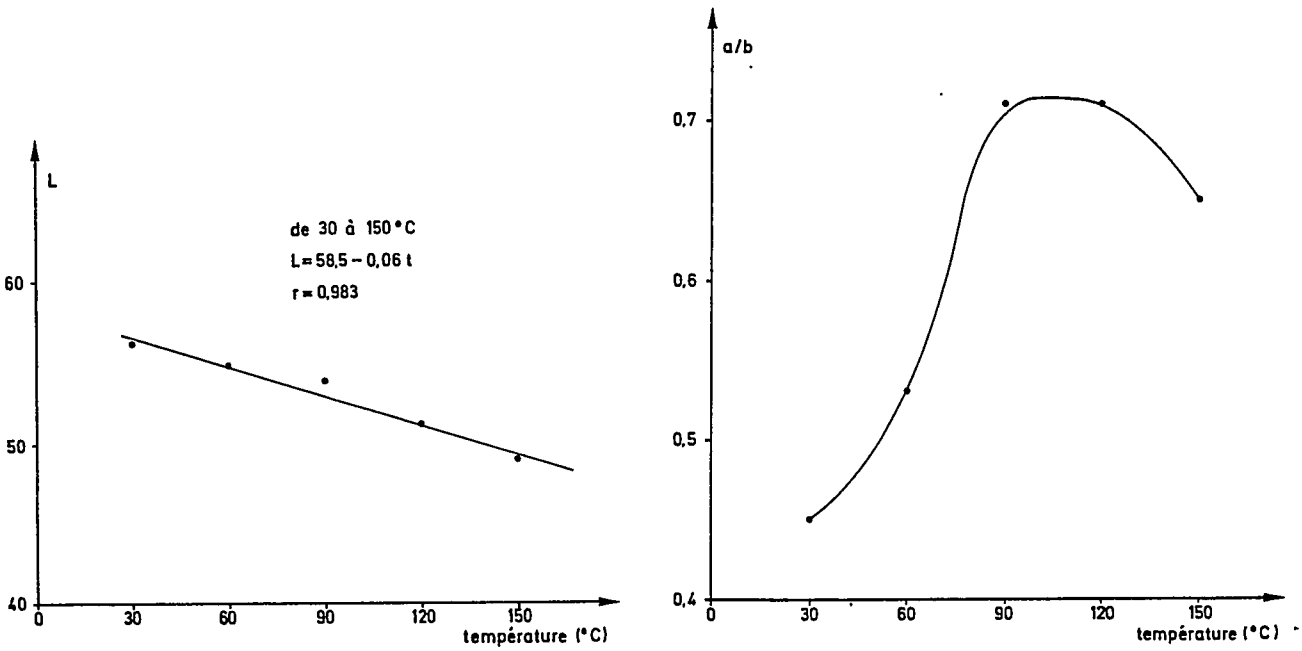


Figure 6 : Influence de la température d'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues

2.4. Influence de la quantité d'eau mise en jeu

Pour une masse constante de carbonate de potassium, les différentes quantités d'eau utilisées sont : 10, 30, 50, 80 ou 100 % d'eau par rapport à la masse de cacao.

L'augmentation du volume d'eau employé ne conduit qu'à une faible variation de L (surtout perceptible entre 10 et 50 %) par contre elle entraîne une forte augmentation de a/b (figure 7, annexe 3). C'est donc un paramètre déterminant pour l'intensité de la teinte rouge des poudres

Rq. : Les nibs de cacao peuvent absorber jusqu'à 75 % de leur poids en eau.

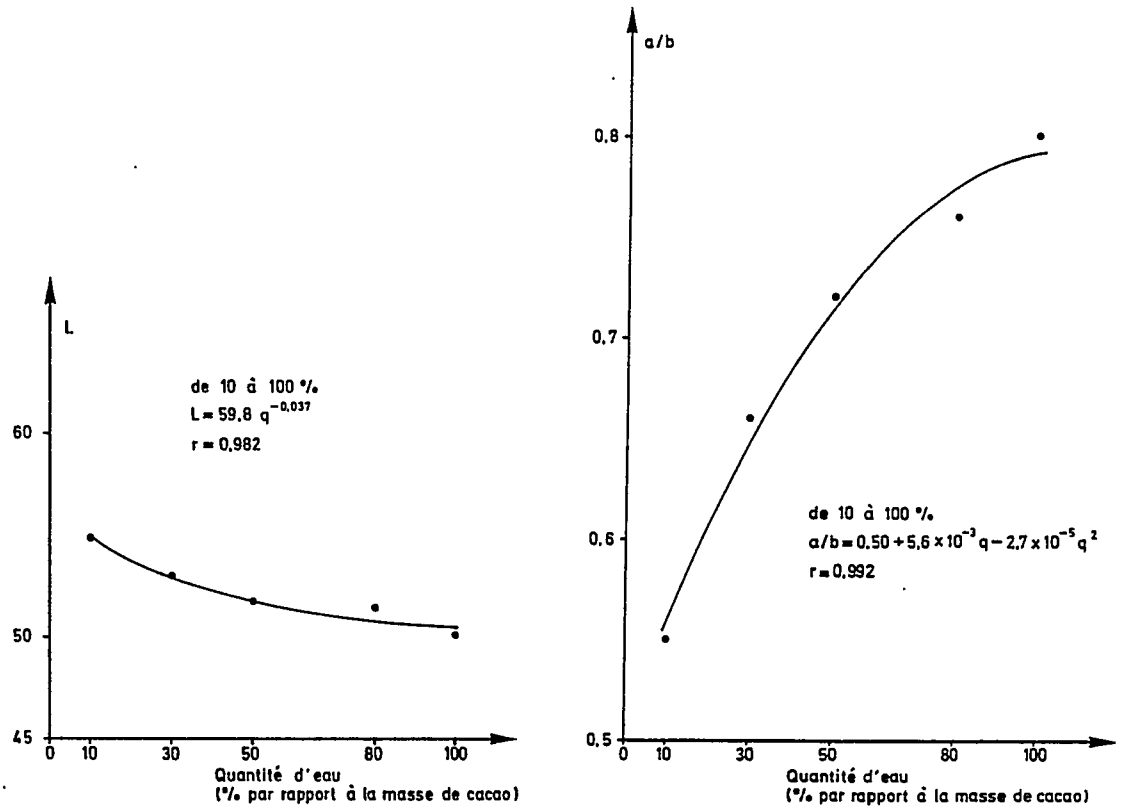


Figure 7 : Influence de la quantité d'eau utilisée lors de l'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues

2.5. Influence de la quantité d'agent alcalin

Pour une quantité d'eau constante, 5 concentrations en agent alcalin sont testées : 0, 2, 4, 6, 8 et 10 % par rapport à la masse de cacao sec et dégraissé.

Lorsque la concentration en carbonate de potassium augmente, L diminue et a/b augmente de façon linéaire (figure 8, annexe 4). Ces variations sont importantes mais il ne faut pas oublier que la législation limite à 5 % la quantité maximale utilisable.

Si le traitement des nibs est effectué uniquement avec de l'eau, la luminance diminue de 4 points alors que a/b n'évolue pas. Dans le cas d'un traitement sur nibs, le carbonate est donc indispensable au développement de la teinte rouge.

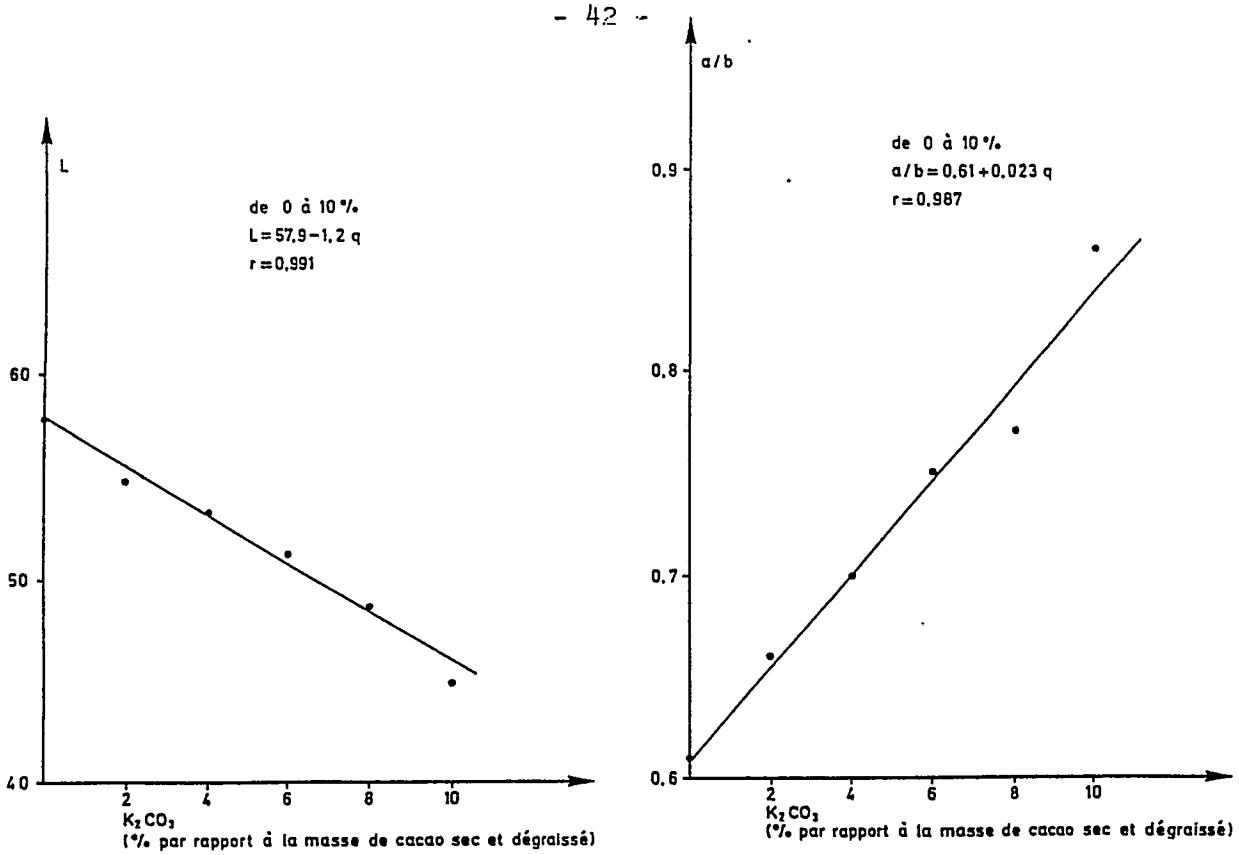


Figure 8 : Influence de la quantité de carbonate de potassium utilisé lors de l'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues

2.6. Influence de l'oxygène

Les alcalinisations sont réalisées à pression atmosphérique sous atmosphère naturelle, sous azote ou sous oxygène.

A la fin de chaque alcalinisation, la moitié des nibs est séchée à l'étuve et l'autre moitié est lyophilisée ce qui permet d'arrêter ou tout au moins de ralentir considérablement les réactions puisque ce traitement se fait à basse température et en absence d'oxygène (tableau 3).

La luminance est peu influencée par le degré d'oxygénation. Par contre, l'aspect rouge des poudres est plus sensible à ce paramètre. En effet, en absence totale d'oxygène (alcalinisation sous azote suivie d'une lyophilisation), a/b est très faible. De même, ce rapport est plus élevé dans le cas d'une alcalinisation sous oxygène que dans le cas d'un traitement sous air.

Dans les cas d'alcalinisation sous air ou sous azote, le séchage à l'étuve donne des luminances plus faibles et des a/b plus élevés que la lyophilisation. Ceci signifie donc qu'au cours du séchage en atmosphère normale la coloration s'intensifie. Par contre, lors d'un traitement sous oxygène, il semble que la couleur atteigne son intensité maximale dès la fin de l'alcalinisation puisqu'il n'y a pas de différence entre séchage en étuve et lyophilisation.

Ces résultats indiquent que des réactions d'oxydation interviennent dans le développement de la matière colorante.

Tableau 3 : Influence de la quantité d'oxygène sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation

Alcalinisation	séchage	L	a	b	a/b
Oxygène	étuve	48,0	16,9	21,1	0,80
Oxygène	lyophilisation	48,2	16,5	20,2	0,82
Azote	étuve	51,4	13,3	21,5	0,62
Azote	lyophilisation	53,5	10,8	21,2	0,51
Air	étuve	49,5	15,0	20,4	0,74
Air	lyophilisation	52,4	12,0	19,5	0,62
Cacao naturel		59,1	10,6	17,6	0,61

2.7. Influence de la pression

Des alcalinisations sont réalisées sous surpression de 0, 2, 4, 6 bars d'air ou de 4 bars d'azote. Dans ce dernier cas, l'oxygène initialement présent n'est pas éliminé.

Une surpression d'air entraîne une diminution de la luminance et une augmentation de a/b. Ces évolutions sont faibles et se stabilisent à partir de 4 bars (figure 9, annexe 5).

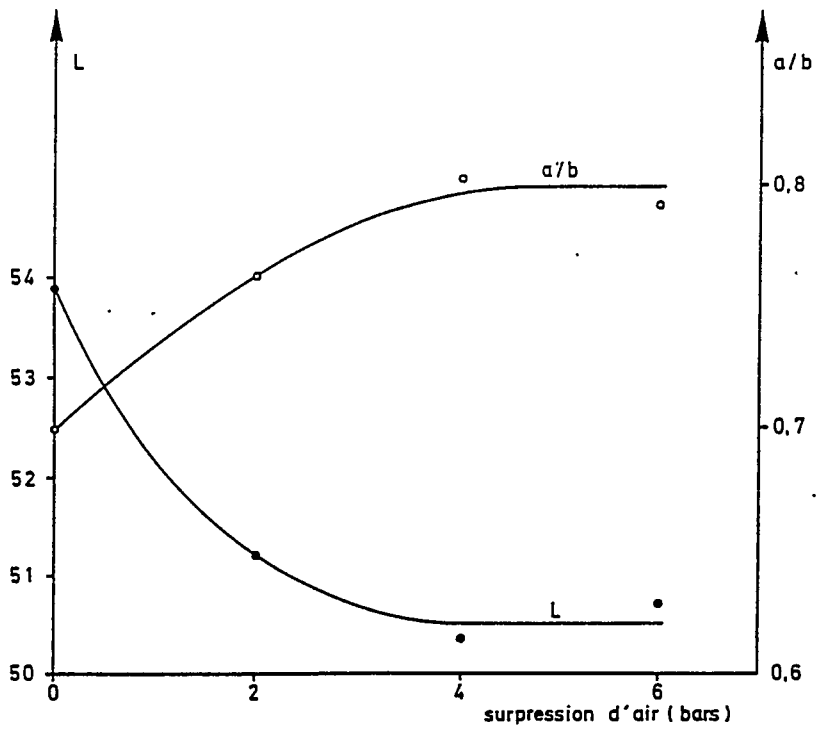


Figure 9 : Influence d'une surpression d'air appliquée lors de l'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues

Rq. : lorsque l'alcalinisation est conduite sous surpression d'air, les poudres obtenues présentent un arôme chocolaté indiscutable bien que le cacao n'ait pas été torréfié.

Ces variations ne semblent pas dues à une meilleure pénétration de la solution alcaline mais à une oxygénation supplémentaire : en effet,

lorsque l'alcalinisation est réalisée sous une surpression de 4 bars d'azote, la couleur finale obtenue est la même que lors d'une alcalinisation sous atmosphère ambiante (tableau 4).

Tableau 4 : Evolution de la couleur en fonction d'une surpression d'azote

	L	a	b	a/b
Atmosphère ambiante	53,9	14,9	21,2	0,70
4 bars-azote	53,5	15,0	21,7	0,69

2.8. Influence du pH initial du cacao

2.8.1 Alcalinisation de cacaos de pH différents

5 cacaos de différentes origines (CAMEROUN, BAHIA, COTE D'IVOIRE, MALAISIE et SUMATRA) sont alcalinisés selon les conditions standard. Les pH, la luminance et le rapport a/b des cacaos avant et après alcalinisation sont déterminés.

La luminance est une fonction linéaire du pH. Ce résultat s'applique aussi bien pour les poudres naturelles que pour les poudres alcalinisées :

$L = 86,8 - 4,25\ pH$ (figure 10, annexe 6)
$r = 0,98$ (significatif au seuil de 1 %)

Il existe également une relation linéaire entre le pH après alcalinisation et le pH initial :

$pH(alc.) = 2,29 + 1,04\ pH(init.)$ (figure 11, annexe 6)
$r = 0,97$ (significatif au seuil de 1 %)

A partir de ces deux équations, il est possible d'estimer la valeur de la luminance après alcalinisation connaissant le pH initial.

Rq. : Les valeurs des constantes de ces équations dépendent des conditions d'alcalinisation et des méthodes de détermination de pH et de couleur.

Aucune relation simple n'existe entre pH et rapport a/b.

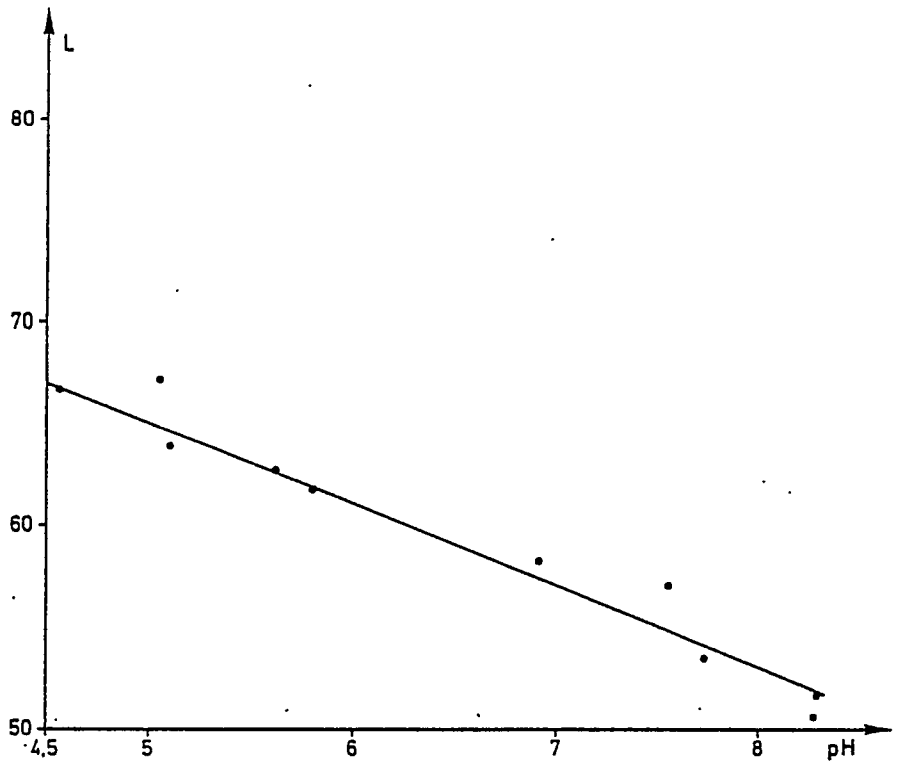


Figure 10 : Luminance des poudres de cacao en fonction de leur pH

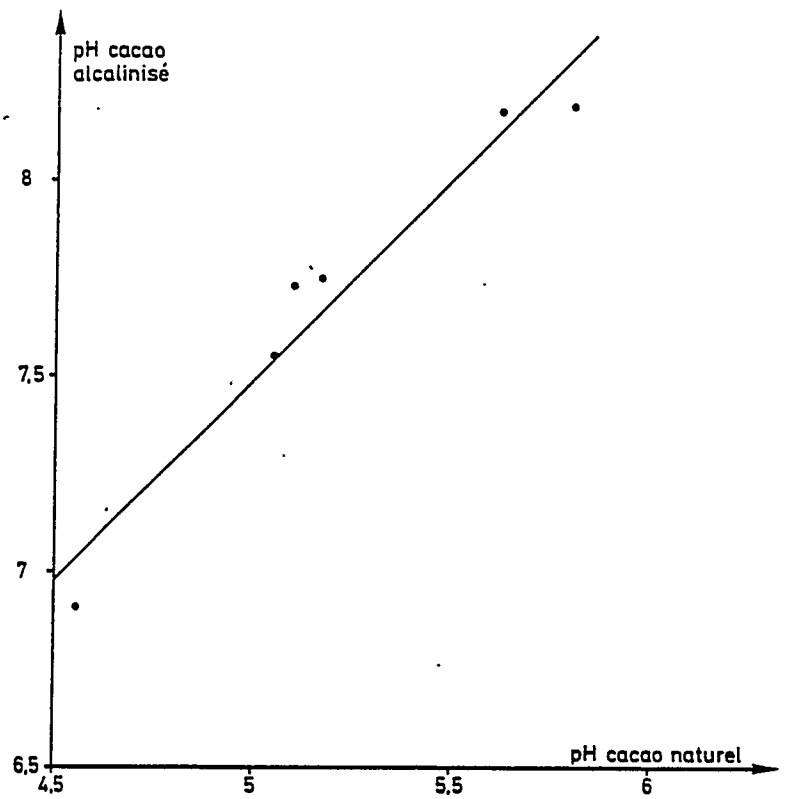


Figure 11 : pH des poudres de cacao alcalinisé en fonction du pH avant alcalinisation

2.8.2 Relation entre pH et luminance de poudres commerciales

Pour confirmer nos propres observations, nous avons étudié la relation existant entre pH et luminance pour 21 poudres du commerce. La détermination des valeurs de ces deux paramètres a été effectuée par le fabricant.

Comme précédemment, une relation linéaire est mise en évidence :

$L = 81,4 - 4,8\ pH$
$r = 0,92$ (significatif au seuil de 1 %)

2.8.3 Essai de désacidification

Des essais de désacidification préalable des nibs (technique mise au point par l'IRCC) sont menés dans le but d'augmenter le pH initial des nibs et de ce fait d'intensifier la couleur développée à l'alcalinisation.

Après détermination des acidités libres avant et après désacidification d'un cacao naturel, la quantité de carbonate de potassium nécessaire à la neutralisation de la différence d'acidité est calculée :

Acidité libre du cacao naturel - acidité libre du cacao désacidifié = V ml de soude 0,1 N/g de cacao

$$\text{Quantité de carbonate de potassium correspondante} = \frac{0,1 \times 138 \times V}{1000 \times 2}\ \text{g/g de cacao} = P\ g$$

Des alcalinisations selon les conditions standard sont ensuite conduites :

- sur le cacao naturel et sur le cacao désacidifié avec une quantité habituelle X g de carbonate de potassium ;
- sur le cacao naturel avec X+P g de carbonate ;
- sur le cacao désacidifié avec X-P g de carbonate.

La désacidification préalable conduit à une intensification de la couleur développée au cours de l'alcalinisation : diminution de la luminance de 4,3 points et augmentation du rapport a/b de 0,11 points.

Même lorsque l'alcalinisation du cacao désacidifié est conduite avec X-P g de carbonate, la couleur obtenue est plus foncée que la couleur du cacao naturel alcalinisé selon les conditions standard.
P a peut être été sous évalué (bien que le cacao naturel alcalinisé avec X+P g présente une couleur identique à celle du désacidifié alcalinisé avec X g).

Ces résultats permettent d'envisager :

- soit l'obtention de poudres identiques aux poudres habituelles en ce qui concerne couleur et pH final mais en utilisant une quantité de carbonate moindre.

- soit l'obtention de poudres plus colorées en utilisant une quantité "classique" de carbonate.

Tableau 5 : influence de la désacidification sur la couleur finale des poudres alcalinisées

	L	a	b	a/b	pH	acidité libre(*)
Cacao naturel	59,3	10,4	17,3	0,60	5,80	1,71
Cacao désacidifié	57,0	11,3	17,0	0,66	6,03	1,37
Naturel alcalinisé avec X g de carbonate	52,1	14,6	20,5	0,71	8,08	0,22
Désacidifié alcalinisé avec X g de carbonate	47,8	16,2	19,7	0,82	8,25	0,10
Alcalinisé avec X+P g de carbonate	46,5	15,7	19,2	0,82	8,30	0,00
désacidifié alcalinisé avec X-P g de carbonate	48,7	16,0	21,0	0,76	7,74	0,32

(*) : l'acidité libre est exprimée en ml de soude 0,1 N/g de cacao
X = 2,3 g / 100 g de nibs, P = 0,235 g / 100 g de cacao

2.9. Etat du cacao

2.9.1 Influence de la torréfaction

Les couleurs des poudres obtenues après alcalinisation de nibs torréfiés ou après torréfaction de nibs alcalinisés sont comparées.

La torréfaction entraîne une diminution de la teinte rouge et n'a pas d'effet sur la luminance.

Que la torréfaction soit réalisée avant ou après alcalinisation, les couleurs obtenues sont comparables.

Tableau 6 : Influence de la torréfaction sur la coloration d'un cacao alcalinisé

	L	a	b	a/b
Alcalinisé	50,1	15,8	20,8	0,76
Alcalinisé puis torréfié	51,5	16,5	24,8	0,66
Torréfié puis alcalinisé	50,0	14,9	21,8	0,68

2.9.2 Etat de division du cacao

Des alcalinisations sont conduites sur nibs, masse (cacao broyé) ou sur tourteau (masse partiellement dégraissée par pression) torréfiés. Cependant, pour que la technique d'homogénéisation soit adaptée à l'état

du cacao, les nibs sont traités dans le réacteur en verre (agitation verticale), la masse et le tourteau sont alcalinisés dans une conche horizontale.

Un essai d'alcalinisation de masse non torréfiée est également conduit en présence et en absence de lécithine (0,5 % de la masse de cacao), toutes autres conditions étant identiques, afin de déterminer si l'emploi d'un émulsifiant améliore la diffusion de la solution alcaline au sein de la phase lipidique.

Lorsque l'alcalinisation est réalisée sur la masse et à fortiori sur tourteau, la couleur développée est nettement plus foncée que lorsque le traitement a lieu sur nibs.

La structure compacte des grains et leur teneur élevée en matière grasse, deux facteurs rendant difficile la diffusion de l'eau au sein des nibs, peuvent expliquer ce phénomène. De plus, une partie de l'agent alcalin est probablement perdu par saponification de la matière grasse ou neutralisation des acides gras libres.

Dans le cas de l'alcalinisation de la masse non torréfiée, la présence de lécithine n'induit pas de modification supplémentaire de couleur.

Tableau 7 : Influence de l'état du cacao sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation

	L	a	b	a/b
Cacao naturel torréfié	58,0	13,0	24,5	0,53
Torréfié alc. sur nibs	50,6	15,3	23,5	0,65
Torréfié alc. sur masse	43,2	14,1	23,4	0,60
Torréfié alc. sur tourteau	42,2	14,1	18,9	0,75
Non torréfié alc. sur masse (sans lécithine)	45,5	14,3	21,2	0,67
Non torréfié alc. sur masse (avec lécithine)	45,2	14,5	22,2	0,65

L'alcalinisation sur nibs reste la technique la plus appréciée par les industriels car elle donne les poudres présentant les flaveurs les plus agréables. Des essais d'amélioration de la diffusion de la solution alcaline au sein des nibs ont été menés afin d'intensifier le développement de la coloration lors d'une alcalinisation dans les conditions classiques.

Rq. : Certains essais enzymatiques traités au paragraphe 3.2 et les essais d'alcalinisation sous surpression peuvent être rangés dans cette catégorie.

a) Essai d'infiltration de la solution alcaline au sein des nibs

Un vide partiel est créé au niveau du grain puis la solution alcaline est introduite de façon à ce qu'il y ait aspiration brutale du liquide dans les pores des nibs (paragraphe I.2.3.1).

Deux essais sont comparés à un témoin alcalinisé sans vide préalable.

Cette technique ne permet pas d'intensifier la couleur finale obtenue : les poudres essais ne sont pas plus foncées que la poudre témoin, par contre leur aspect rouge est moins marqué. Ceci peut s'expliquer par une oxygénation moindre due au vide de départ.

Tableau 8 : Alcalinisation après infiltration de la solution alcaline dans les nibs

	L	a	b	a/b
témoin	46,1	12,9	19,1	0,67
essai 1	48,3	11,7	18,7	0,62
essai 2	46,5	11,6	18,7	0,62

b) utilisation d'un savon (préparé à partir de beurre de cacao et de carbonate de potassium).

L'utilisation d'un savon a été envisagée dans le but d'émulsionner la matière grasse et donc faciliter la pénétration de l'eau à l'intérieur des nibs. L'emploi de beurre de cacao et de carbonate de potassium pour la préparation de ce savon permet de ne faire appel à aucun produit inhabituel dans la technologie du cacao.

Deux quantités différentes de beurre sont testées. La plus élevée (essai 1), correspond à la quantité minimale nécessaire à la consommation de tout le carbonate (évaluée d'après le poids moléculaire moyen des triglycérides). La quantité utilisée pour l'essai 2 correspond au 1/3 de cette valeur.

Par rapport à une alcalinisation classique, ce traitement ne conduit pas à une modification de la luminance des cacaos. Seule la teinte rouge des cacaos traités par le savon, est un peu plus faible. Par conséquent, ce procédé n'améliore pas l'efficacité de la solution alcaline

Tableau 9 : Couleur de cacaos traités par du carbonate de potassium, un savon ou un mélange carbonate de potassium/savon

	L	a	b	a/b
Témoin	49,2	15,6	23,7	0,66
Traitement au savon (essai 1)	50,3	15,1	24,5	0,62
Traitement au K_2CO_3 + savon (essai 2)	49,8	14,8	25,1	0,59

3. Paramètres de séchage

3.1 Evolution de la couleur au cours du séchage

Après une alcalinisation effectuée sur nibs fermentés selon les conditions standard mais avec 70 % d'eau (au lieu de 50 %), des

prélèvements sont effectués tout au long d'un séchage en étuve à 80°C. Chaque prélèvement est immédiatement lyophilisé puis les couleurs sont déterminées. L'humidité avant lyophilisation est également déterminée.

Au cours de la phase de séchage, la coloration rouge développée durant l'alcalinisation continue de s'intensifier mais la luminance reste constante.

Ce résultat confirme ce qui était apparu lors de l'étude de l'influence de l'oxygène : un cacao lyophilisé immédiatement après alcalinisation a une couleur moins intense qu'un cacao séché à l'étuve.

Tableau 10 : Evolution de la couleur d'un cacao alcalinisé au cours du séchage suivant l'étape d'alcalinisation

Durée de séchage	humidité	L	a	b	a/b
Cacao naturel					
0 h	39,4	52,5	13 3	20,9	0,64
0 h 30	32,7	51,4	14,3	20,1	0,71
0 h 45	26,7	51,6	14,7	19,9	0,74
1 h	23,2	51,1	15,3	19,9	0,77
1 h 15	15,9	51,7	15,2	19,7	0,77
1 h 30	11,5	51,8	15,0	20,2	0,74
2 h 25	3,4	51,7	15,5	20,4	0,76
3 h 25	1,1	51,9	15,7	20,6	0,76

3.2. Influence de la température de séchage

Après alcalinisation selon les conditions standard les nibs sont divisés en 5 lots homogènes et séchés à l'étuve à 5 températures différentes : 25 à 130°C.

La température de séchage n'apparaît pas comme un facteur important pour la couleur car aucune différence fondamentale de teinte n'est constatée entre les différents essais.

Tableau 11 : Influence de la température de séchage sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation

Température de séchage	L	a	b	a/b
25°C	52,1	13,4	24,1	0,56
40°C	51,9	14,6	25,0	0,58
60°C	52,9	13,8	25,2	0,55
80°C	52,8	13,9	25,7	0,54
130°C	51,9	14,8	26,9	0,55

4. Essais enzymatiques

Le traitement enzymatique du cacao n'est pas actuellement autorisé par la législation française. Cependant, il est considéré par quelques industriels comme un traitement d'avenir.

L'utilisation d'enzymes dans le but d'intensifier la couleur des poudres peut être envisagée de différentes façons :

- soit en remplacement d'une alcalinisation et dans ce cas il faut faire appel à des enzymes responsables de modifications de couleur comme par exemple les polyphénoloxydases ;
- soit avant alcalinisation, les enzymes sont alors destinées à favoriser l'action de l'agent alcalin.

Il faut cependant signaler que le cacao contient des substances connues pour être des inhibiteurs d'enzymes. En effet, certains composés phénoliques présentent des propriétés tanantes (formation de complexe avec les protéines, essentiellement par création de liaison hydrogène). De plus, en milieu oxydant les phénols donnent des quinones qui peuvent se lier aux protéines par des liaisons covalentes.

4.1 Utilisation d'enzymes en remplacement de l'agent alcalin

Dans ce cadre, nous avons testé une polyphénoloxydase (PPO).

Cette enzyme est largement répandue dans le règne végétal. Son rôle est d'oxyder les mono et les ortho diphénols en orthodiquinones (MAYER 1980). La transformation en quinones est suivie de réactions de couplage oxydatif avec des constituants polyphénoliques et aminés ainsi qu'avec des thiols. Ces réactions sont à l'origine de pigments responsables du brunissement enzymatique de divers fruits et légumes (METCHE 1986).

La plupart des composés polyphénoliques du cacao présentent des fonctions phénols en position ortho, ils sont donc susceptibles de servir de substrat à une PPO exogène.

Rq. : Une activité PPO est présente dans le cacao non fermenté mais VILLENEUVE et al.(1982) ont montré que celle-ci diminue considérablement au cours de la fermentation.

Un essai préalable de traitement d'une solution d'épicatéchol ou d'un extrait de procyanidols de cacao par une tyrosinase montre que ces phénols conduisent à la formation de composés brun jaune sous l'action de cette enzyme.

Deux essais sont effectués :

essai 1 : Action d'une PPO sur nibs
essai 2 : Action d'une PPO sur cacao broyé délipidé et dans les conditions optimales d'activité enzymatique.

Dans les deux cas, aucune intensification de couleur n'est observée.

Tableau 12 : Influence du traitement par une PPO d'un cacao fermenté sur sa couleur.

	ESSAI 1				ESSAI 2			
	L	a	b	a/b	L	a	b	a/b
Témoin	60,0	10,6	19,1	0,55	43,8	13,2	21,5	0,61
Essai	59,9	10,6	19,4	0,55	44,2	13,1	21,4	0,61

L'absence de modification de couleur s'explique vraisemblablement par une inhibition des protéines enzymatiques comme nous l'avons signalé préalablement.

4.2 Utilisation d'enzymes favorisant l'action de l'agent alcalin

Les enzymes utilisées avant alcalinisation sont choisies dans le but de fragiliser la structure du grain afin de permettre une meilleure diffusion de la solution alcaline et par conséquent d'améliorer le contact entre précurseurs de la couleur et carbonate de potassium.

4.2.1 Cellulase

Les conditions de cet essai ne permettent pas de dire si l'activité cellulasique s'est développée ou non quoiqu'il en soit la couleur n'est pas modifiée par l'utilisation de cette enzyme.

Tableau 13 : Influence d'un traitement par une cellulase avant alcalinisation sur la couleur d'un cacao alcalinisé.

	L	a	b	a/b
Témoin	49,3	17,9	21,6	0,83
Essai	49,9	18,3	22,5	0,81

4.2.2 α amylase

Dans la fève de cacao, l'amidon est un constituant relativement important (entre 4,5 et 7 % de la masse totale selon SCHMIEDER et KEENEY 1980).

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon aboutit à la libération de glucose et de maltose. Un dosage de ces sucres (méthode enzymatique) sur les cacaos avant et après traitement par l'amylase permet de déterminer si cette enzyme a été efficace.

Traitement sur nibs

La teneur en glucose de l'échantillon n'augmente pas après traitement : l'amylase n'a pas agit et en effet aucune différence de couleur n'est observée entre le témoin et l'essai.

Tableau 14 : Influence d'un traitement par une amylase avant alcalinisation sur la couleur d'un cacao

	L	a	b	a/b
Témoin	53,5	14,4	22,6	0,64
Essai	53,2	14,4	22,2	0,65

La non activité de l'amylase sur le cacao entier peut être due à une mauvaise pénétration de l'amylase au sein des nibs ou à une inhibition du fait des tanins.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de faire agir l'amylase sur un cacao broyé délipidé après extraction des phénols solubles.

Traitement sur cacao broyé délipidé déphénolé ou non

Efficacité de l'amylase :

Alors que sur nibs, l'amylase s'est révélée inefficace, sur cacao délipidé et pulvérulent nous constatons après traitement enzymatique une augmentation des teneurs en maltose (non dosable sur le cacao naturel) et en glucose. L'amidon au sein des grains n'est donc pas accessible à l'enzyme. D'autre part, l'activité de l'amylase est nettement plus forte après élimination des phénols (la quantité de sucres libérés est plus importante) ce qui confirme l'hypothèse de l'inhibition de l'enzyme par les tanins.

Tableau 15 : Teneurs en maltose et en glucose exprimées en g pour 100 g de poudre délipidée

	Maltose	glucose
Cacao naturel		0,2
Cacao traité amylase	1,0	0,57
Cacao déphénolé, traité amylase	4,5	1,8

Rôle de l'amidon

L'hydrolyse partielle de l'amidon n'améliore pas l'efficacité de la solution alcaline (tableau 16). Au contraire, le cacao traité préalablement par l'amylase puis alcalinisé présentent une luminance plus forte et un a/b plus faible que le cacao alcalinisé sans traitement enzymatique. Cette différence est encore plus marquée lorsque le cacao est préalablement "déphénolé". Ces résultats seront repris dans le chapitre "recherche des précurseurs de la couleur".

Tableau 16 : Modifications de couleur observées après alcalinisation avec ou non hydrolyse préalable de l'amidon par traitement enzymatique

	L	a/b
cacao naturel	59,6	0,59
cacao alcalinisé	45,6	0,66
cacao traité amylase	49,7	0,56
cacao traité amylase, alcalinisé	47,1	0,59
cacao déphénolé	62,3	0,48
cacao déphénolé alcalinisé	35,0	0,80
cacao déphénolé traité amylase	60,1	0,50
cacao déphénolé traité amylase, alcalinisé	43,6	0,59

4.2.3 Utilisation de levures (Saccharomyces cerevisiae)

F. PERRY (1965) fait référence à un traitement du cacao par de la levure de boulangerie, ce traitement étant destiné à "ouvrir les parois

cellulaires". Bien qu'aucune précision sur la couleur finale obtenue ne soit mentionnée dans cet article, nous avons tenu à essayer ce procédé.

Un prétraitement des nibs par Saccharomyces cerevisiae (I.5.2.) n'améliore pas l'efficacité du carbonate de potassium.

Tableau 17 : Influence d'un traitement par Saccharomyces cerevisiae (S.c.) avant alcalinisation sur la couleur d'un cacao

	L	a	b	a/b
Cacao alcalinisé	50,7	14,7	24,5	0,60
Cacao traité par S.c.	57,3	11,5	24,4	0,47
Cacao traité par S.c.,alcalinisé	52,5	13,8	24,7	0,56

4.3 Traitement enzymatique après alcalinisation

La non activité de la PPO sur le cacao pouvant être due à l'inhibition des protéines enzymatiques par les tanins, nous faisons agir la PPO sur un cacao déjà alcalinisé (I.5.3) car une alcalinisation entraîne une forte diminution de la teneur en tanins (rapportée par CHAVAN et al. 1979 lors de travaux sur les tanins du sorgho).

Aucune différence n'est observée entre essai et témoin. Les tanins résiduels suffisent à empêcher l'action de la PPO.

Tableau 18 : Influence du traitement par une polyphénoloxydase d'un cacao déjà alcalinisé sur sa couleur

	L	a	b	a/b
Cacao témoin	51,2	16,8	23,2	0,72
Cacao essai	51,1	18,2	25,0	0,73

5. Conclusion

De façon générale, l'augmentation de la durée, de la température, des quantités d'eau ou d'agent alcalin, de l'oxygénation, de la pression d'air et du pH initial du cacao permet d'obtenir des teintes plus foncées et plus rouges mais à des degrés différents selon le paramètre considéré.

Dans le cas d'une alcalinisation sur nibs, ce sont les variations de la durée de traitement ou de la quantité de carbonate qui donnent les variations de couleur les plus importantes mais les impératifs industriels (rentabilité et productivité) et la législation limitent les valeurs pouvant être prises par ces paramètres.

La température est le seul paramètre qui permette de dissocier un brunissement des poudres (baisse de la luminance) et une intensification de leur aspect rouge (augmentation de a/b).

L'intensité de la teinte rouge est liée au degré d'oxygénation. En effet, chaque fois que celui-ci est augmenté, c'est surtout l'aspect rouge qui s'intensifie. C'est ce qui a été observé dans le cas :

- de l'augmentation de la quantité d'eau mise en oeuvre (apportant une quantité non négligeable d'oxygène dissous)
- de la modification de la nature de l'atmosphère (alcalinisation sous oxygène)
- de l'élévation de la pression d'air (l'utilisation d'une surpression d'air aboutit à une supplémentation en oxygène)

Cette observation confirme certaines affimations rencontrées dans la littérature : amélioration de la teinte rouge par utilisation d'une surpression (Brevet WISSGOTT 1986) ou par alcalinisation sous un courant d'air (MARTIN 1987).

Les hydroxydes de potassium et de sodium et le carbonate de sodium donnent des résultats très peu différents de ceux obtenus avec le carbonate de potassium, agent le plus utilisé au niveau industriel. Seul, l'oxyde de magnésium permet l'obtention de poudres plus sombres.

La neutralisation d'une partie du carbonate de potassium par l'acidité naturelle du cacao diminue l'efficacité du traitement alcalin. En effet, une désacidification préalable du cacao intensifie la couleur développée au cours de l'alcalinisation.

La couleur développée pendant la phase d'alcalinisation n'est pas détruite au cours de la phase de séchage. Au contraire l'aspect rouge continue d'évoluer tant qu'il reste de l'eau. Par contre, la torréfaction est responsable d'un jaunissement de la teinte. Cependant, il semble que cette diminution du rouge ne soit pas due à une altération de la couleur développée au cours de l'alcalinisation puisque le moment de la torréfaction (avant ou après alcalinisation) n'a pas d'influence sur la couleur finale (phénomène en accord avec les observations de SCHENKEL).

La structure compacte des nibs et surtout la présence d'une grande quantité de matière grasse semble empécher un développement maximal de la couleur : lorsque l'alcalinisation est conduite sur tourteau, la couleur obtenue est nettement plus foncée et plus rouge. Ce mode de traitement semble être le seul qui aboutisse à des teintes beaucoup plus intenses que les teintes habituelles. Tous les essais d'amélioration de la pénétration de la solution alcaline au sein des nibs (pression de gaz neutre, infiltration de la solution par dépression préalable, utilisation d'émulsifiants, augmentation de la perméabilité des nibs par traitement enzymatique) n'ont en effet, pas réussi à intensifier le développement de la couleur.

La présence dans le cacao de composés présentant des propriétés tannantes rend inefficace l'utilisation de procédés enzymatiques.

CHAPITRE III

CARACTERISATION DE LA MATIERE COLORANTE DEVELOPPEE AU COURS DE L'ALCALINISATION

III. CARACTERISATION DE LA MATIERE COLORANTE DEVELOPPEE AU COURS DE L'ALCALINISATION

Les résultats préalablement exposés ne concernaient que l'influence des paramètres de traitement sur la couleur finale des poudres. Afin d'essayer de préciser la nature des mécanismes chimiques conduisant à cette coloration, nous donnerons dans ce chapitre les résultats de l'indentification des précurseurs de la matière colorante.

1. Distinction entre matière colorante soluble et matière colorante insoluble

1.1 Matière colorante soluble (MCS)

Des précédents travaux (BIANCHI 1987) ont montré qu'au cours de l'alcalinisation, se forment des composés colorés uniquement extractibles par l'eau, le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde, et seulement à chaud dans le cas de ces deux derniers solvants (figure 12).

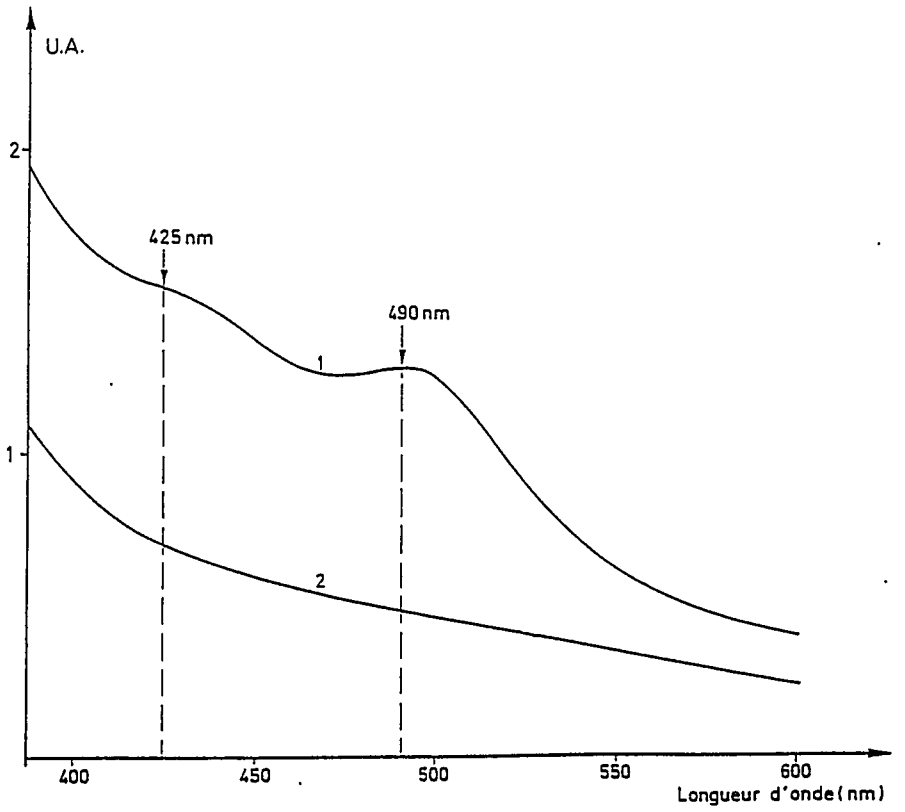


Figure 12 : Spectres d'absorption en lumière visible :

1 : d'un extrait aqueux de cacao fermenté alcalinisé
2 : d'un extrait aqueux de cacao fermenté
(Conditions d'extraction : 0,5 g de poudre délipidée / 25 ml d'eau / 10 min.)

Pour apprécier et surtout comparer la matière colorante soluble (MCS) de différentes poudres, un protocole d'extraction et d'évaluation de l'intensité de la coloration a été établi (I.7.2) : l'intensité de la coloration de la MCS étant liée au pH (BIANCHI 1987) , le cacao broyé puis délipidé est extrait par un tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 7. La MCS est exprimée de façon arbitraire par l'absorbance à 500 nm de l'extrait obtenu. A cette longueur d'onde, un cacao non alcalinisé présente une absorption nettement plus faible.

1.2 Matière colorante insoluble (MCI)

Si une poudre d'un cacao alcalinisé (2) (sur nibs selon les conditions standards) est épuisée en MCS par de l'eau, puis lyophilisée, la poudre résultante (4) reste plus sombre que la poudre de cacao non alcalinisé (1). L'extraction, dans des conditions identiques, d'une poudre naturelle permet de vérifier qu'aucune couleur ne se développe au cours de cette opération (3). Par conséquent, la couleur restant après extraction de la MCS de la poudre alcalinisée correspond effectivement à une matière colorante non extractible développée pendant la phase d'alcalinisation (tableau 19).

Tableau 19 : Mise en évidence d'une matière colorante insoluble

	L	a	b	a/b
1 Cacao naturel	58,5	11,4	17,4	0,65
2 Cacao alcalinisé	54,0	15,2	20,9	0,73
3 Cacao naturel extrait à l'eau	62,5	11,0	19,6	0,56
4 Cacao alcalinisé extrait à l'eau	51,7	13,2	19,9	0,66

D'autres résultats confirmeront l'existence de cette matière colorante insoluble :

- dans le cas d'un cacao non fermenté, si les précurseurs de la MCS sont préalablement éliminés, la couleur globale s'intensifie de façon importante au cours de l'alcalinisation, alors qu'aucune MCS ne se développe (III 3.1.2.1).

- si un cacao pulvérulent délipidé est humidifié puis séché à l'étuve, sa couleur globale s'intensifie mais aucune augmentation de MCS n'est observée (III 2.1).

2. Conditions de développement de ces différentes couleurs

2.1 Matière colorante soluble

* La MCS ne se développe qu'en présence d'un agent alcalin. En effet, si un cacao fermenté pulvérulent délipidé est traité à chaud (95°C, 1 h 45) par de l'eau (70 ml pour 30 g de poudre) puis est séché à l'étuve aucun développement de MCS ne se produit. Par contre, si le traitement a lieu exactement dans les mêmes conditions mais en présence de carbonate de potassium (2,3 % par rapport à la masse de cacao), la MCS augmente de façon nette (tableau 20).

Tableau 20 : Influence de la présence de l'agent alcalin sur le développement de la MCS (exprimée en unité d'absorbance à 500 nm)

	MCS	L	a	b	a/b
Cacao traité à l'eau	0,35	48,7	11,4	17,8	0,64
Cacao alcalinisé	0,65	45,0	12,0	18,5	0,65
Cacao non traité	0,39	61,5	10,3	17,7	0,58

* En présence d'un agent alcalin (2,3 % par rapport à la masse de cacao), la MCS se développe plus intensemment lorsque le traitement (1 h 30, 90°C) est effectué sur poudre plutôt que sur masse (tableau 21).

Tableau 21 : Développement de la MCS (exprimée en unité d'absorbance à 500 nm) au cours d'une alcalinisation selon les conditions standard, sur nibs, sur masse ou sur poudre délipidée

	MCS	L	a	b	a/b
Alcal. sur nibs	1,23	52,1	14,9	20,8	0,72
Alcal. sur poudre	1,56	51,4	17,0	22,6	0,75
Alcal.sur poudre délipidée	1,45	42,6	13,6	18,4	0,74
Cacao non traité	0,73	61,7	10,0	16,1	0,62

2.2 La matière colorante insoluble

* La présence d'un agent alcalin n'est pas indispensable au développement de la MCI : un traitement uniquement à l'eau conduit à un net développement de couleur.

* Cependant, certaines conditions sont nécessaires :

a) le cacao doit être sous forme pulvérulente et délipidée (tout au moins partiellement) :

si des nibs ou de la masse sont traités à chaud (1 h 30, 90°C) par de l'eau puis sont séchés à l'étuve, la luminance ne diminue que de 4 points et a/b ne varie pratiquement pas. Par contre, lorsqu'un traitement identique a lieu sur une poudre de cacao délipidée, la diminution de la luminance est de 14 points (tableau 22).

Tableau 22 : Influence du broyage et de la délipidation sur le développement de la couleur insoluble au cours d'un traitement hydrothermique

Traitement sur :	L	a	b	a/b	MCS(*)
Nibs	56,3	12,1	19,2	0,63	0,45
Masse	57,9	11,2	19,1	0,59	0,54
Poudre délipidée	47,6	12,3	18,0	0,68	0,47
Cacao non traité	61,7	10,0	16,1	0,62	0,73

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

Rq. : Il s'agit bien d'un développement de MCI puisqu'aucune augmentation de MCS n'est constatée.

b) l'humidité au cours du traitement doit être inférieure à une certaine valeur :

lorsqu'un cacao fermenté pulvérulent délipidé est humidifé (70 ml pour 30 g de poudre) puis chauffé dans un ballon bouché (1 h 45, 95°C), aucune couleur ne se développe si une lyophilisation suit ce traitement. Par contre, si le séchage a lieu en étuve, la poudre finale présente une couleur insoluble très nette. Vraisemblablement, la MCI ne se développe qu'à partir d'une certaine humidité. L'étude de ce phénomène sera repris au paragraphe III 4.1.1.

Tableau 23 : Influence du mode de séchage post traitement hydrothermique sur le développement de la couleur insoluble

Traitement sur :	L	a	b	a/b	MCS(*)
Poudre délipidée / Lyophilisation	61,2	10,3	17,5	0,59	0,32
Poudre délipidée / Séchage en étuve	48,7	11,4	17,8	0,64	0,35
Cacao non traité	61,5	10,3	17,7	0,58	0,39

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

2.3 Dualité du développement des deux matières colorantes

Selon les conditions de traitement utilisées, l'une ou l'autre des deux types de couleur se développera préférentiellement :

- dans le cas d'un traitement sur nibs :
  * en absence d'agent alcalin : il n'y a pratiquement pas de modification de couleur
  * en présence d'agent alcalin : les deux couleurs se forment mais la MCI est primordiale (tableau 19)

- dans le cas d'un traitement sur poudre :
  * en absence d'agent alcalin : seule la MCI se développe (tableau 20)
  * en présence d'agent alcalin : la MCS se développe principalement. En effet, si la totalité de la MCS d'une poudre délipidée alcalinisée (35 % d'humidité, 2,3 % de carbonate de potassium, 3 h, 60°C) est extraite, la poudre résiduelle est à peine plus foncée que le cacao de départ (tableau 24). Le développement de la MCI n'a donc pas été très important alors que le traitement dans les mêmes conditions mais sans agent alcalin d'une poudre délipidée conduit à un développement de MCI uniquement.

Tableau 24 : Développement de la MCI après traitement d'une poudre délipidée en présence ou non d'un agent alcalin

	L	a	b	a/b
Cacao naturel	56,9	11,1	16,6	0,67
Traitement hydrothermique	41,1	15,7	21,1	0,74
Alcalinisation	38,5	17,5	23,4	0,75
Alcalinisation moins MCS	53,0	14,3	22,9	0,62

Il découle de ces résultats que la présence d'un agent alcalin est indispensable au développement de la MCS mais pas à celui de la MCI (dans le cas où le cacao est broyé et délipidé).
Indépendemment de son rôle dans le développement de la MCS, il interviendrait également en tant qu'agent mouillant en favorisant la pénétration de la solution jusqu'au niveau des précurseurs de la couleur puisqu'un traitement hydrothermique effectué sur nibs ne conduit pas un développement de MCI, alors que si du carbonate de potassium est employé, de la MCI se forme.

3. Etude de la matière colorante soluble

3.1 Recherche des précurseurs

3.1.1 Participation des flavanols à la formation la MCS

3.1.1.1 Rappels

Les résultats d'une précédente étude (BIANCHI 1987) montrent que les flavanols de la fève de cacao (le (-)épicatéchol et ses oligomères : procyanidols B2, B5, C1 et D) sont des précurseurs de la MCS. En effet :

- la teneur en flavanols diminue d'environ 85 % au cours de l'alcalinisation.

- il existe une grande similitude entre le spectre d'absorption en lumière visible d'une solution de flavanols extraits de cacao puis alcalinisés et celui d'une solution de MCS.

- si un cacao est supplémenté en flavanols avant alcalinisation, la MCS augmente de façon importante.

3.1.1.2 Confirmation du rôle des flavanols

a) alcalinisation d'une solution d'épicatéchol (I.12.1)

Une solution de ce composé pur, initialement incolore, devient brun jaune au cours de son alcalinisation par du carbonate de potassium. Le spectre d'absorption en lumière visible de la solution obtenue présente des maxima aux mêmes longueurs d'onde que le spectre de la MCS (425 et 490 nm). Cependant, le rapport des absorbances U.A 425 nm / U.A. 490 nm est nettement plus important pour l'épicatéchol alcalinisé (figure 13).

La même expérience conduite en présence d'un antioxydant (métabisulfite de sodium) n'aboutit pas à une modification de couleur . Un résultat semblable est obtenu en alcalinisant des flavanols extraits

de cacao en présence ou non de métabisulfite de sodium (figure 13). Ceci est un argument en faveur de la participation de phénomènes oxydatifs lors du développement de cette coloration.

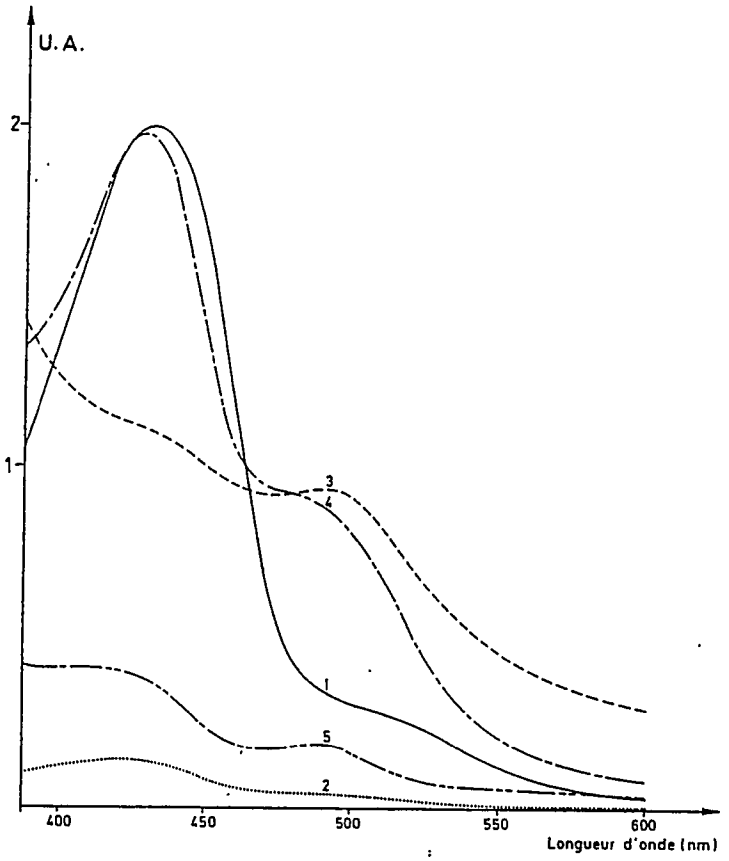


Figure 13 : Spectre d'absorption en lumière visible :

1 : d'une solution d'épicatéchol alcalinisé
2 : d'une solution d'épicatéchol alcalinisé en présence de métabisulfite de sodium
3 : d'une solution de MCS
4 : d'une solution de flavanols alcalinisés
5 : d'une solution de flavanols alcalinisés en présence de métabisulfite de sodium

b) alcalinisation de flavanols purifiés (I.12.2)

Le lavage par du chloroforme puis par de l'éther éthylique d'un extrait brut de flavanols de cacao non fermenté permet de réduire la teneur en théobromine et en dérivés hydroxycinnamiques. L'élution de cet extrait sur gel LH 20 complète l'élimination de la théobromine et des anthocyanidols. L'épicatéchol et les procyanidols sont élués par le méthanol.

L'analyse chromatographique (HPLC) réalisée aux différentes étapes de la purification permet de localiser et regrouper les fractions d'éluat les plus pures en flavanols (figure 14).

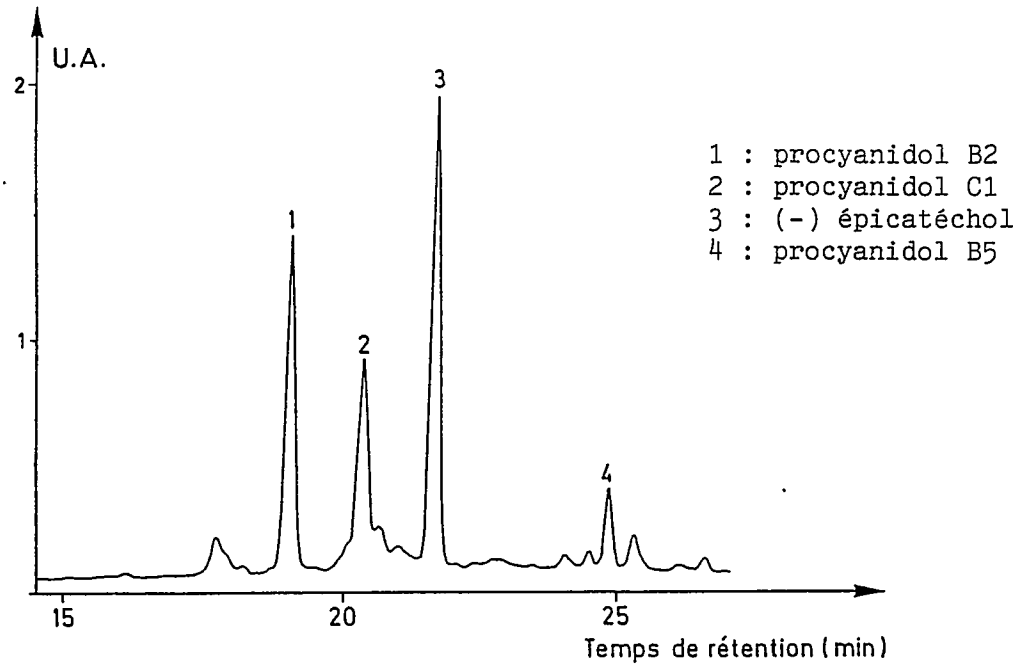


Figure 14 : Chromatogramme (HPLC) de l'extrait purifié de flavanols

Pour réaliser un système modèle d'alcalinisation de ces flavanols, il est nécessaire de déterminer les conditions de traitement (durée, température et concentration en carbonate de potassium) les plus proches possible de celles rencontrées au cours du développement de la MCS. Ces conditions doivent être telles que le spectre d'absorption dans le visible des flavanols alcalinisés soit similaire à celui de la MCS, sous réserve que ces composés phénoliques soient les précurseurs uniques de cette coloration.

Choix des conditions d'alcalinisation :

Quatre conditions correspondant à deux concentrations de carbonate de potassium et différents traitements thermiques (durée et température) ont été testés :

- conditions 1 : solution pH 9,5 - 60 min. - 70°C
- conditions 2 : solution pH 10,9 - 15 min. - 40°C
- conditions 3 : solution pH 9,5 - 15 min. - 40°C
- conditions 4 : solution pH 9,5 - 15 min. - 90°C

Seuls les spectres d'absorption des solutions obtenues dans les conditions 1 et 2 ont même allure et possédent des longueurs d'ondes maximales identiques à celui de la MCS (figure 15).

Fractionnement sur gel TRISACRYL GF 05 de la matière colorante soluble et des flavanols alcalinisés :

La MCS et les flavanols purifiés alcalinisés selon les conditions 2 sont déposés tour à tour sur une même colonne de TRISACRYL GF 05. Le pic coloré majoritaire T1 de la MCS n'est pas présent sur la courbe d'élution des flavanols. Seul le pic T3, correspondant à une fraction colorée minoritaire de la MCS, présente un volume de rétention comparable à celui du pic unique A2 de la courbe d'élution des flavanols alcalinisées (figure 16). Les spectres d'absorption des deux pics n'ont pas pu être comparés (pic T3 non isolé).

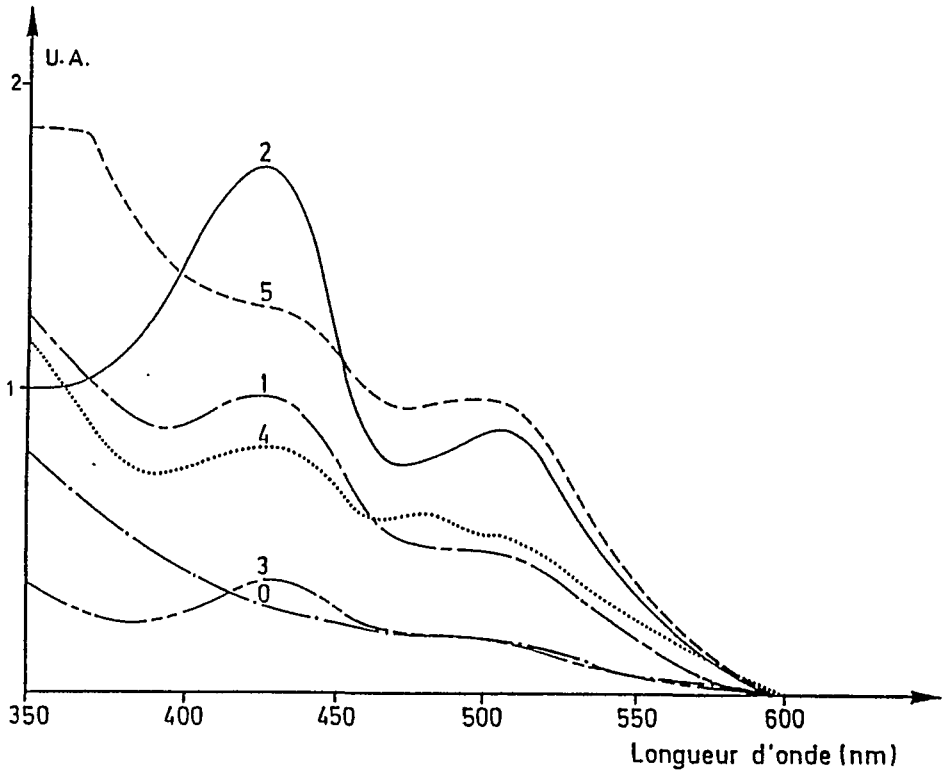


Figure 15 : Spectres d'absorption en lumière visible de :

0 : extrait purifié de flavanols de cacao
1 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potassium pH 9,5, 60 min. à 70°C
2 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potassium pH 10,9, 15 min. à 40°C
3 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potasssium pH 9,5, 15 min. à 40°C
4 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potassium pH 9,5, 15 min. à 90°C
5 : solution aqueuse de MCS

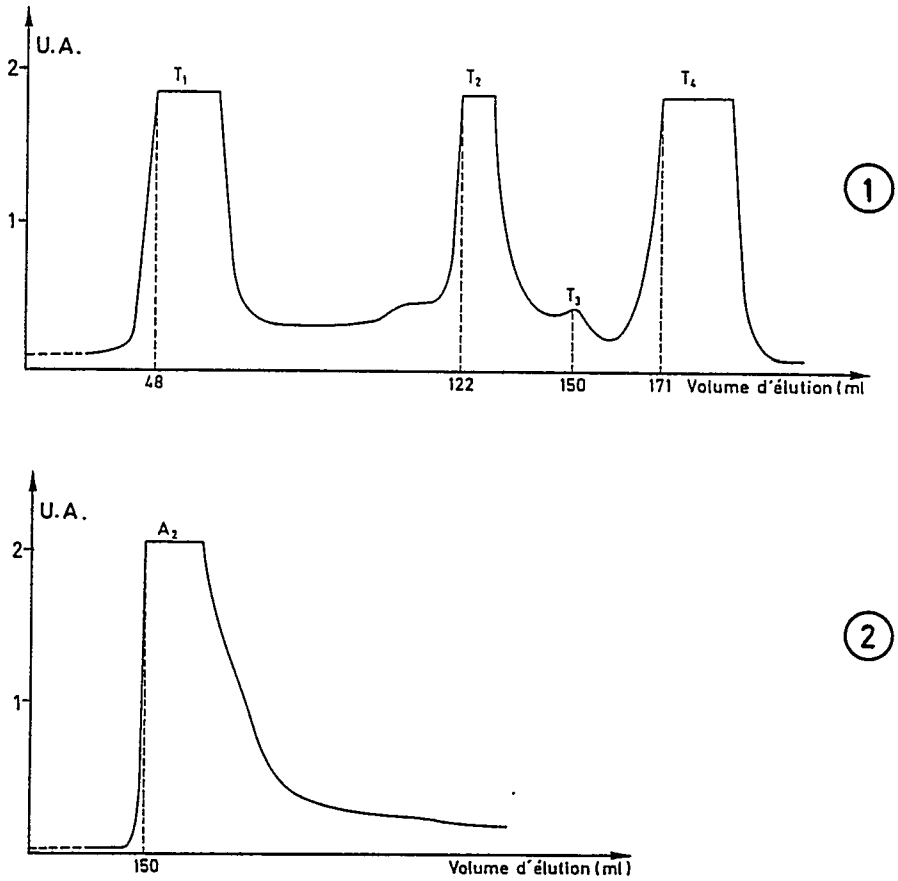


Figure 16 : Courbes d'élution sur gel TRISACRYL GF 05 de :

1 : solution de MCS
2 : extrait purifié de flavanols alcalinisé selon les conditions 2
(Colonne de diamètre : 2,5 cm et de longueur : 30 cm, λ = 280 nm)

Au vu de ces résultats, il apparaît qu'une similitude de couleur existe entre solution de MCS et solution de flavanols alcalinisés mais le fractionnement sur TRISACRYL GF 05 conduit à des résultats différents. Deux explications (non incompatibles) peuvent être envisagées :

a) soit les flavanols ne sont pas les seuls composés à participer à la formation de la MCS. Cette hypothèse sera étudiée au paragraphe 3.1.2.

b) soit les conditions d'alcalinisation choisies pour l'extrait purifié de flavanols ne correspondent pas à ce qui se passe dans le cacao. Cette hypothèse est tout à fait réaliste puisque les produits formés sont très dépendant des conditions d'alcalinisation. En effet, les conditions 1 et 2 conduisent respectivement à la formation des composés A1 et A2 dont le volume de rétention sont semblables (figure 17) mais dont les spectres d'absorption dans le visible sont différents (figure 18). De plus, le pic A1 présente un épaulement qui n'est pas observé pour le pic A2.

Seule une étude approfondie de l'influence des conditions de traitement sur les produits formés permettrait d'établir des conditions modèles d'alcalinisation des flavanols.

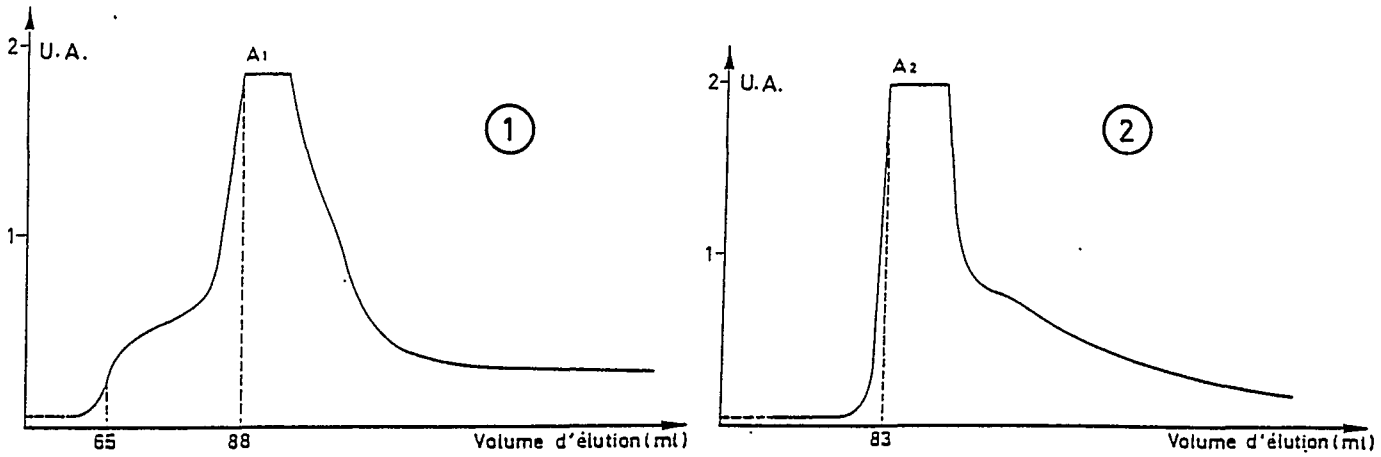


Figure 17 : Courbes d'élution sur gel TRISACRYL GF 05 de :

1 : extrait purifié de flavanols alcalinisé selon les conditions 1
2 : extrait purifié de flavanols alcalinisé selon les conditions 2
(Colonne de diamètre : 2,5 cm et de longueur : 17 cm, λ = 280 nm)

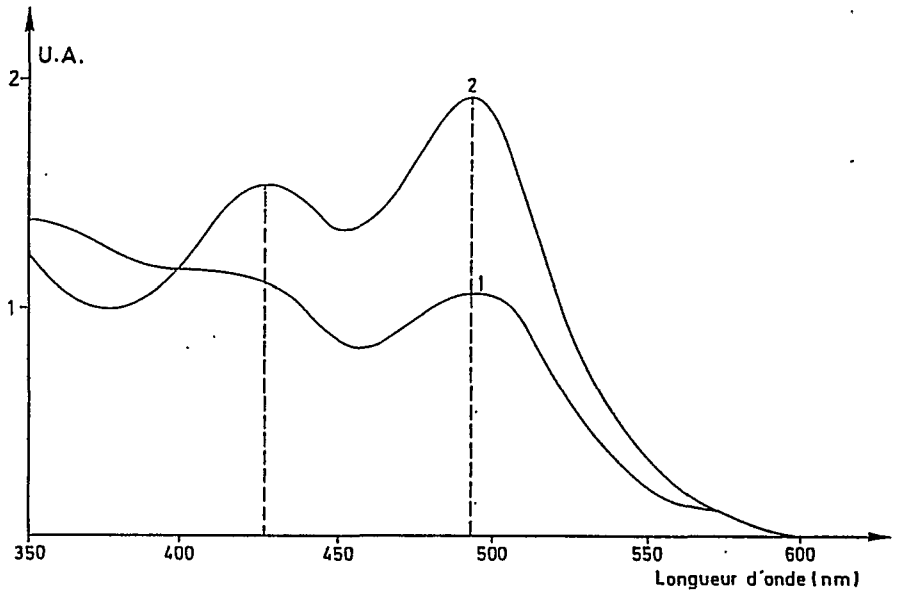


Figure 18 : Spectre d'absorption en lumière visible de :

1 : fraction d'éluat correspondant au pic A1
2 : fraction d'éluat correspondant au pic A2

3.1.2 Recherche d'autres précurseurs

3.1.2.1 Phénols insolubles

La teneur en phénols solubles d'un cacao non fermenté est beaucoup plus élevée que celle d'un cacao fermenté. Cette différence est supposée être due à une insolubilisation de ces composés au cours de la fermentation par tannage et par polymérisation (VILLENEUVE et al. 1989). Une quantité non négligeable de composés phénoliques non extractibles seraient donc présents dans le cacao fermenté.

La comparaison des teneurs en MCS développée au cours de l'alcalinisation de poudres délipidées "déphénolées" ou non de cacaos fermentés ou non confirme le rôle important des phénols solubles dans la formation de la MCS. En effet, après extraction des phénols solubles, la quantité de MCS développée au cours de l'alcalinisation est moins importante (tableau 25).

Après extraction des phénols solubles, plus la teneur en phénols résiduels est forte (cas du cacao fermenté), plus la MCS formée est importante. Des phénols insolubles pourraient donc être responsables de la libération au cours de l'alcalinisation de précurseurs de la MCS.

Tableau 25 : Coloration développée au cours de l'alcalinisation de cacaos non fermentés et fermentés après élimination des phénols extractibles

	L	a	b	a/b	MCS(*)
Non fermenté alc.	29,7	10,4	8,2	1,27	2,8
Non ferm., "déphénolé", alc.	30,3	11,6	9,7	1,19	0,6
Fermenté alc.	28,7	11,5	12,3	0,93	1,6
Fermenté, "déphénolé", alc.	25,3	9,7	9,9	0,98	1,2

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

Ces résultats seront confirmés par les valeurs de MCS obtenues après alcalinisation d'un cacao non fermenté dont les cellules à pigments ont été préalablement éliminées (III 4.2.4).

3.1.2.2 Anthocyanidols, théobromine, fructose, acides aminés

La réalisation de systèmes modèles (I.12.3) faisant intervenir un extrait de flavanols de cacao auquel sont rajoutés successivement des anthocyanidols, de la théobromine, du fructose et les principaux acides aminés du cacao (GLU, PHE, LEU, ALA) montre que l'alcalinisation des flavanols seuls ou en présence de ces différents composés donnent des solutions dont les spectres en lumière visible sont identiques (figure 20). Ces différents constituants n'interviennent donc pas sur la couleur des produits formés au cours de l'alcalinisation du cacao.

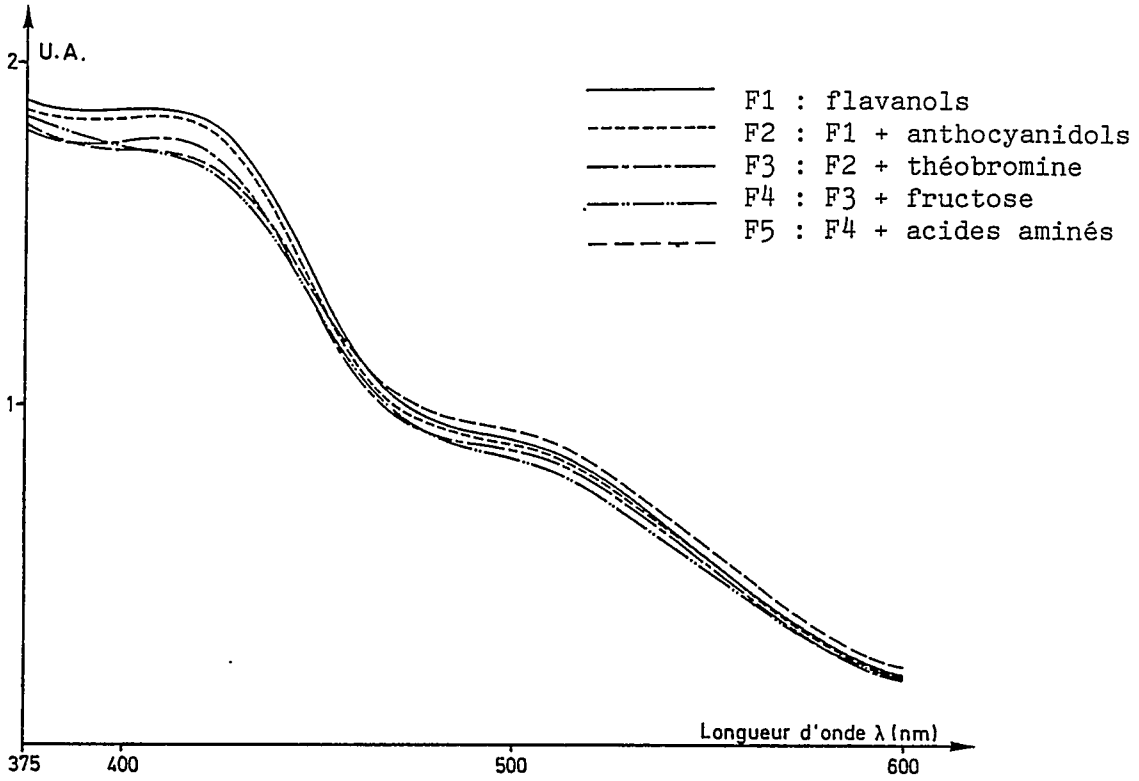


Figure 20 : Spectres d'absorption en lumière visible des solutions F alcalinisées

3.1.2.3 Protéines

Evolution de la teneur en protéines au cours de l'alcalinisation

Un cacao alcalinisé selon les conditions standard présente une teneur en protéines très nettement inférieure à celle du cacao naturel (baisse de 86 %). La teneur en acides aminés totaux ne diminuant que de 7 % et les acides aminés libres diminuant de 30 % (BIANCHI 1987), cette "disparition" de protéines correspond vraisemblablement à une simple insolubilisation.

Tableau 26 : Teneur en protéines extractibles avant et après alcalinisation

Traitement	Protéines extractibles en g/100 g de poudre délipidée
Cacao naturel	2,8
1 h 30 - 50 % d'une solution à 4,6 % de K_2CO_3 - 90°C	0,4

Alcalinisation d'un mélange phénols/protéines

Trois solutions sont réalisées à partir d'un extrait phénolique et d'un extrait protéique de cacao (I.12.4) :

solution A : extrait phénolique + extrait protéique + K_2CO_3

solution B : extrait phénolique + K_2CO_3
solution C : extrait protéique + K_2CO_3

Seules les solutions contenant des phénols (avec et sans protéines) prennent une coloration brun-rouge à l'alcalinisation. Les spectres en lumière visible de ces solutions sont strictement identiques (figure 21).

Aucun précipité n'apparaît dans le mélange phénols/protéines alcalinisé.

L'extrait phénolique brut utilisé pour cette expérimentation contient au moins des acides aminés de nature phénolique. Nous avons réalisé un autre système modèle phénols / protéines à partir d'un extrait phénolique purifié.

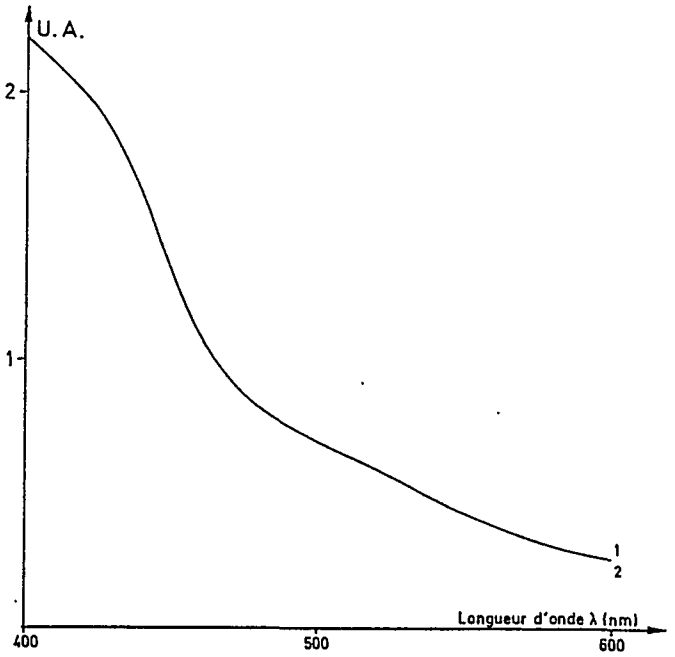


Figure 21 : Spectres en lumière visible d'un extrait phénolique alcalinisé seul (1) ou en présence d'un extrait protéique (2)

Alcalinisation d'un mélange flavanols purifiés et extrait protéique

Un extrait purifié de flavanols est alcalinisé 15 min. à 40°C par une solution de carbonate de potassium pH 10,9 (conditions 2 établies au paragraphe 2.1.1.2) en présence d'un extrait protéique dans les proportions 1/1.

La présence des protéines ne modifie pas l'allure générale du spectre d'absorption de flavanols alcalinisés (figure 22) ce qui confirme les résultats du paragraphe précédent. Par contre, elle entraîne l'apparition de nouvelles fractions colorées mises en évidence sur la courbe d'élution sur gel TRISACRYL GF 05 (figure 23). Les produits formés au cours de l'alcalinisation sont donc différents selon qu'il y ait ou non des protéines. Toutefois, le mélange flavanols/protéines réalisé ne permet pas de modéliser de façon parfaite la formation de la matière colorante obtenue lors de l'alcalinisation des nibs. En effet, la courbe d'élution de la MCS est différente de celle du mélange flavanols/protéines alcalinisé (figure 23).

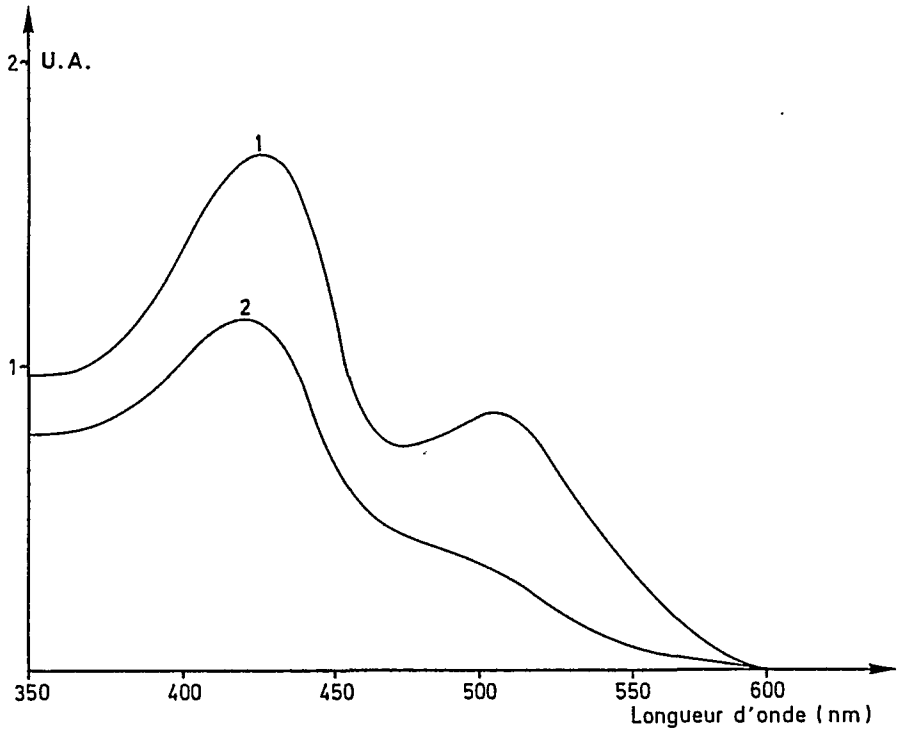


Figure 22 : Spectres d'absorption en lumière visible de :

1 : un extrait purifié de flavanols alcalinisé selon les conditions 2
2 : un extrait purifié de flavanols alcalinisé en présence d'un extrait protéique selon les conditions 2

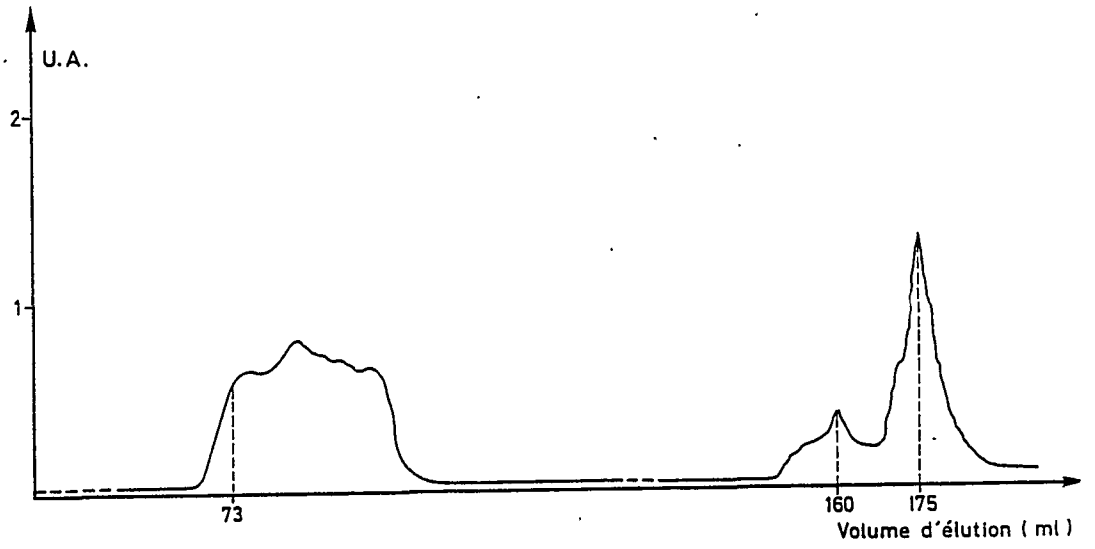


Figure 23 : Courbe d'élution sur gel TRISACRYL GF 05 d'un extrait purifié de flavanols alcalinisé en présence d'un mélange protéique selon les conditions 2
(diamètre colonne 2,5 cm, longueur 17 cm, λ = 280 nm)

3.2 Purification - fractionnement

3.2.1 Détermination des conditions d'extraction

Avant de procéder à la purification de la MCS, il est nécessaire de préciser son comportement au cours de son extraction.

Plus le pH auquel a lieu l'extraction de la MCS est élevé, plus l'intensité de coloration de la solution obtenue est importante (BIANCHI 1987). Plusieurs explications sont envisageables :

- l'intensité de coloration de la MCS, dépend du pH
- la solubilité de la MCS dépend du pH
- il y a formation de nouvelles molécules de MCS au moment même de l'extraction lorsque celle-ci est réalisée à pH alcalin.

Pour préciser le rôle du pH, les trois solutions suivantes sont préparées (I.9.6.1) :

- solution A : MCS extraite par l'eau et laissée au pH de l'eau
- solution B : MCS extraite par l'eau et amenée à pH 10
- solution C : MCS extraite par tampon pH 10 et maintenue à pH 10

- Influence du pH sur l'intensité de la coloration de la MCS

Les absorbances de l'extrait aqueux maintenu au pH de l'eau (A) et du même extrait ajusté à pH 10 (B) sont différentes (figure 24). La couleur de la MCS dépend donc du pH.

- Influence du pH sur la solubilité de la MCS

Le pH a également une influence sur la solubilité de la MCS :
* l'acidification d'une solution de MCS entraîne la formation d'un précipité (BIANCHI 1987).
* L'absorbance de l'extrait pH 10 (C) est plus élevée que celle de l'extrait aqueux ajusté à pH 10 (B).

- Formation de nouvelles molécules de MCS durant l'extraction

Ce phénomène pourrait également être en partie responsable de la différence observée entre les solutions B et C, bien que l'extraction s'effectue à température relativement basse pendant une courte durée.

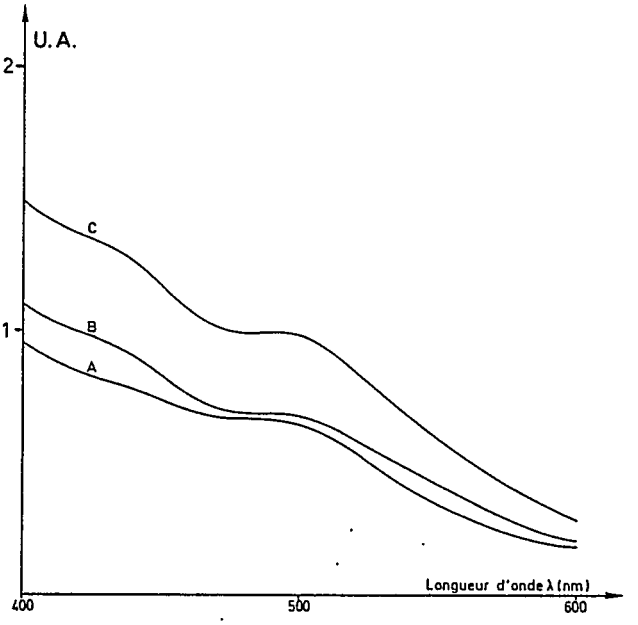


Figure 24 : Spectres d'absorption en lumière visible de :

A : un extrait aqueux de MCS
B : un extrait aqueux de MCS, ajusté à pH 10
C : un extrait pH 10 de MCS
(Les dilutions des trois solutions sont identiques)

3.2.2 Extraction et purification partielle

Le taux d'extraction de la matière colorante soluble étant plus élevé à pH alcalin, l'extraction est réalisée par un tampon pH 10 (I.9.6.2).

Le lavage par différents solvants permet une purification partielle de l'extrait brut.

3.2.3 Fractionnement

Des essais préliminaires de chromatographie sur couche mince ou sur colonne (silice ou cellulose) ont été peu satisfaisants : soit pas de migration soit migration incomplète et sous forme de trainées ce qui pourrait signifier que la MCS est constituée par un ensemble de produits de polarité très proche. La MCS n'étant soluble que dans l'eau, les possibilités d'amélioration de ces séparations par modification du choix de l'éluant sont très limitées. Ces techniques ont donc été abandonnées au profit de procédés de séparation basés soit sur des différences de charges électriques soit sur des différences de poids moléculaires.

Chromatographie par échange d'ions :

La MCS déposée sur un gel de polyacrylamide dans un tampon pH 8,3 migre de la cathode vers l'anode et forme un spot continu mais très étalé. A ce pH la MCS est donc porteuse d'une charge négative ce qui permet d'envisager une chromatographie par échange d'ions. Une phase SPHERODEX DEAE (le groupement diéthyl aminoéthyl retient les charges négatives) est utilisée. La MCS est solubilisée dans un tampon pH 8 ou dans une solution de chlorure de sodium 0,1 M. Différents essais

d'élution sont réalisés en faisant varier le pH et/ou la force ionique (I.11.1).
Aucun des systèmes utilisés n'a permis d'éluer complètement la MCS.

Chromatographie par filtration sur gel :

Des essais de purification de la MCS ont été réalisés sur des gels présentant différentes zones de fractionnement : TRISACRYL GF 05, SEPHADEX G 10, SEPHADEX G 25, SEPHADEX G 50, SEPHADEX G 75, ULTROGEL ACA 34. Les gels SEPHADEX G 10, G 25 et G 50 ont finalement été écartés car le fractionnement n'était pas satisfaisant.

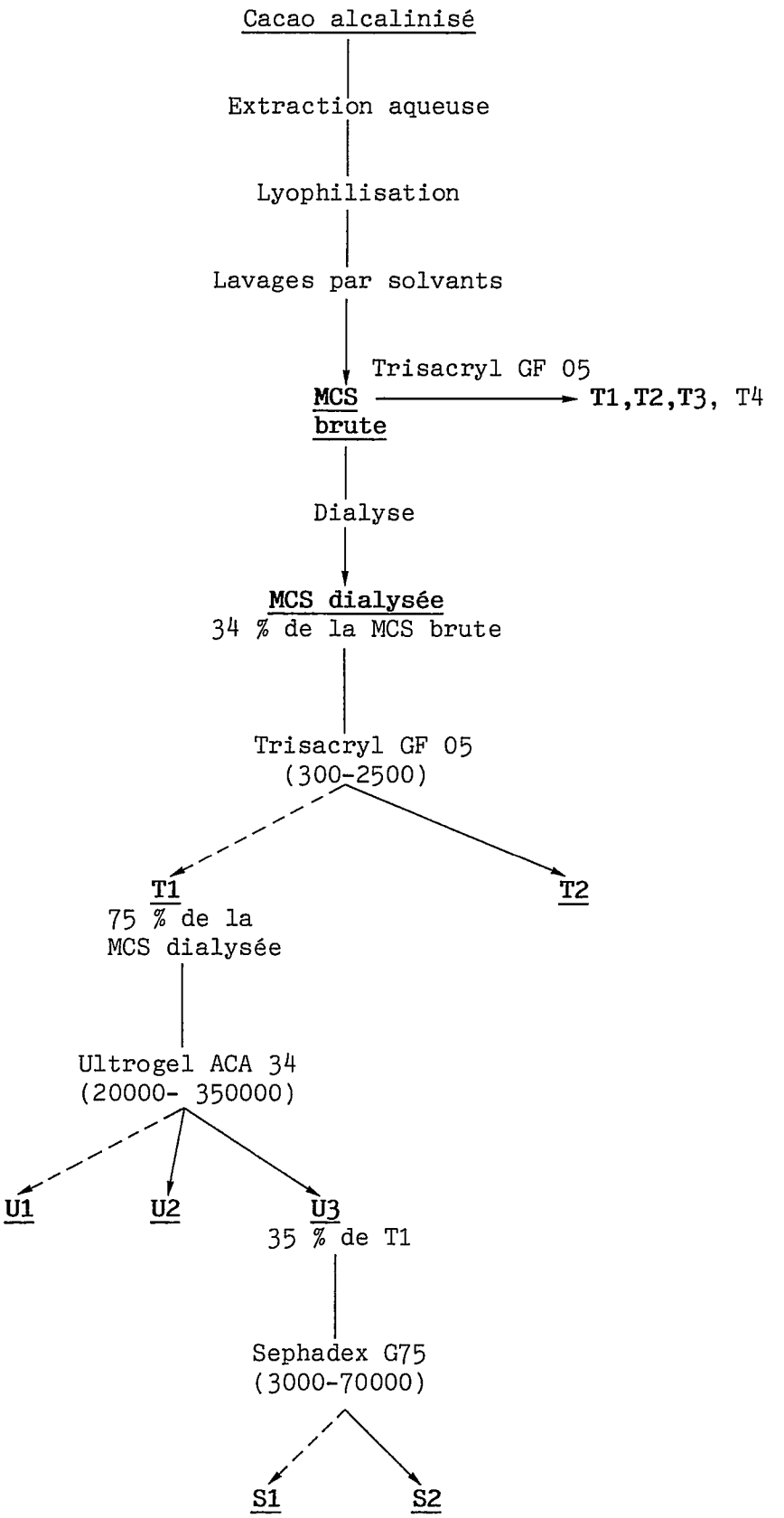
Le schéma de fractionnement retenu (figure 25) met en évidence la présence de 6 fractions colorées correspondant à différentes gammes de poids moléculaires : T2, T3, U1, U2, S1, S2, cette dernière étant majoritaire.

La possibilité d'une subdivision ultérieure de ces différentes fractions n'est pas à exclure, tout au moins dans le cas de la fraction S2. En effet, sur la courbe d'élution "U3 sur SEPHADEX G 75" (figure 28), l'épaulement du pic S2 indique la présence d'une sous fraction.

Les quantités obtenues après chaque fractionnement étant très faibles et les durées de séparation et de régénération des colonnes étant longues, le fractionnement des fractions minoritaires T2, T3, U1 et U2 n'a pas été poursuivi.

Une dialyse contre de l'eau distillée (membrane de porosité 6000-8000) a précédé le premier fractionnement sur Trisacryl GF 05. Cette technique a été choisie car elle permet d'obtenir la fraction colorée majoritaire (T1) de façon beaucoup plus rapide. En effet, la comparaison du profil d'élution de la MCS avant et après dialyse (figure 26) rend compte de l'élimination au cours de cette étape d'une fraction incolore importante (T4) ainsi que d'une partie de la fraction colorée T2.

Rq : Un précipité apparaît dans le tube à dialyse. Ce précipité (moins de 1 % de la masse de MCS brute) peut être dû à une diminution du pH puisque nous avons vu précédemment que la solubilité de la MCS diminue avec le pH. Cependant, ce précipité placé dans une solution alcaline (tampon pH 8 ou soude 0,1 N ou solution de carbonate de potassium à 0,5 %) ne se redissout pas.



-------→ : élution au volume mort

Figure 25 : Schéma de fractionnement par chromatographie d'exclusion de la matière colorante soluble développée au cours de l'alcalinisation du cacao

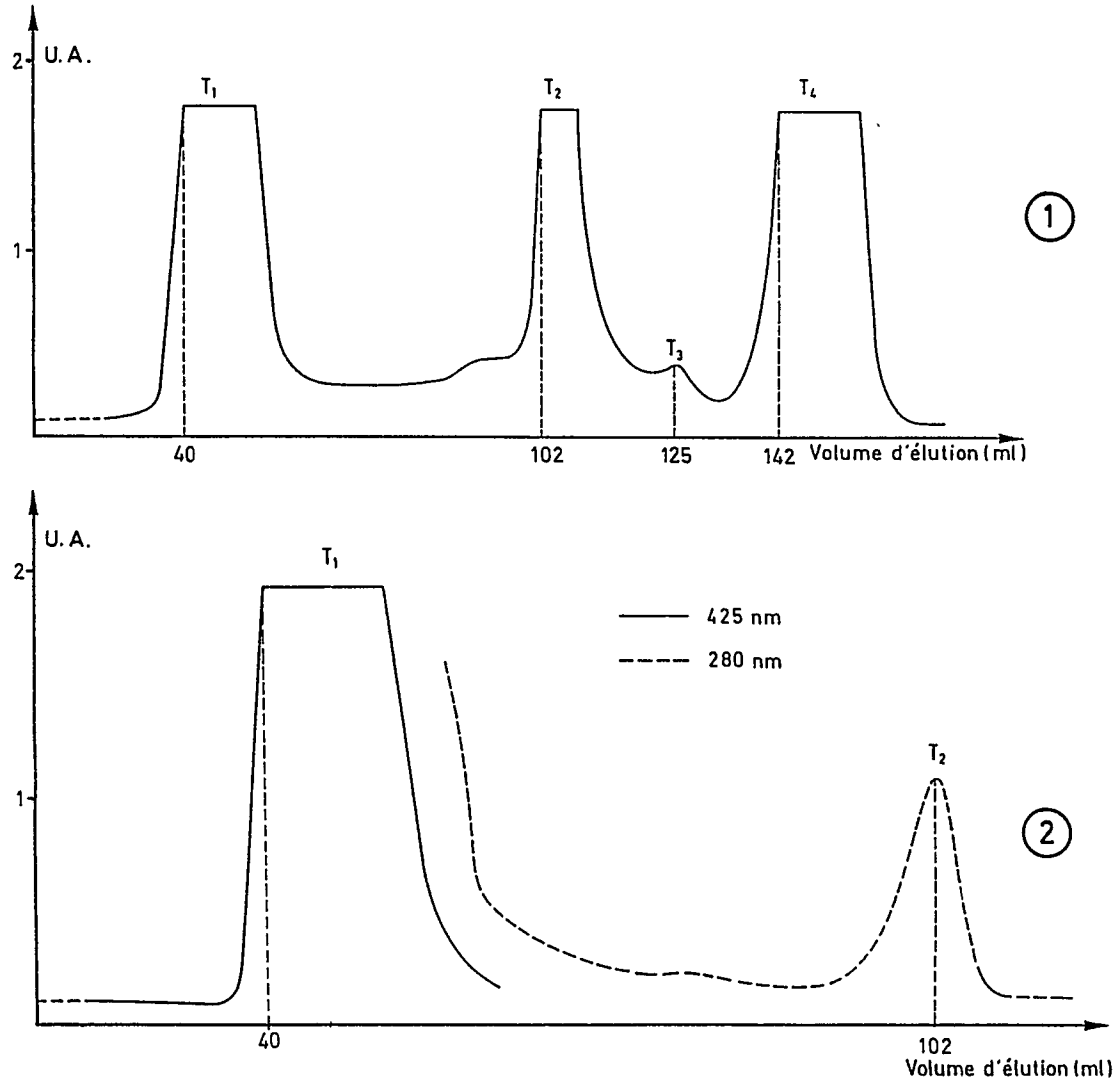


Figure 26 : Courbe d'élution sur Trisacryl GF 05 de la MCS brute (1) et de la MCS dialysée (2)
(Colonne de diamètre 2,5 cm et de longueur 25 cm)

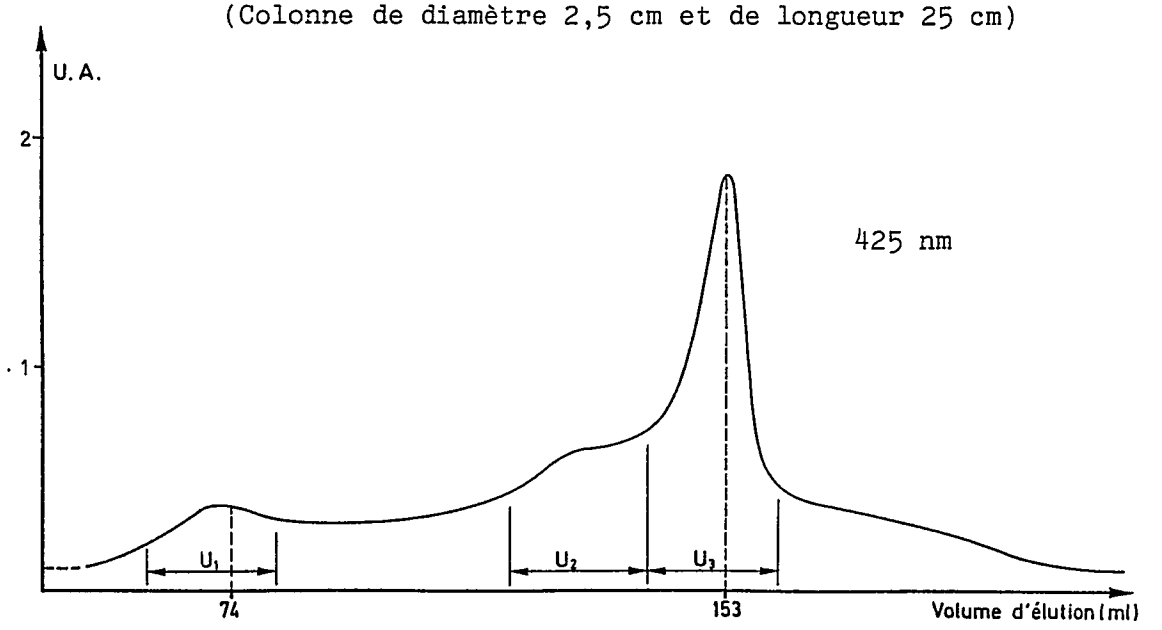


Figure 27 : Courbe d'élution sur Ultrogel ACA 34 de la fraction T1
(Colonne de diamètre 2,5 cm et de longueur 30 cm)

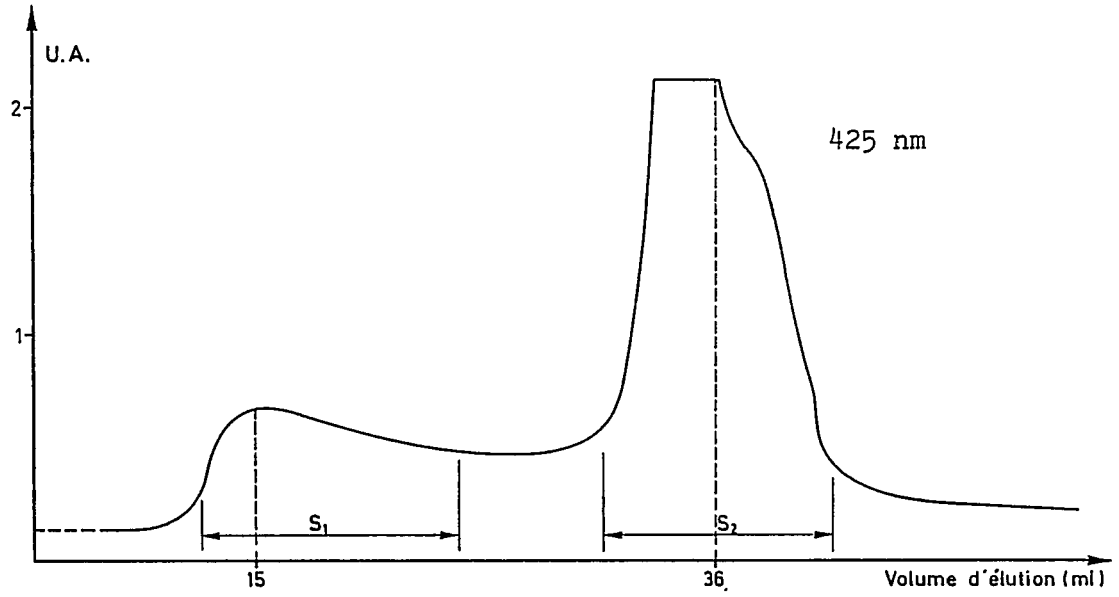


Figure 28 : Courbe d'élution sur Sephadex G 75 de la fraction U3 (Colonne de diamètre 1,5 cm et de longueur 20 cm)

3.2.4 Analyse des principales fractions

3.2.4.1 Spectres d'absorption UV - visible

Les fractions colorées T2, U1, S2, S1 présentent des spectres d'absorption dans le visible et dans l'UV identiques entre eux et identiques à celui de la MCS dialysée (figures 29). Ces composés ont donc des structures très proches, seuls leur encombrement stérique sont différents.

Ces composés présentent un maxima d'absorption à 275 nm. Cette caractéristique spectrale ne permet pas de préciser la nature de la MCS, car ce maxima est commun à plusieurs composés (flavanols, certains acides aminés, théobromine, ...).

Après dialyse, le spectre d'absorption de la MCS est modifié. Les maxima ont subi un déplacement et sont nettement moins marqué (figure 30). Ce phénomène est du à la diminution de pH se produisant au cours de la dialyse puisqu'après addition de quelques mg de carbonate de potassium, le spectre retrouve immédiatement son allure initiale.

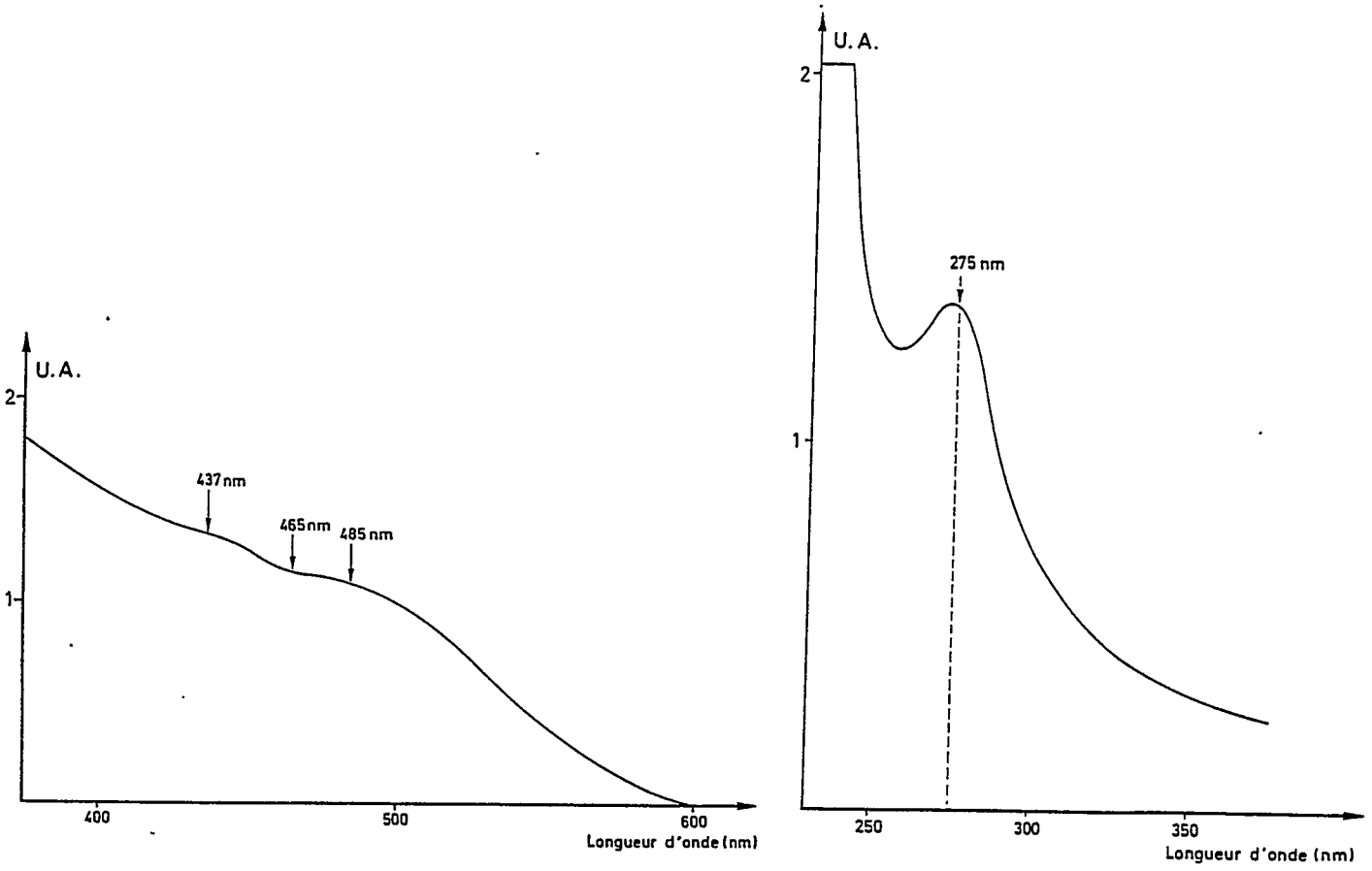


Figure 29 : Spectres d'absorption en lumière visible et UV de toutes les fractions colorées constitutives de la MCS

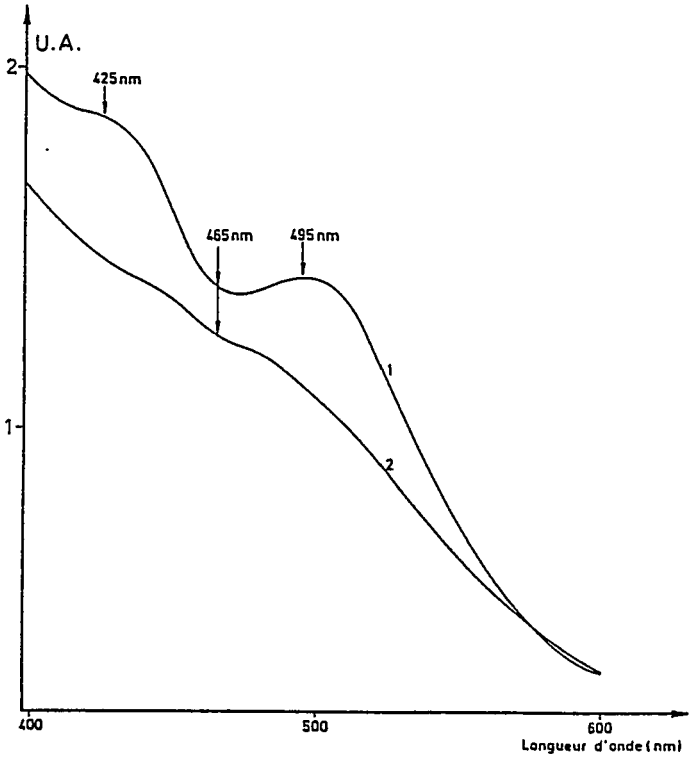


Figure 30 : Spectres d'absorption en lumière visible de la MCS avant (1) et après dialyse (2).

3.2.4.2 Analyse élémentaire

Aucune fraction incolore n'ayant été éliminée à partir de la fraction U3 et les spectres d'absorption dans le visible étant identiques, les analyses suivantes ont été réalisées sur cette fraction.

L'analyse élémentaire permet d'établir une formule brute approchée :

$C_{23} H_{34} N_2 O_{16}$

La détermination des cendres de la fraction U3 révèle la présence d'une très faible teneur en éléments minéraux (tableau 27).

Tableau 27 : Analyse élémentaire de la fraction U3

	en g/100g
Carbone	43,1
Hydrogène	5,4
Azote	4,4
Oxygène	40,5
Cendres	0,2
Potassium	0,08
Magnésium	0,09

3.2.4.3 Analyse des acides aminés

L'analyse des acides aminés est effectuée après hydrolyse en milieu acide (I.10.9).

Ces résultats (tableau 28) montrent la présence d'une quantité importante d'acides aminés dans les principales fractions colorées de la MCS. La MCS ayant été dialysée, il ne peut s'agir d'acides aminés libres.

Ces composés sont soit des peptides ou des protéines extraits avec la MCS, soit sont constitutifs de la couleur. La première hypothèse est peu probable étant donné que T2 et U3 sont issus de plusieurs étapes d'extraction et de purification.

Le rapport des teneurs en acides aminé des deux fractions diffère d'un acide aminé à l'autre. Dans l'hypothèse d'une association composés aminés/composés colorés, U3 ne serait pas un polymère de T2.

Tableau 28 : Composition en acides aminés des fractions T2 et U3 (en g/100 g)

	T2	U3	U3/T2
Acide aspartique	1,84	4,23	2,3
Acide glutamique	1,70	7,13	4,2
Sérine	1,24	1,76	1,4
Histidine	0,23	0,42	1,8
Glycocolle	0,48	1,08	2,25
Thréonine	0,79	1,34	1,7
Arginine	0,77	2,69	3,5
Alanine	1,22	1,04	0,8
Tyrosine	1,09	0,98	0,9
Méthionine	0,36	0,21	0,6
Valine	1,82	1,21	0,7
Phénylalanine	1,53	1,21	0,8
Isoleucine	0,91	0,86	0,9
Leucine	1,08	1,64	1,5
Lysine	1,08	1,38	1,3
Total	18,63	27,16	

3.2.4.4 Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols de la fraction U3 correspond à 23,5 eq.g d'acide gallique/100 g. Cette valeur n'a pas réellement de signification quantitative puisqu'il s'agit d'une équivalence mais indique clairement la présence de composés à caractère phénolique.

3.3 Discussion

Les résultats d'une étude préliminaire (BIANCHI 1987) confirmés par les résultats du présent travail indiquent que les flavanols du cacao participent à la synthèse de la MCS vraisemblablement par l'intermédiaire de processus oxydatifs.

Jusqu'à présent, l'oxydation en milieu alcalin des flavanols du cacao n'a, à notre connaissance, fait l'objet d'aucune publication. Par contre, des réactions d'oxydation de flavanols ont souvent été invoquées pour expliquer certains phénomènes de modification de couleur (notamment brunissement) observés pour différents produits alimentaires d'origine végétale : biere, cidre, thé, vins, jus de fruits. De telles réactions se rencontrent au cours du vieillissement ou durant certains processus technologiques et peuvent résulter de mécanismes chimiques ou enzymatiques (METCHE 1988).

Deux catégories d'oxydase ont été identifiées dans la fève de cacao non fermenté : une peroxydase et une polyphénoloxydase (PPO).

VILLENEUVE et al. (1985) ont montré qu'après deux jours de fermentation, l'activité peroxydasique diminue de 95 %. D'autre part,

cette enzyme présente une faible stabilité thermique : à 50°C, elle est rapidement dénaturée.

D'après REEVES (1988) et VILLENEUVE et al. (1985), l'activité résiduelle de la PPO après 5 jours de fermentation est faible mais non nulle :

5 - 6 % de l'activité initiale (REEVES)
13 % " " " (VILLENEUVE)

Mais cette activité décroit rapidement dès que la température dépasse 40°C.

La faible activité résiduelle après une période de fermentation classique (4-6 jours), la faible stabilité thermique de ces enzymes et le fait que l'intensité de la coloration développée au cours de l'alcalinisation augmente avec la température de traitement et le pH des solutions utilisées permettent d'écarter l'hypothèse de l'intervention de mécanismes d'oxydation enzymatique dans la formation de la matière colorante.

La formation de pigments résultant de l'oxydation selon un mécanisme chimique de polyphénols ortho ou para hydroxylés (ce qui est le cas des flavanols) a été étudiée par quelques auteurs soit par l'intermédiaire de systèmes modèles faisant appel à des polyphénols simples, en présence ou non d'autres composés (autoxydation du catéchol par HATHWAY et al. en 1955, de polyhydroxyflavanes par ces mêmes auteurs en 1957, du pyrocatéchol seul ou en présence d'acides aminés par ANDREUX en 1979...) soit à partir d'extraits végétaux riches en de tels composés (oxydation des tanins d'orge par CHAPON et al. en 1963, d'un extrait aqueux de malt par DERDELINCKX en 1986...)

Selon RIBERAU-GAYON, les mécanismes d'oxydation chimique des composés phénoliques sont identiques à ceux de l'oxydation par voie enzymatique lesquels ont fait l'objet d'un plus grand nombre d'études (JERUMANIS et al. 1979).

Ces phénomènes d'oxydation ont pour conséquence des réactions de polycondensation. Ce mécanisme imputable aux polyphénols simples est également valable dans son ensemble pour l'oxydation des tanins plus complexes portant les mêmes groupements fonctionnels (METCHE 1986), ce qui est le cas des flavanols du cacao.

La principale étape de ces réactions de polycondensation correspond à la formation d'ortho quinones, probablement selon un processus radicalaire suivi d'une condensation oxydative selon un mécanisme ionique.

Au cours de l'alcalinisation du pyrocatéchol, ANDREUX (1979) signale l'apparition en premier lieu d'une teinte verdâtre caractéristique de la formation de semi-quinones. La formation d'une teinte similaire est observée dans les premières minutes d'alcalinisation du cacao.

Selon METCHE (1980), l'oxydation spontannée des composés ortho et para diphénoliques par l'oxygène moléculaire est minimale aux environ de pH 2,5, elle s'accroît très vite en solution aqueuse dès que l'on dépasse pH = 3,5 - 4,6 pour devenir très rapide en milieu alcalin. Nous

avons vu précédemment que pour nos conditions standard de temps et de température, l'agent alcalin est indispensable au développement de la matière colorante soluble.

Il faut cependant signaler que pour certains auteurs (HATHWAY 1955 : oxydation du catéchol et ANDREUX 1979 : oxydation du pyrocatéchol), des réactions plus complexes interviendraient lorsque le milieu devient très alcalin (pH supérieur à 8). Il ne s'agirait plus de simples réactions de polycondensation mais des dégradations partielles de molécules auraient lieu.
Les solutions utilisées classiquement pour l'alcalinisation du cacao ont des pH très élevés (supérieur à 11) cependant, en raison de la présence dans le cacao de composés à caractère acide, le pH au sein du mélange réactionnel dépasse rarement 8.

Suivant les conditions du milieu et les substituants du cycle, les quinones formées au cours de l'oxydation des flavanols peuvent donner lieu à divers mécanismes de couplage soit uniquement entre molécules de phénols soit en faisant intervenir des composés à groupement aminé ou à groupement thiol (METCHE 1986). Certains résultats de notre étude font apparaître que les flavanols oxydés se lient vraisemblablement à d'autres types de composés, en l'occurence des composés aminés. En effet :

- il n'y a pas identité absolue entre produits d'oxydation de flavanols purifiés et MCS. En effet, bien que leurs spectres d'absorption soient similaires, les principaux composés de la MCS ont des encombrements stériques plus importants que les produits d'alcalinisation des flavanols (cf résultats du fractionnement sur TRISACRYL GF 05). Cependant, si des protéines sont rajoutées aux flavanols avant alcalinisation, l'encombrement stérique des composés colorées formés est alors plus grand (et leur couleur n'est pas modifiée).

- Après acidification, les solutions de MCS, s'éclaircissent et des précipités floconneux apparaîssent (BIANCHI 1987).
De tel précipités sont observés dans le cas des bières oxydées (CHAPON et al. 1963). Les troubles de la bière sont dues à des associations de type polyphénols/protéines, les composés phénoliques impliqués étant les catéchols et les proanthocyanidols du malt et du houblon. La précipitation de ces associations est très dépendante du pH (CALDERON et al. 1968).
Comme dans le cas des bières oxydées, les troubles observés lors de l'acidification des solutions de MCS pourraient être dus à la précipitation des associations produits d'oxydation des flavanols/protéines. ASANO (1984) a en effet montré que les produits d'oxydation des flavanols ont un pouvoir tannant encore plus important que les flavanols eux même.

- L'hydrolyse des principales fractions constitutives de la MCS indique la présence d'acides aminés.

La MCS est donc vraisemblablement constituée de flavanols oxydés auxquels se greffent des composés aminés. Que des fractions de cette MCS de même couleur mais de taille différente aient une composition différentes en acides aminés, indique que ces fractions ne sont pas des polymères d'une même unité de base.

Il faut remarquer que des mécanismes quelque peu similaires ont été constatés dans le cas du thé : l'oxydation des flavanols au cours de la fermentation, conduit à la formation des théaflavines (composés rouge orangé à structure benzotropolone) et des théarubugines (polycondensats bruns à caractère acide de poids moléculaire compris entre 700 et 40000 daltons). Les théarubigines constituent un mélange hétérogène de substances fortement colorées solubles dans l'eau et sont formées par un processus de polycondensation oxydative entre théaflavines, flavoquinones, procyanidols et protéines (METCHE 1988). Cependant, il s'agit de mécanismes enzymatiques nécessitant l'intervention de gallo-flavanols : la formation d'une molécule de théaflavine requiert une molécule de gallocatéchol et une molécule de simple catéchol (ROBERTSON 1983). Le cacao ne contenant pas de gallotanins, les structures formées ne peuvent être similaires.

4. Etude de la matière colorante insoluble

4.1 Facteurs influençant le développement de la MCI

Afin de préciser le type de phénomène mis en jeu lors du développement de la MCI, nous utilisons un procédé conduisant uniquement à une formation de MCI : traitement par l'eau et à température plus ou moins élevée d'une poudre délipidée. L'influence des conditions de traitement sur l'intensité de la matière colorante insoluble est étudiée (I.6.2).

4.1.1 Influence de l'humidité de la poudre

Nous avons vu précédemment qu'un développement important de MCI se produit en traitant du cacao délipidé pulvérulent à chaud et à l'eau mais à condition que ce traitement soit suivi d'un séchage en étuve (III 2.2). Les expériences suivantes sont destinées à déterminer si le développement de la MCI dépend de l'humidité comme ce phénomène peut le faire supposer.

Evolution de la couleur au cours du séchage

Après un traitement à l'eau (humidité : 70 %) et à chaud (95°C, 1 h 30), une poudre délipidée est séchée à l'étuve. Des prélèvements sont effectués tout au long du séchage et sont lyophilisés.

La représentation graphique de l'évolution de la luminance des poudres au cours du séchage (figure 31, annexe 7) révèle qu'effectivement, il n'y a pas d'intensification de couleur au cours des 1 h 30 de traitement. Ce n'est qu'au cours du séchage, lorsque l'humidité devient inférieure à une valeur voisine de 45 % que le brunissement se produit.

Développement de la MCI à différentes humidités

Des poudres délipidées humidifiées à différentes humidités sont traitées dans des conditions identiques de température et de durée (3 h à 60°C).

Ces résultats permettent de déterminer une zone d'humidité (15 à 55 %) en deçà et au delà de laquelle il n'y a pas d'intensification de la couleur (au contraire, un léger éclaircissement se produit).

Le principal effet de l'humidification à chaud du cacao pulvérulent est une baisse de la luminance, l'augmentation du rapport a/b étant beaucoup moins marquée. La baisse de la luminance est maximale pour une valeur d'humidité voisine de 35 % (figure 32, annexe 8).

Il s'agit bien d'une évolution de MCI puisqu'il n'y a pas d'augmentation de MCS (annexe 8).

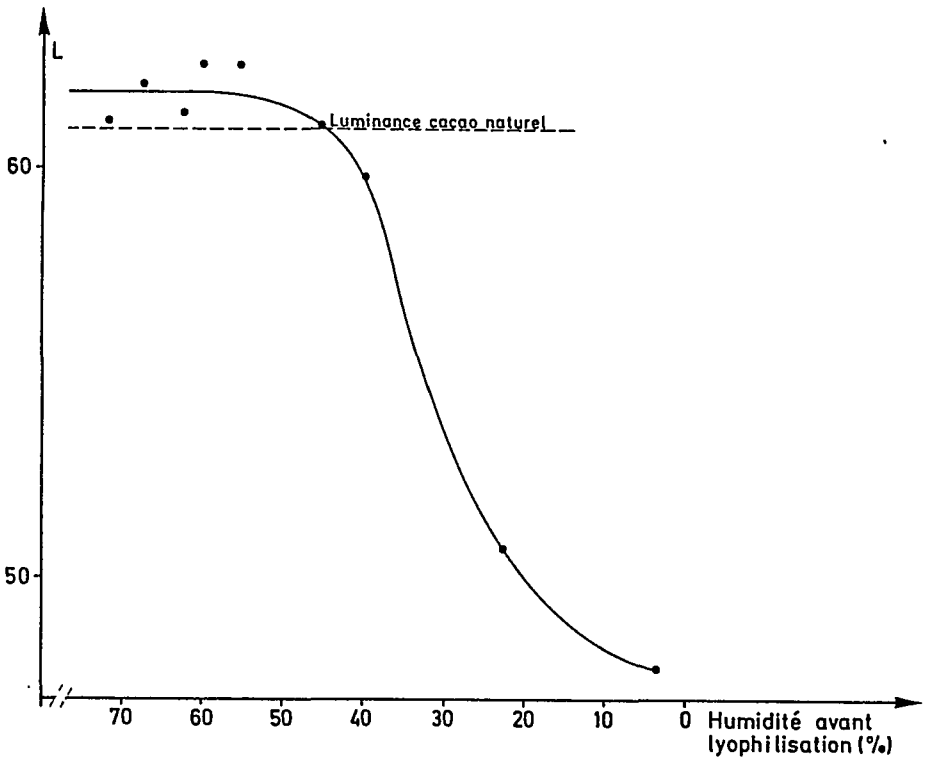


Figure 31: Evolution de la luminance au cours du séchage d'une poudre de cacao délipidé après un traitement hydrothermique

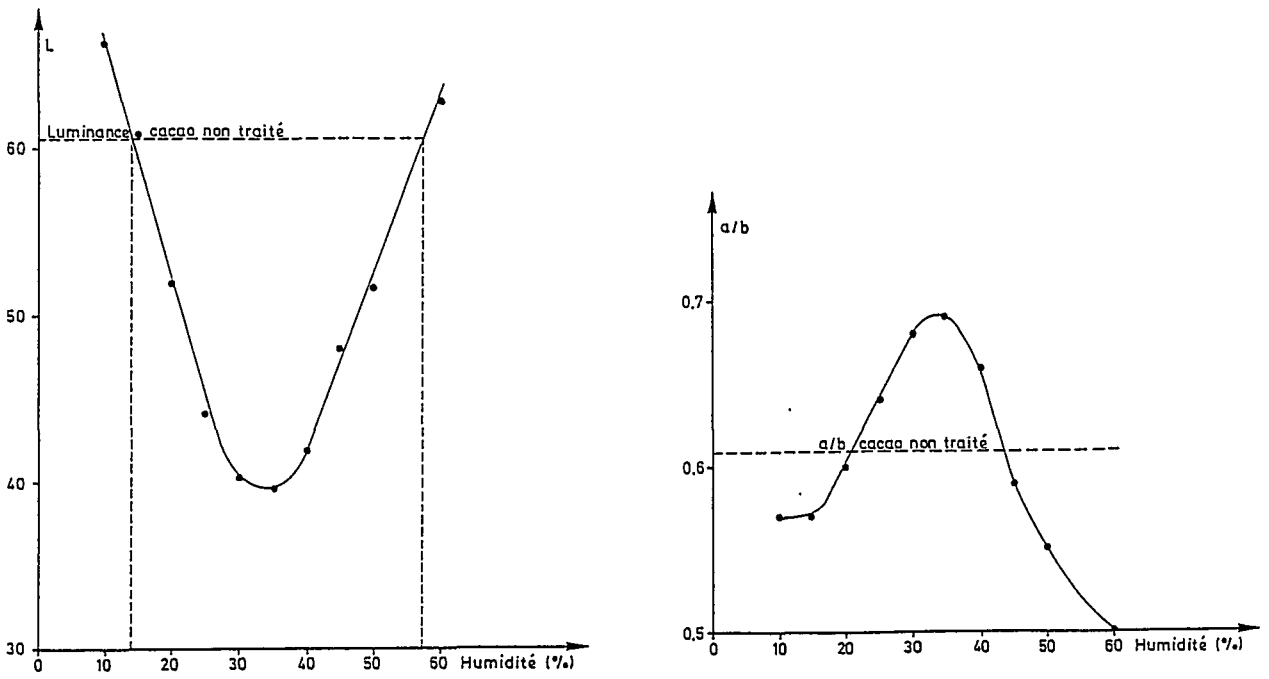


Figure 32 : Couleur d'une poudre de cacao en fonction de l'humidité au cours d'un traitement hydrothermique

4.1.2 Influence de la température

L'humidification à 30 % d'un cacao pulvérulent entraîne une baisse de luminance même à basse température (à 20°C perte de 11 points). Entre 6°C et 80°C, la luminance décroît de façon linéaire (figure 33, annexe 9).

L'augmentation de a/b n'intervient qu'à partir de 40°C. En dessous de cette température, l'humidification provoque un effet contraire.

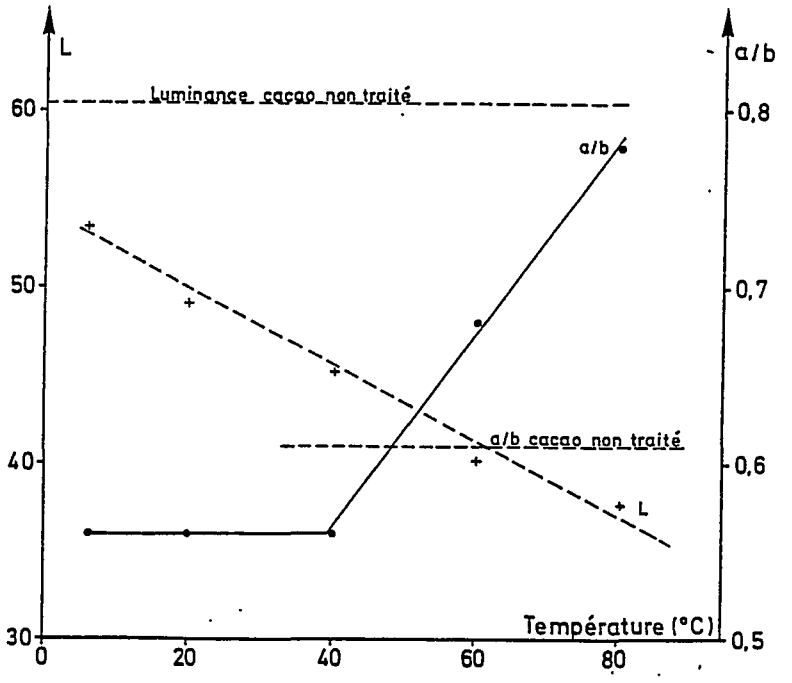


Figure 33 : Couleur d'une poudre de cacao délipidé en fonction de la température utilisée lors du traitement hydrothermique

4.1.3 Influence de la durée de traitement

Le développement de la MCI à 60°C pour une humidité de 30 % est un phénomène très rapide puisque la luminance atteint sa valeur limite en moins de 30 min. Le rapport a/b augmente de façon exponentielle mais cette augmentation est très faible : 0,09 point en sept heures (figure 34, annexe 10).

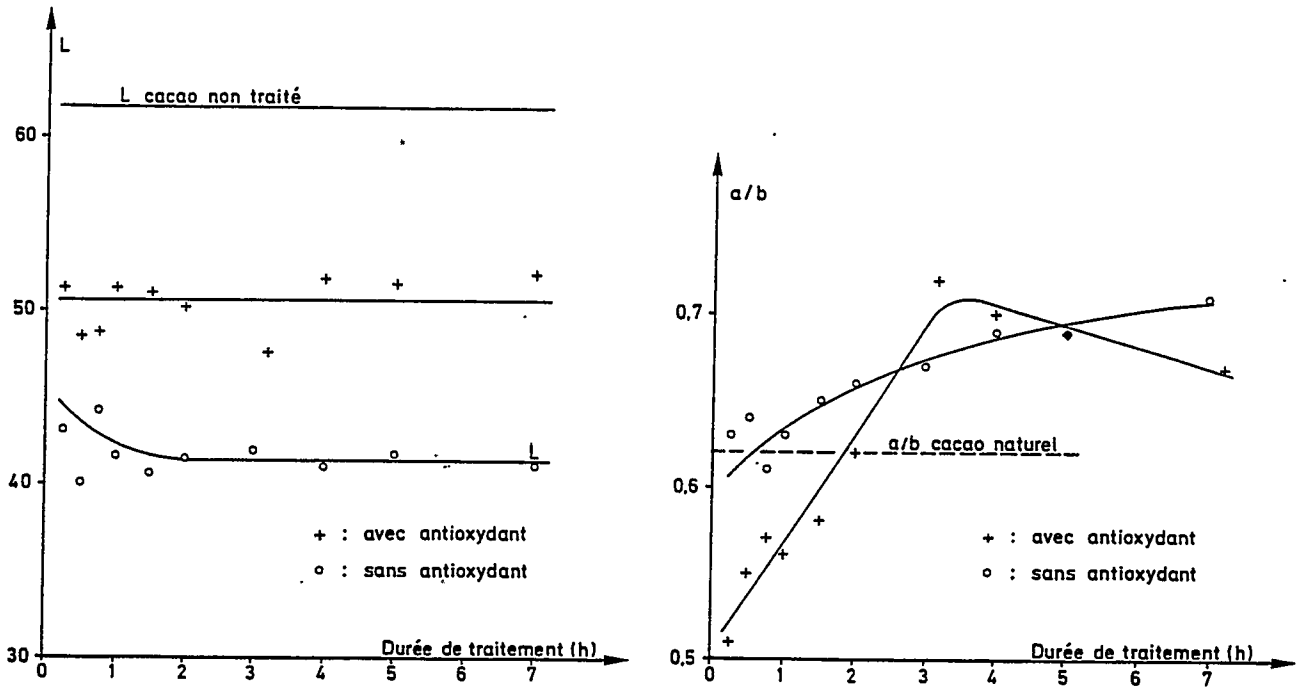


Figure 34 : Evolution de la couleur d'une poudre de cacao délipidé en fonction de la durée de traitement hydrothermique en présence (+) ou non (O) d'un antioxydant

4.1.4 Influence de l'oxygène

Traitement sous azote

Un cacao pulvérulent délipidé est humidifié à 70 % avec une eau dégazée puis séché à 60°C sous un courant d'azote.

Que le traitement ait lieu sous azote ou sous atmosphère ambiante, une baisse de la luminance est observée. La présence d'oxygène résiduel dans le cacao n'est pas à exclure et pourrait être à l'origine de la modification de couleur. Pour vérifier cette hypothèse, cette même expérience a été conduite en présence d'un antioxydant.

Tableau 29 : Rôle de l'oxygène dans le développement de la matière colorante insoluble

	L	a	b	a/b
Cacao non traité	61,0	10,5	17,1	0,61
Traitement sous air ambiant	50,4	12,1	20,3	0,60
Traitement sous azote	53,2	11,5	18,2	0,63

Traitement en présence d'un antioxydant

Une expérimentation est conduite selon les conditions utilisées pour la détermination de l'influence de la durée mais en présence de métabisulfite de sodium (préalablement dissous dans l'eau).

En présence d'un antioxydant, la couleur développée est moins intense ce qui indique que des réactions d'oxydation participent au développement de la couleur insoluble.

4.2 Recherche des précurseurs de la MCI

Le ou les composés de la MCI étant par définition non extractibles, il n'est pas envisageable de procéder à leur analyse directe. Seule la recherche de leurs précurseurs pourra apporter des indications sur leur nature.

Nous nous sommes principalement intéressés aux composés susceptibles d'être à l'origine de phénomènes de brunissement.

Différentes méthodes peuvent être employées pour préciser la participation de tel ou tel composé dans la formation de la couleur insoluble :

- élimination ou supplémentation de certains composés avant traitement et comparaison de la couleur obtenue avec celle d'un témoin ;
- suivi de l'évolution de la teneur en certains composés au cours du traitement.

Rappelons que la présence d'un agent alcalin n'est pas indispensable au développement de la MCI si le traitement est effectué sur cacao pulvérulent mais le devient si le traitement est effectué sur nibs.

4.2.1 Sucres simples

La dégradation thermique, en milieu alcalin, de certains sucres conduit au brunissement des solutions. SHAW et all. (1968) ont étudié la dégradation du fructose en milieu alcalin et la participation de certains composés en résultant à des phénomènes de brunissement non enzymatique. Il faut cependant signaler que les composés bruns isolés par ces auteurs, sont solubles dans l'eau et l'éther ce qui n'est pas le cas de la MCI.

Le cacao fermenté contient environ 1 % de sucres réducteurs, principalement du fructose. Le chauffage d'une solution à 2 % de fructose et 4,6 % de carbonate de potassium prend effectivement une coloration brun-jaune. Aucun précipité ne se produit. Le spectre en lumière visible des solutions après chauffage est différent du spectre de la MCS (figure 35).

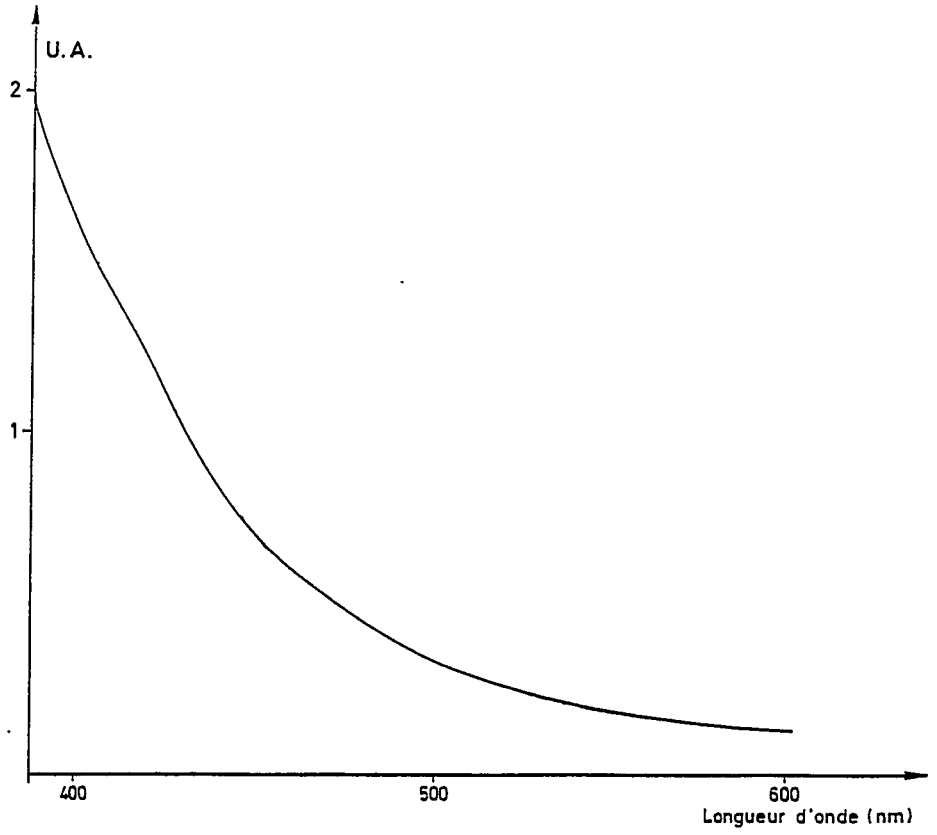


Figure 35 : Spectre d'absorption en lumière visible d'une solution de fructose à 2 % et carbonate de potassium à 4,6 % chauffée pendant 1 h à 80°C

Une supplémentation en fructose de nibs de cacao est effectuée (I.8.1) avant de procéder à une alcalinisation standard (tableau 30). Bien que la teneur en fructose diminue très nettement au cours de l'alcalinisation (38 % pour le non supplémenté et 49 % pour le supplémenté), la coloration finale des poudres de cacao supplémenté, est similaire à celle d'un cacao non supplémenté alcalinisé dans les mêmes conditions. Le fructose ne semble donc pas participer à la formation des produits colorés.

Tableau 30 : Influence d'une supplémentation en fructose sur la couleur des poudres alcalinisées

	Teneur en fructose en g/100g poudre délipidée	L	a	b	a/b
Témoin naturel	0,77	59,7	10,5	18,5	0,57
Supplémenté naturel	1,64	59,9	10,2	18,0	0,57
Témoin alcal.	0,48	51,6	15,0	20,8	0,72
Supplémenté alcal.	0,84	52,0	14,6	20,9	0,70

4.2.2 Sucres simples et acides aminés

La réaction de MAILLARD, réaction de brunissement non enzymatique intervenant lors du traitement thermique de nombreux produits alimentaires, met en jeu les groupements carbonylés des sucres réducteurs et les groupements aminés libres des peptides, protéines et acides aminés.

La vitesse de cette réaction augmente lorsque la température et le pH augmentent. Une telle réaction est donc envisageable dans les conditions d'alcalinisation du cacao bien que sa probabilité diminue lorsque la teneur en eau est forte.

4.2.2.1. Supplémentation en fructose et acides aminés avant alcalinisation des nibs

Nous étudions l'effet d'une supplémentation en acides aminés ou en acides aminés et fructose, sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation (I.8.2). En particulier, un mélange fructose/lysine est utilisé puisque la lysine est d'après AMES (1987), l'acide aminé le plus réactif pour la réaction de MAILLARD :

essai 1 : supplémentation en HIS, ALA, MET, LEU, GLY, LYS
essai 2 : supplémentation en fructose et LYS
essai 3 : supplémentation en fructose et HIS, ALA, MET, LEU, GLY, LYS

Après l'étape de supplémentation, 50 ml d'eau contenant 6,9 g de carbonate de potassium sont ajoutés au nibs et l'alcalinisation est réalisée selon les conditions standard.

La supplémentation avant alcalinisation en acides aminés ou en acides aminés et fructose n'augmente pas le brunissement du cacao : pas de différence notable au niveau des luminances, par contre une légère diminution de l'aspect rouge et de la MCS est observée.

Tableau 31: Effet de la supplémentation en acides aminés et en fructose sur la couleur des cacaos alcalinisés

	L	a	b	a/b	MCS (*)
témoin alcalinisé	51,9	15,5	20,9	0,74	0,92
essai 1 alcalinisé	52,9	14,8	21,5	0,69	0,84
essai 2 alcalinisé	52,5	14,8	21,1	0,70	0,85
essai 3 alcalinisé	53,1	13,9	21,6	0,64	0,74

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

La dégradation des acides aminés en milieu alcalin est un phénomène bien connu. L'analyse par chromatographie liquide haute pression révèle qu'il y a effectivement diminution de la teneur en acides aminés au cours de l'alcalinisation (tableau 32, colonnes 1/2 et 5/6) mais une supplémentation en fructose n'entraîne pas de consommation supplémentaire d'acides aminés (colonnes 3/4) ce qui indiquerait qu'il n'y a pas de réactions de MAILLARD.

Tableau 32 : Dosage des acides aminés libres (en mg/g de poudre délipidée) de différents cacaos supplémentés ou non en fructose et acides aminés, alcalinisés ou non

	1	2	3	4	5	6
	Témoin	Témoin alcal.	Essai 1 alcal.	Essai 3 alcal.	Essai 2 non alc	Essai 2 alcal.
HIS	0,3	0,1	0,6	0,6	0,1	0,1
ALA	1,4	1,2	4,4	4,3	1,2	1,2
MET	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1
LEU	2,2	1,9	6,4	6,3	2,1	2,0
GLY	0,2	0,06	0,2	0,3	0,2	0,08
LYS	0,8	0,6	0,6	0,5	7,0	3,8
ASP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5
GLU	1,3	1,3	1,2	1,3	1,2	1,3
ASN	0,9	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7
SER	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
GLN	0,2	0,05	0,1	0,1	0,2	0,06
THR	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3
ARG	1,1	0,7	0,8	0,9	1,0	0,8
GABA	1,0	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9
TYR	1,0	0,8	0,8	0,9	1,0	0,8
VAL	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1
PHE	1,9	1,4	1,5	1,6	1,8	1,5
ILE	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7
Total	15,9	12,9	21,6	21,7	20,8	16,4

4.2.2.2 Evolution de la teneur en sucres et en acides aminés au cours du traitement hydrothermique de poudres délipidées

Les précédentes déterminations ont été effectuées après alcalinisation de nibs. Nous avons également recherché une consommation particulière de ces deux types de substances lorsque le cacao est placé dans des conditions où seule la MCI se développe : un dosage d'acides aminés et de sucres simples est réalisé par chromatographie liquide haute pression (I.10.9 et I.10.10) sur les cacaos humidifiés à différents degrés (I.6.1).

Le développement de la MCI ne s'accompagne ni d'une diminution des acides aminés libres ni d'une diminution des sucres, ce qui confirme la non intervention de réactions de MAILLARD dans ce phénomène.

Tableau 33 : Teneurs en acides aminés libres et en sucres (en g/ 100 g) des poudres de cacao fermenté délipidé traitées 3 h à 60°C à différentes humidités

Humidité de traitement	Acides aminés libres	Fructose	glucose	saccharose
10 %	1,7	1,1	0,30	0,20
30 %	1,7	1,1	0,30	0,15
35 %	1,6	1,15	0,40	0,15
40 %	1,7			
45 %	1,8	1,3	0,50	0,15
50 %				
60 %		1,2	0,40	0,20
Cacao non traité	1,6	1,1	0,30	0,20

4.2.3 Amidon

Alcalinisation de cacao après diminution de la teneur en amidon par action d'une amylase

Lors des essais enzymatiques (II.4.2.2), il est apparu que l'hydrolyse tout au moins partielle de l'amidon par action d'une amylase, s'accompagne d'une diminution de la coloration développée au cours de l'alcalinisation. Il s'agit d'une diminution de la MCI puisqu'aucune diminution de la MCS n'est observée.

Rq. : cette diminution est surtout nette, lorsque le cacao est préalablement déphénolé. Dans ce cas, l'amylase est nettement plus active (tableau 34).

Tableau 34 : Modifications de couleur observées après alcalinisation avec ou sans hydrolyse enzymatique préalable de l'amidon

	L	a/b	MCS(*)
Délipidé, déphénolé	62,3	0,48	
Délipidé, déphénolé, alcalinisé	35,0	0,80	0,47
Délipidé, déphén., traité amylase	60,1	0,50	
Délip., déphén., traité amyl, alcal.	43,6	0,59	0,44

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

Alcalinisation d'amidon extrait de cacao

Afin de déterminer si l'alcalinisation entraîne une modification de couleur de l'amidon, nous avons recherché une méthode d'isolement de ce composé à partir du cacao (I.9.2), puis nous avons procédé à l'alcalinisation de la fraction obtenue.

Deux solutions sont préparées :

solution témoin : 0,4 g de la fraction amidon et 20 ml d'eau

solution essai : 0,4 g de la fraction amidon, 20 ml d'eau, 0,15 g de carbonate de potassium sont chauffés pendant 10 min. à 70°C.

Alors que le mélange "témoin" est de couleur beige, au cours du chauffage, le mélange "essai" prend une coloration brun rouge intense.

Après centrifugation, le spectre d'absorption en lumière visible du surnageant est identique à celui de la MCS (figure 36) et la partie insoluble est colorée sans que l'on puisse déterminer si cette coloration est due à l'effet du traitement sur l'amidon ou à des phénomènes d'adsorption de la couleur soluble.

Il est peu probable que cette MCS provienne de phénols solubles puisque la fraction amidon extraite à partir de cellules non pigmentées a fait l'objet de plusieurs extractions au méthanol et à l'eau. Cependant, cette fraction contient de nombreux fragments cellulaires sur lesquels certains phénols insolubles pourraient être encore fixés et de ce fait générer des précurseurs de la MCS (phénomène déjà observé au paragraphe 3.1.2.1).

Cette technique d'isolement de l'amidon ne permet donc pas d'obtenir un matériel suffisamment pur pour pouvoir conclure sur son rôle de précurseur de la MCI.

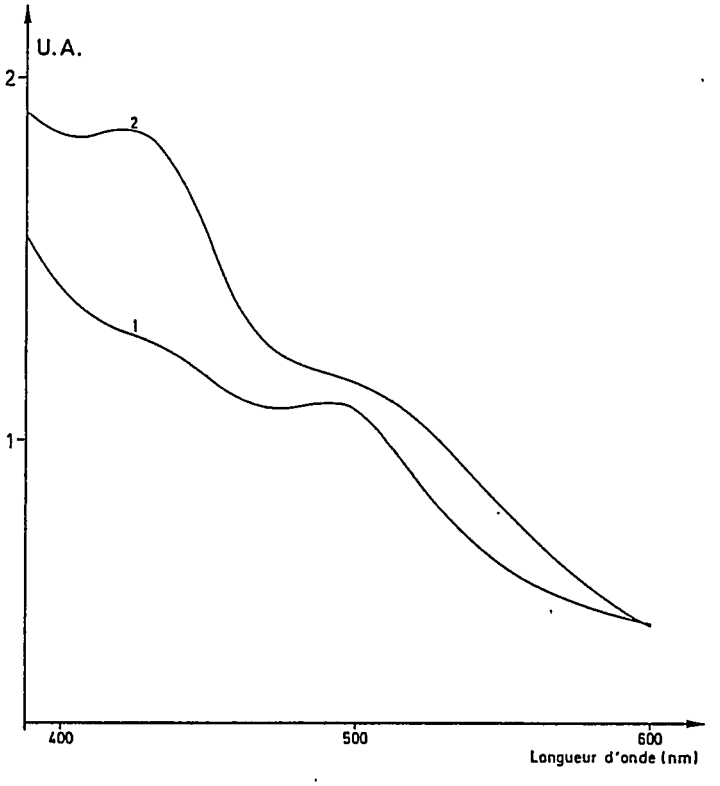


Figure 36 : Spectre d'absorption en lumière visible :

1 : d'une solution aqueuse de matière colorante soluble
2 : du surnageant obtenu après alcalinisation et centrifugation de la fraction "amidon"

Dosage d'amidon avant et après traitement conduisant à un développement de MCI

Nous avons voulu vérifier si le développement de la MCI observé pour certaines poudres obtenues après humidification à chaud d'un cacao pulvérulent délipidé (I.6.1) s'accompagnait d'une variation de la teneur en amidon. Les résultats des dosages montrent qu'aux erreurs d'expérience près, il n'en est rien.

Tableau 35 : Teneur en amidon d'un cacao fermenté avant et après traitement à chaud à différentes humidités

	Teneur en amidon en g/100 g de cacao délipidé
Cacao non traité	9,7
Humidification à 15 %	9,4
" à 35 %	9,6
" à 65 %	9,1

4.2.4 Composés phénoliques

Elimination des composés phénoliques extractibles

Un cacao fermenté et un cacao non fermenté sont humidifiés à 35 % et chauffé pendant 1 h à 60°C. Dans les deux cas, le traitement est effectué sur un cacao pulvérulent délipidé et sur un cacao dont les composés phénoliques solubles ont été préalablement extraits (I.1.6).

Le développement de la MCI est moins important lorsque les phénols extractibles sont préalablement éliminés et ceci est d'autant plus vrai que le cacao est non fermenté, c'est à dire moins riche en phénols insolubles. Les composés phénoliques solubles et insolubles participent donc vraisemblablement au développement de la MCI.

Tableau 36 : Développement de la MCI sur cacao fermenté et non fermenté après élimination ou non des phénols solubles.

	L	a	b	a/b
1 Non ferm. délipidé traité	39,9	9,7	13,4	0,73
2 Non ferm. délipidé déphén. traité	71,3	6,7	22,2	0,30
3 Ferm. délipidé traité	41,3	14,8	19,2	0,77
4 Ferm. délipidé déphénolé traité	55,6	12,8	21,3	0,60

Essai d'élimination de la totalité des composés phénoliques

L'élimination de la totalité des composés phénoliques (solubles et insolubles) d'une poudre de cacao suivie de son traitement hydrothermique doit permettre de vérifier la participation des phénols insolubles dans la formation de la MCI.

Dans le cacao non fermenté, les composés phénoliques sont localisés dans des cellules particulières présentant une taille et une densité différentes de celles des autres cellules, ce qui rend leur séparation

possible. La méthode décrite par BROWN (1954) est employée pour éliminer la quasi totalité des cellules à pigments d'un échantillon de cacao non fermenté délipidé (I.9.1).

Un dosage de théobromine (I.10.5), composé également localisé dans les cellules à pigments, et des phénols (I.10.6) sur la poudre blanche obtenue montre que celle-ci est faiblement "contaminée" par des fragments de cellules à pigments.

Tableau 37 : Teneur en théobromine et en phénols d'un cacao non fermenté, de sa fraction pigmentée et de sa fraction non pigmentée

	Théobromine en mg/g	Phénols en m.e.q. ac.gallique/g
Cacao délipidé	29	121
Fraction "blanche"	8	31
Fraction pigmentée	115	495

Un examen microscopique après coloration à la vanilline chlorhydrique (révélateur des flavanols) confirme la présence de quelques fragments de cellules pigmentées dans la poudre "dépigmentée".

Afin de compléter l'élimination des phénols résiduels (ou tout au moins, des phénols résiduels solubles), une extraction au méthanol aqueux (I.1.6) a été conduite sur la poudre dépigmentée.

Même après élimination des cellules à pigments et des phénols solubles résiduels, le traitement à l'eau uniquement (30 ml d'eau pour 10 g de poudre, à l'étuve 3 h à 80°C) entraîne un brunissement de la poudre de cacao (la MCS, par contre, est négligeable). Cependant ce brunissement est quand même bien moins important que lorsque le cacao n'est pas dépigmenté. Nous pouvons donc en conclure que ces composés phénoliques jouent un rôle prépondérant dans le développement de la MCI.

Il est difficile de savoir si l'élimination des composés phénoliques a été complète (il est possible que des phénols soient fixés à certaines structures cellulaires) et par conséquent de conclure à la participation d'autres types de composés.

Tableau 38 : Couleur de cacao non fermenté, "déphénolé" par extraction ou dépigmenté ou dépigmenté et "déphénolé" ayant subi ou non un traitement hydrothermique

	L	a/b	MCS(*)
Cacao naturel	68,5	0,18	
Cacao traité	49,6	1,08	0,43
Cacao extrait traité	54,7	0,46	0,04
Cacao dépigmenté	78,3	0,16	
Cacao dépigmenté traité	58,2	0,42	0,03
Cacao dépigmenté, extrait	83,4	0,16	
Cacao dépigmenté, extrait, traité	58,3	0,38	0,14

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

Evolution de la teneur en phénols extractibles lors du développement de la MCI

Le dosage des phénols extractibles des poudres ayant subit un traitement thermique (60°C, 3 h) à 25, 35 et 55 % (III 4.1.1) montre qu'il y a bien diminution de ces composés au cours du traitement hydrothermique mais cette diminution n'est pas proportionnelle à la quantité de MCI développée (tableau et annexe 8). En effet, la quantité de phénols de la poudre la plus sombre (35 %) est comparable à celle de la poudre la plus claire (60 %).

Tableau 39 : teneur en phénols extractibles (exprimée en m.equivalent acide gallique / g de poudre délipidée) en fonction du degré d'humidification lors d'un traitement hydrothermique

Humidification	Teneur en phénols
25 %	43
35 %	39
60 %	37
Cacao naturel	55

Dans ces conditions de traitement (absence d'agent alcalin), les phénols extractibles ont vraisemblablement un rôle restreint dans le développement de la MCI.
En tenant compte des résultats des paragraphes précédents, il faut en conclure que ce sont les phénols insolubles qui sont les principaux précurseurs de la MCI.

4.3. Discussion

Nous ne discuterons pas ici de savoir si les MCI développées en présence ou en absence d'agent alcalin sont identiques, les résultats expérimentaux ne permettent pas de faire cette comparaison. Mais surtout, il demeurera impossible de faire cette distinction tant que nous ne saurons pas modéliser la formation de cette MCI

La formation simultanée d'une matière colorante soluble ainsi que l'existence d'une couleur native dans le cacao naturel rendent assez difficile l'étude de l'évolution de la MCI.

Le développement de la MCI est un phénomène dépendant de la teneur en eau au cours du traitement. HEISS R. et EICHNER E. (1971) décrivent des processus de brunissement pour différents produits alimentaires relevant du même type de phénomène : une diminution de la vitesse de réaction se produit à partir d'un certain niveau d'humidité car alors la dilution des composés concernés étant trop forte, les réactions sont beaucoup plus lentes.

Ce type de phénomène de brunissement peut correspondre soit à des réactions enzymatiques soit à des réactions de MAILLARD (réactions non dépendantes de la présence d'oxygène) soit à des réactions d'autoxidation.

Dans le cas de la formation de la MCI, seul le dernier phénomène peut être invoqué. En effet, le brunissement étant d'autant plus intense que la température est élevée, l'intervention de phénomènes enzymatiques est à écarter ; les résultats de l'étude concernant la participation des sucres et des acides aminés indiquent qu'il ne s'agit pas non plus de réactions de caramélisation ou de réactions de MAILLARD. Enfin, les résultats du traitement hydrothermique en présence d'un antioxydant montre l'intervention de processus oxydatifs.

L'élimination des composés phénoliques avant traitement entraîne un développement de coloration insoluble moins important. Il semblerait que ce soit surtout les composés phénoliques insolubles qui participent au développement de la MCI. En effet, le développement de la MCI est minimale lorsque les phénols insolubles sont éliminés. D'autre part, après un traitement thermique de poudres délipidées placées à différentes humidités, la teneur en phénols extractibles de la poudre la plus sombre n'est pas plus faible que celle de la poudre la plus claire.

L'extraction des composés phénoliques n'a jamais permis l'inhibition complète du développement de la MCI. Il est donc difficile de déterminer si d'autres composés interviennent ou si les extractions n'étaient pas complètes.

Les résultats concernant la participation éventuelle de l'amidon restent difficilement explicables : l'hydrolyse enzymatique préalable de l'amidon diminue la quantité de MCI formée au cours de l'alcalinisation ce qui laisserait penser que ce composé est un précurseur de la MCI. Mais cette hypothèse est infirmée par le fait que la formation de MCI ne s'accompagne pas d'une diminution de la quantité d'amidon présente.

L'étude du développement de la MCI au cours d'un traitement hydrothermique a révélé qu'un tel traitement, réalisé dans les conditions optimales de développement de la couleur, aboutit à des teintes beaucoup plus intenses que les celles obtenues après une alcalinisation classique. D'autre part, ce traitement présente également l'avantage d'être plus rapide et plus économique (quantité d'eau utilisée moins importante, température plus basse, pas d'agent alcalin). Dans l'hypothèse où les poudres obtenues présentent des qualités organoleptiques comparables à celles des poudres de cacao alcalinisé, une application industrielle pourrait être envisagée.

CONCLUSION

CONCLUSION

La majorité des poudres de cacao employées pour la fabrication des produits chocolatés doivent leur coloration brun rouge à un traitement particulier correspondant à une étape d'alcalinisation. Ce procédé industriel est utilisé empiriquement depuis plus d'un siècle. L'objectif de notre travail a été d'étudier la coloration développée au cours de cette opération à la fois sur un plan technologique et sur un plan chimique.

L'**étude technologique** a été réalisée afin de déterminer l'influence des variations des paramètres du procédé sur la couleur développée, en gardant en mémoire l'un des principaux objectifs des industriels, à savoir l'obtention de poudres très foncées.

Cette étude montre que la quantité de couleur susceptible de se développer n'est pas entièrement exploitée lorsque le traitement est réalisé sur nibs. En effet, pour des conditions de traitement comparables, les couleurs obtenues sont plus intenses lorsque l'alcalinisation est réalisée sur tourteaux. La surface spécifique plus importante ainsi que la plus faible teneur en matière grasse qui fait obstacle à la diffusion de la solution alcaline sont vraisemblablement responsables de ce phénomène.

L'alcalinisation de nibs reste le procédé industriel le plus apprécié. Les essais d'amélioration de la pénétration de la solution alcaline au sein du grain, tels que l'alcalinisation sous surpression de gaz, l'infiltration de la solution après création d'un vide partiel, l'utilisation d'un émulsifiant, les tentatives d'augmentation de la perméabilité des nibs par un traitement amylasique ou cellulasique ou par une incubation en présence de Saccharomyces cerevisiae n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

Cependant, il est possible d'intensifier la couleur en augmentant la durée de traitement ou la quantité d'agent alcalin mais pour des impératifs de production et de législation, les possibilités de variation de ces deux paramètres sont assez réduites.

L'augmentation de la température de réaction, également limitée pour ne pas nuire à la qualité aromatique du produit, permet aussi d'obtenir des couleurs plus sombres. Cependant, à partir d'une certaine valeur, ce brunissement ne s'accompagne plus d'une augmentation de l'aspect rouge comme c'est le cas pour tous les autres paramètres mais au contraire d'un jaunissement. Ce jaunissement est aussi constaté au cours de la torréfaction. Dans ce cas, il ne s'agit pas d'une dégradation de la couleur développée puisque la couleur finale est la même que la torréfaction ait lieu avant ou après alcalinisation. Il n'y a pas non plus dégradation de couleur au cours de l'étape de séchage.

Il est possible d'intensifier la nuance rouge en augmentant le degré d'oxygénation ce qui peut être réalisé en modifiant soit la pression d'air, soit la qualité de l'atmosphère, soit la quantité d'eau utilisée.

A l'exception de l'oxyde de magnésium qui donne des poudres plus foncées aucun des autres agents alcalins testés ne présentent d'intérêt particulier par rapport au carbonate de potassium.

Une amélioration de l'efficacité de la solution alcaline peut être réalisée en soumettant le cacao à une désacidification préalable.

Des essais enzymatiques ont été réalisés soit en préparation soit en remplacement d'une alcalinisation. L'inhibition des enzymes par les tanins présents dans le cacao, phénomène vérifié dans le cas de l'amylase, rend inefficace l'utilisation de tels procédés.

L'**étude chimique** a mis en évidence l'existence de deux types de composés colorés développés au cours de l'alcalinisation.

- Des composés brun rouge hydrosolubles

Leur formation ne peut se produire qu'en présence d'un agent alcalin. Leur solubilité et l'intensité de leur coloration augmente avec le pH.

Des processus oxydatifs faisant intervenir les flavanols extractibles conduisent au développement de cette couleur soluble. Au cours de l'alcalinisation, des composés phénoliques non extractibles libèreraient également des précurseurs.

Ces processus oxydatifs aboutissent vraisemblablement à des phénomènes de polycondensation dans lesquels sont impliqués les flavanols oxydés ainsi que des composés aminés (acides aminés, peptides ou protéines).

Ces différentes fractions (au moins six mais certainement plus) sont caractérisées par des poids moléculaires différents et des spectres d'absorption dans le visible identiques. Chaque fraction correspondrait à un degré de condensation plus ou moins élevé.

- Des composés bruns non extractibles

La présence d'un agent alcalin n'est pas indispensable à leur développement à condition toutefois que le cacao soit broyé. Dans ces conditions, la formation de cette couleur insoluble est très dépendante de l'humidité de la poudre : elle est maximum pour une humidité voisine de 35 %. Pour cette valeur, le développement est un phénomène très rapide qui s'intensifie lorsque la température augmente mais qui n'est pas négligeable à température ambiante.

Les mécanismes de développement de cette couleur impliquent également la présence d'oxygène. Les précurseurs sont vraisemblablement des composés phénoliques, en particulier des phénols insolubles.

Un traitement effectué dans les conditions optimales de développement de cette coloration conduit à des poudres nettement plus foncées que les poudres obtenues après une alcalinisation classique. Ce traitement présente également l'avantage d'être plus rapide et plus économique (moins d'eau, température plus basse).

A notre connaisance, aucune étude complète tant sur l'influence des paramètres de traitement que sur les mécanismes mis en jeu n'a été

publiée. Ce travail a permis d'une part de vérifier certains phénomènes déjà observés empiriquement au niveau industriel et d'autre part, d'établir les bases des voies de recherche nécessaires à une meilleure compréhension de la réaction d'alcalinisation, en particulier au niveau de la connaissance de la nature des matières colorantes et de leurs voies de synthèse.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Evolution de la couleur d'un cacao alcalinisé en fonction de la durée d'alcalinisation

Durée	L	a	b	a/b
Cacao naturel	62,2	10,8	18,5	0,5
0,5 h	53,3	11,6	20,1	0,58
1 h	53,6	13,2	20,5	0,64
2 h	52,1	15,1	20,5	0,74
3 h	50,2	16,0	19,9	0,80
4 h	48,0	16,2	19,3	0,84
5 h	47,3	16,5	19,1	0,86
6 h	45,9	16,4	18,8	0,87
7 h	45,3	16,6	18,8	0,88
8 h	43,7	16,7	18,6	0,90

Annexe 2 : Influence de la température utilisée au cours de l'alcalinisation de nibs sur la couleur de la poudre obtenue

Température	L	a	b	a/b
30°C	56,2	10,6	23,8	0,45
60°C	54,9	12,2	23,0	0,53
90°C	53,9	14,9	21,2	0,71
120°C	51,2	15,9	22,5	0,71
150°C	49,0	15,6	23,9	0,65

Annexe 3 : Influence de la quantité d'eau utilisée (exprimée en % par rapport à la masse de cacao) au cours de l'alcalinisation sur la couleur de la poudre obtenue

eau	L	a	b	a/b
10 %	54,8	11,9	21,5	0,55
30 %	52,9	14,2	21,4	0,66
50 %	51,7	15,8	22,0	0,72
80 %	51,3	16,0	21,1	0,76
100 %	50,0	16,8	20,9	0,80

Annexe 4 : Influence de la quantité de carbonate de potassium (exprimée en % par rapport à la masse de cacao sec et dégraissé) utilisée au cours de l'alcalinisation sur la couleur de la poudre obtenue

Carbonate de potassium	L	a	b	a/b
Cacao naturel	62,2	10,8	18,5	0,58
0 %	57,8	12,5	20,4	0,61
2 %	54,8	14,0	21,1	0,66
4 %	53,3	15,1	21,4	0,70
6 %	51,2	16,0	21,4	0,75
8 %	48,6	15,7	20,5	0,77
10 %	44,8	16,3	18,9	0,86

Annexe 5 : Influence d'une surpression d'air ou d'azote utilisée pendant l'alcalinisation sur la couleur de la poudre obtenue

Surpression	L	a	b	a/b
0 bar-air	53,9	14,9	21,2	0,70
2 bars-air	51,2	16,3	21,3	0,76
4 bars-air	50,3	16,5	20,7	0,80
6 bars-air	50,7	16,7	21,1	0,79
4 bars-azote	53,5	15,0	21,7	0,69

Annexe 6 : Influence du pH de cacaos naturels et alcalinisés sur leur couleur

	L	a	b	a/b	pH
1 naturel	62,7	10,5	14,9	0,71	5,62
1 alcalinisé	50,6	16,7	18,1	0,92	8,18
2 naturel	63,9	10,4	12,1	0,86	5,10
2 alcalinisé	53,5	15,6	17,7	0,88	7,73
3 naturel	61,7	9,9	16,8	0,59	5,80
3 alcalinisé	51,6	15,1	20,4	0,74	8,19
4 naturel	67,2	10,6	19,3	0,55	5,05
4 alcalinisé	57,0	15,6	21,6	0,72	7,55
5 naturel	66,7	10,2	16,1	0,63	4,56
5 alcalinisé	58,2	13,6	18,5	0,73	6,91

Annexe 7 : Evolution au cours du séchage de la couleur d'un cacao délipidé ayant subi un traitement hydrotermique

Humidité avant lyophilisation	L	a	b	a/b	Temps de séchage
71,4 %	61,2	11,1	18,1	0,61	0 h
66,8 %	62,1	10,5	17,7	0,59	1 h 10
62,9 %	61,4	10,4	17,3	0,60	2 h
59,6 %	62,6	10,3	17,3	0,59	2 h 35
54,4 %	62,6	9,9	16,4	0,60	3 h 20
44,8 %	61,1	10,0	16,2	0,62	4 h 10
39,7 %	59,8	10,4	16,7	0,62	4 h 45
22,6 %	50,7	11,6	17,0	0,68	5 h 15
	47,6	12,3	18,0	0,68	16 h 00
Non traité	61,0	10,5	17,1	0,61	

Annexe 8 : Influence de l'humidité utilisée au cours du traitement hydrothermique d'un cacao délipidé sur la couleur de la poudre obtenue

Humidité au cours du traitement	L	a	b	a/b	MCS(*)
10 %	66,2	9,2	16,0	0,57	0,42
15 %	60,8	10,7	18,6	0,57	
20 %	51,9	13,0	21,5	0,60	
25 %	44,1	14,7	22,9	0,64	
30 %	40,3	15,6	22,9	0,68	0,40
35 %	39,6	15,3	22,3	0,69	0,36
40 %	41,9	14,3	21,6	0,66	
45 %	48,0	12,8	21,7	0,59	
50 %	51,6	12,2	22,1	0,55	0,34
60 %	62,7	10,3	20,7	0,50	0,37
Cacao non traité	60,5	10,0	16,3	0,61	0,73

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

Annexe 9 : Influence de la température utilisée au cours du traitement hydrothermique d'une poudre de cacao délipidé sur la couleur finale obtenue

Température	L	a	b	a/b	MCS(*)
6°C	53,9	11,2	19,9	0,56	
20°C	49,1	12,6	22,4	0,56	
40°C	45,3	13,7	24,5	0,56	
60°C	40,3	15,6	22,9	0,68	0,40
80°C	37,6	17,3	22,2	0,78	0,33
Cacao non traité	60,5	10,0	16,3	0,63	0,73

(*) : exprimée en unité d'absorbance à 500 nm

Annexe 10 : Evolution de la couleur d'une poudre de cacao délipidé au cours d'un traitement hydrothermique

Durée de traitement	L	a	b	a/b
0 h 15	43,1	13,4	21,4	0,63
0 h 30	40,5	14,0	21,8	0,64
0 h 45	44,2	13,3	21,7	0,61
1 h	41,6	13,9	22,1	0,63
1 h 30	40,6	13,9	21,4	0,65
2 h	41,4	14,2	21,6	0,66
3 h	41,9	14,8	22,1	0,67
4 h	40,9	15,3	22,0	0,69
5 h	41,7	15,2	22,0	0,69
7 h	41,1	15,7	22,1	0,71
Cacao naturel	61,7	10,0	16,1	0,62

Annexe 11 : Evolution de la couleur d'une poudre de cacao délipidé au cours d'un traitement hydrothermique en présence d'un antioxydant.

Durée de traitement	L	a	b	a/b
0 h 15	51,3	13,4	26,1	0,51
0 h 30	48,5	14,5	26,1	0,55
0 h 45	48,7	14,4	25,3	0,57
1 h	51,3	13,5	24,3	0,56
1 h 30	51,0	13,3	23,0	0,58
2 h	50,2	13,6	22,0	0,62
3 h	47,6	13,2	18,2	0,72
4 h	51,8	12,4	17,6	0,70
5 h	51,7	12,5	18,0	0,69
7 h	52,1	13,0	19,4	0,67
Cacao naturel	61,7	10,0	16,1	0,62

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ABO-BAKR T., SHEKIB L. 1987. Studies on cocoa beans (Theobroma cacao L.). Effect of some processes on the microstructure and colour of beans. Lebensm. Unters. Forsch., 184, 271-273.

AMES J. 1987. The Maillard reaction. Food, September, 67-72.

AMES J. 1988. The Maillard browning reaction. An update. Chemistry and industry, September, 558-561.

ANDREUX F., GOLEBJOWSKA D., METCHE M. 1979. Polymérisation oxydative des o.diphénols en présence ou non d'amino acides cas des systèmes (catechol-glycocolle) et (catéchol-diglycine). Journées internationales d'étude du groupe polyphénols, Logroño , 9, 178-188.

ASANO K., OHTSU K., SHINAGAWA K., HASHIMOTO N. 1984. Affinity of proanthocyanidins and their oxidation products for haze-forming proteins of beer and the formation of chill haze. Agric. Biol. Chem., 48, 1139-1146.

BAREL M., GUYOT B., VINCENT J.C. 1983. Les fractions protéiques du cacao avant et après torréfaction. Influence de la torréfaction. Café, Cacao, Thé , 27, n° 2, 127-144.

BASTIDE P. 1987. Evolution et métabolisme des composés phénoliques des fèves de cacáo durant leur développement au cours de la croissance et de la maturation du fruit de Theobroma cacao L.. Thèse Doct. 3ème cycle physiologie et biologie des organismes et des populations, Montpellier, 147 p.

BIANCHI J. 1987. Etude de la matière colorante développée au cours de l'alcalinisation du cacao. Diplôme d'études approfondies, sciences alimentaires, Montpellier, 22 p.

BRADFORD M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72, 248-254.

BROWN H. B. 1954. Separation of pigment cells of cacao. Nature, 173, 492.

CALDERON P., VAN BUREN J., ROBINSON W.B. 1968. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. J. Agr. Food Chem., 16, 3, 479-482.

CATTELL D.J., NURSTEN H.E. 1976. Fractionation and chemistry of ethyl acetate-soluble thearubigins from black tea. Phytochemistry, 15, 1967-1970.

CHAPON L., CHEMARDIN M. 1963. Rôle des tannoides de l'orge dans la génèse des troubles des bières. Proceeding of congress. European Brewery Convention, 182-196.

CHAVAN J.K., KADAM S.S., GHONSIKAR C.P., SALUNKHE D.K. 1979. Removal of tannins and improvement of in vitro protein digestibility of sorghum seeds by soaking in alkali. J. Food Sci., 44, 1319-1321.

CILLIERS J. J.L., SINGLETON V. L. 1989. Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. J. Agric. Food Chem., 37, 890-896.

CLARKE W.T. 1949. Chocolate and cocoa. Kirk-Othmer : Encyclopedia of chemical technology, Wiley, New York, 3, 889-917.

COOK R., MEURSING E.H. 1982. Chocolate, Production and Use. Harcourt Brace Jovanovich, New York.

DERDELINCKX G. 1986. Dépolymérisation et polymérisation de flavanols au cours du brassage.Thèse, Sciences agronomiques, Université catholique de Louvain, 106 p.

FORSYTH W.G. 1952. Cacao polyphenolic substances Biochem. J., 51, 511-520.

FORSYTH W.G. 1955. Cacao polyphenolic substances III. Separation and estimation on paper chromatograms. Biochem. J., 60, 108-111.

FORSYTH W. G., QUESNEL V.C. 1957. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. J. Sci. Food Agric., 8, n° 9, 505-509.

GEERTS J.P., KNOL T. 1984. The flavonoids and their influence on the colour of cocoa : a review. Scientific Journal of International Office of cocoa and chocolate, Manufacturing Confectionner Publishing Co, New York.

GRAMSHAW J. W. 1967. Phenolic constituents of beer and brewing materials. The role of polyphenols in the formation of non biological haze. Journal of the Institute of Brewing, 73, 455-471.

GRIFFITHS L.A. 1958. Phenolic acids and flavonoids of Theobroma cacao L. Separation and identification by paper chromatography. Biochem. J., 70, 120-125.

GRIFFITH L. A. 1960. A comparative study of the seed polyphenols of the genus Theobroma. Biochem. J., 74, 362-365.

HAMANN Y., TISSE C., ESTIENNE J. 1984. Etude de la teneur en théobromine par chromatographie liquide haute performance des fèves de cacao. Ann. Fals. Exp. Chim., 828, 271-276.

HATHWAY D.E., SEAKINS J. W. T. 1955. Autoxydation of catechin. Nature, 176, 218.

HATHWAY D.E., SEAKINS J.W.T. 1957. Autoxydation of polyphénols. Part III. Autoxydation in neutral aqueous solution of flavans related to catechin. Journal of the chemical society, 1562-1566.

HEISS R., EICHNER K. 1971. Moisture content and shelflife, part I. Food Manufacture, 46, 5, 53-56.

HEISS R., EICHNER K. 1971. Moisture content and shelflife, part II. Food Manufacture, 46, 6, 37-42.

JALAL M.A.F., COLLIN H.A. 1977. Polyphenols of mature plant seedling and tissue cultures of Theobroma cacao. Phytochem., 16, 1377-1380.

JERUMANIS J., VAN HUYNH N., MULKAY P., DEVREUX A. 1979. Oxydation enzymatique de flavonoides. Journées internationales d'étude du groupe polyphénols, Logroño, 9, 189-199.

JONES K.L., JONES S.E. 1984. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. Progress in industrial microbiology, 19, 413-432.

KEENEY P.G. 1972. Various interactions in chocolate flavor. J. Amer. Oil Chem. Soc., 49, 567-572.

KIM H., KEENEY P.G. 1984. (-)Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. J. Food Sci., 49, 1090-1092.

MARIGO G. 1973. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. Analusis, 2, 106-110.

MARTIN R.A. Jr. 1987. Chocolate. Advances in food Research, 31, 211-342

MAYER A.M. 1979. Polyphenol oxydases. Enzymes in search of a function Journées internationales du groupe polyphénols. Logroño, 9, 161-169.

METCHE M. 1980. Tanins, nature et propriétés. Journées internationales d'étude du groupe polyphénols, Neuchâtel, 10, 11-31.

METCHE M. 1986. Oxydation de substrats polyphénoliques et qualité des produits alimentaires. Importance des intermédiaires quinoniques. Journées internationales d'étude du groupe polyphénols, Montpellier , 13, 292-298.

METCHE M. 1988. Rôle des flavonoides dans les aliments. Journées internationales d'étude du groupe polyphénols, St Catherines, 14, 119-129.

MERMET G. 1985. Etude des procyanidines de la fève de Theobroma cacao L. Recherche d'un marqueur chimique végétal. Diplôme d'Etudes Approfondies, sciences alimentaires, Montpellier, 34 p.

MERMET G. 1989. Cacao : influence des paramètres de torréfaction sur la consommation des précurseurs d'arôme et la formation de quelques composés volatils. Thèse, Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire option Sciences Alimentaires, Montpellier, 136 p.

MINIFIE B.W. 1989. Chocolate, cocoa and confectionery. Science and Technology. Third edition. Van Nostrand Reinhold, New York.

MOHOS F. A., SZEKELY P. 1969. Quelques données sur les modifications chimiques des fèves de cacao au cours des traitements. II. Edesipar, 20, n° 6, 161-168.

MOTODA S. 1982. Enzymic treatment of cocoa, coffee and tea with polyphenol oxydase. Journal of the Japanese Society of Food Science and technology, 29, n° 1, 11-15.

MORETON R. S. 1985. Inactivation of cocoa seeds after treatment by heat acetic acid and ethanol. J. Food Tech., 20, 79-82.

NUYKEN-HAMELMANN C., MAIER H.G. 1987. Lebensm. Unters. Forsch., 185, 114-110.

OBIAKOR E.K., NWANKO S.I. 1977. Proc. 5th in. Cocoa Res. Conf., Ibadan, Chl., 568-573.

PERRY F. 1964. Cocoa powder : alkalising, pulverising and tempering processes. Confectionery production, 4, 271-273.

PERRY F. 1965. Alkalisation and the manufacture of cocoa powder Confectionery production, 7, 537-539.

PORTER L.J. 1986. Communication personnelle.

QUESNEL V.C., ROBERTS J.B. 1963. Aromatic acids of fermented cacao Nature, 199, 605-606.

QUESNEL V.C. 1965. Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation J. Sci. Food Agric., 16, 441-447

QUESNEL 1968. Fractionation and properties of the polymeric leucocyanidins of the seeds of Theobroma cacao. Phytochem., 7, 1583-1592.

QUESNEL V.C., JUGMOHUNSINGH K. 1970. Browning reaction in drying cacao J. Sci. Food Agric., 21, 537-541.

REEVES S.G., Mc DOWELL I., BEHN K., DENCH J. 1988. Biochemical studies of cocoa bean o-diphénol O2 oxydoreductase (catechol oxidase). Food chemistry, 29, 209-219.

REINECCIUS G.A, ANDERSEN D.A., KAVANAGH T., KEENEY P.G. 1972. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. Agric. Food Chem., 20, 199-206.

RIBEREAU-GAYON P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod éd., Paris, 254 p.

RICHARDSON T. 1982. Cocoa : alkalized, dutched, natural and black. Manufacturing confectioner, October, 50-51.

RIEDEL R. H. 1986. Von allen gesucht : rôtliches Kakaopulver. Kakao und Zucker, 9, 20-23.

ROBERTS E.A.H. 1962. Economic importance of flavonoid substances. In The chemistry of flavonoids compounds. Geissman, T.A., ed.. Pergamon Press, Oxford, 666 p.

ROBERTSON A. 1983. Effects of physical and chemical conditions on the in vitro oxidation of the tea leaf catechins. Phytochemistry, 22, 889-896.

SEIKI K. 1973. Chemical changes during cocoa bean fermentation using the tray method in Nigeria. Rev. Int. Choc., 28, 38-42.

SCHENKEL H.J. 1973. Farbildung im Kakao während des Aufschliessens. Gordian, 73, 343-356.

SCHMIEDER R.L., KEENEY P.G. 1980. Characterization and quantification of starch in cocoa beans and chocolate products. J. Food Sci., 45, 555-563.

SHAW P.E., TATUM J.H., BERRY R.E. 1968. Base-catalyzed fructose degradation and its relation to nonenzymic browning. J. Agr. Food Chem., 16, 6, 979-982.

TANERI C.E. 1977. Chocolate liquor dutching. The manufacturing Confectioner, September, 57-58.

THOMPSON R.S., JACQUES D., HASLAM E., TANNE R.J.N. 1972. Plant procyanidins. Part I. Introduction, the isolation, structure and distribution of plant procyanidins. J.Chem.Soc, Perkin Transactions, 1387-1399.

VILLENEUVE F. 1982. Les composés phénoliques de la fève de cacao : Theobroma cacao L. Evolution au cours de la fermentation. Thèse doct. 3ème cycle sciences agronomiques, option phytotechnie, Montpellier, 109 p.

VILLENEUVE F., CROS E., MACHEIX J.J. 1985. Effet de la fermentation sur les activités peroxydasiques et polyphénoloxydasique de la fève de cacao. Café, cacao, thé, 29, n° 2, 113-120.

VILLENEUVE F., CROS E., VINCENT J.C., MACHEIX J.J. 1989. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. Café, cacao, thé, 23, n° 3, 165-169.

WEISSBERGER W., KAVANAGH T.E., KEENEY P.G. 1971. Identification and quantitation of several non volatile organic acids of cocoa beans. J. Food Sci., 36, 877-879.

WOJCIK S., WARZECHA S. 1971. Amélioration de la couleur de la poudre de cacao grâce à un traitement à la vapeur et à un séchage sans addition de produits étrangers ni baisse de qualité. I. Prezemysl spozywczy, 6, 264-266.

WOJCIK S., WARZECHA S. 1973. Amélioration de la couleur de la poudre de cacao grâce à un traitement à la vapeur et à un séchage sans addition de produits étrangers ni baisse de la qualité. II. Prezemysl spozywczy, 2, 73-77.

WOOD G.A.R., LASS R.A. 1987. Cocoa. 4ème édition, Longman Scientific and technical, New york, 620 p.

ZAK D.L. 1973. Studies on the proteins of cocoa beans, the Pennsylvania State University, Ph. D.

ZOUBCHENKO A., GOROKHOVA P., SOLOMONOVA L. 1979. Modification des composés phénoliques du cacao râpé au cours du tempérage et de l'alcalinisation. Izvestija vyssikh Ucebnykh Zavedenÿ. Piscevaja Tekhnologija, n°6, 126-127.

BREVETS

Patent specification, 1 247 959, GB. Pub. 29 sept. 1971. Improvements in or relating to the treatment of cocoa beans. Carle & Montanari S.p.A., I.

Patent, 75 037 742, JP. Pub. 4 déc. 75. Coffee, cocoa and chocolate production by enzymatic method. Agency of ind. Sci. Tech., JP.

Patent, 3 997 680, US. Pub. 14 déc. 76. Method of dutching cocoa. Imperial Chemical Industries Limited, GB. CHALIN M.L.

Patent specification, 1 496 087, GB. Pub. 21 déc. 77. Method of dutching cocoa. CHALIN M.L.

Patent, 54 143 561, JP. Pub. 11 août 79. Enzymic browning of cacao and coffee beans. Morinaga & Co LTD

Patent, 4 343 818, US. Pub. 10 Aout 82. Cocoa product and process of preparation. Société d'assistance technique pour produits NESTLE S.A., CH. EGGEN I.B.

Patent, 82 037 301, JP. Pub. 08 sept. 82. Enzymic browning of cacao and coffee beans. Morinaga & Co LTD, JP.

Patent, 4 349 579, US. Pub. 14 Sep. 82. Process for solubilizing cocoa. Société d'assistance technique pour produits NESTLE S.A., CH. RABOUD P-B, KUBICEK F., BANDI J.P

Patent, 4 435 436, US. Pub. 6 mars 84. Alkalized cocoa powders and foodstuffs containing such powders. Cacaofabrik DE ZAAN B.V., NL. TERINK J. L.

Patent application, 0 187 415, EP. Pub. 16 juil. 86. Cocoa powder. Cacaofabrik DE ZAAN B.V., NL. KATTENBERG H. R.

Demande de brevet, 0 226 727, EP. Dép. 27 Sep. 86. Pub 01 Jui. 87. Procédé d'alcalinisation du cacao en phase aqueuse. Société des produits NESTLE, CH. WISSGOTT U.

Offenlegungsschrift, 3 641 016, DE. Pub. 9 juin 88. Verfahren und Vorrichtung zum Verarbeiten von bohnenartigem Gut, insbesondere Kakaobohnen. Bauermeister, D. HAUCK H., SCHMITZ W., GRAALFS E., WEHNERT W., DORING W., REICHERT H.

Patent, 4 758 444, US. Pub. 19 juil. 88. Process for the processing of cocoa beans. Meiji Seika Kaisha, Ltd, JP. TERAUCHI M., SUZUKI G.

Patent, 4 784 866, US. Pub. 15 nov. 88. Process of Alkalization of cocoa in aqueous phase. Nestec S.A., WISSGOTT U.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Page

Introduction.....3

Généralités.....4

1. Quelques données économiques.....4

2. Du cacaoyer au cacao marchand.....5
   2.1 La fermentation.....5
   2.2 Le séchage.....6

3. Utilisation du cacao marchand.....10

4. Le procédé d'alcalinisation.....12
   4.1 Origine et définition.....12
   4.2 Conséquences du procédé.....12
   4.3 Législation.....13
   4.4 Les différentes technologies.....13
   4.5 Influence de la variation des paramètres d'alcalinisation sur la couleur finale des poudres.....15
   4.6 Effets de l'alcalinisation sur la composition chimique...16
   4.7 Autres procédés de modification de couleur.....17
      4.7.1 Traitements à l'eau.....17
      4.7.2 Traitements enzymatiques.....18

I. Matériel et méthodes.....19

1. Préparation des échantillons de travail.....19
   1.1 Matière première.....19
   1.2 Préparation des nibs.....19
   1.3 Préparation des poudres.....19
   1.3 Préparation des tourteaux.....19
   1.5 Préparation des poudres délipidées.....19
   1.6 Préparation des poudres déphénolées.....19

2. Techniques d'alcalinisation.....19
   2.1 Matériel.....19
   2.2 Conditions standards.....21
   2.3 Techniques particulières.....21

3. Techniques de séchage.....22
   3.1 Séchage en étuve.....22
   3.2 Lyophilisation.....22

4. Technique de torréfaction.....22

5. Traitements enzymatiques.....22
   5.1 Traitements enzymatiques sans alcalinisation.....22
   5.2 Traitements enzymatiques avant alcalinisation.....23
   5.3 Traitement enzymatique après alcalinisation.....23

6. Développement de la matière colorante insoluble.....23
6.1 Influence de l'humidité.....23
6.2 Influence de la durée 24
6.3 Influence de l'oxygène.....24
6.4 Influence de la température.....24

7. Evaluation des couleurs.....24
7.1 Détermination de la couleur globale des poudres.....24
7.2 Appréciation de la matière colorante soluble.....25

8. Techniques de supplémentation.....25
8.1 Supplémentation en fructose.....25
8.2 Supplémentation en fructose et en acides aminés.....26

9. Techniques d'extraction.....26
9.1 Extraction des cellules à pigments.....26
9.2 Extraction de l'amidon.....26
9.3 Extraction des phénols.....27
9.4 Extraction des flavanols.....27
9.5 Extraction des protéines.....27
9.6 Extraction de la MCS.....28
9.6.1 Influence du pH sur l'extraction de la MCS.....28
9.6.2 Extraction.....28

10. Méthodes de dosage.....28
10.1 Détermination de la teneur en eau.....29
10.2 Détermination de la teneur en matière grasse.....29
10.3 Dosage de l'acidité libre.....29
10.4 Détermination du pH.....29
10.5 Dosage de la théobromine.....29
10.6 Dosage des phénols totaux, tanins et non tanins.....29
10.7 Dosage des flavanols.....30
10.8 Dosage des protéines.....30
10.9 Dosage des acides aminés libres et totaux.....31
10.10 Dosage des sucres.....31
10.11 Dosage de l'amidon.....32

11. Fractionnement de la matière colorante soluble 32
11.1 Chromatographie par échange d'ions.....32
11.2 Chromatographie par filtration sur gel.....33

12. Réalisation de systèmes modèles.....33
12.1 Alcalinisation d'épicatéchol.....33
12.2 Alcalinisation d'un extrait de flavanols purifiés, seul ou présence d'un extrait protéique.....34
12.3 Alcalinisation d'un mélange : extrait de flavanols et différents constituants du cacao.....34
12.4 Alcalinisation d'un mélange extrait protéique/extrait phénolique.....35
12.5 Alcalinisation d'une solution de fructose.....36

II. Etude de l'influence des conditions de traitement sur la couleur des poudres de cacao.....37

1. Signification des mesures 37

2. Paramètres d'alcalinisation.....38
2.1 Influence de la nature de l'agent alcalin.....38
2.2 Influence de la durée de traitement.....39
2.3 Influence de la température.....39
2.4 Influence de la quantité d'eau mise en jeu.....40
2.5 Influence de la quantité d'agent alcalin.....41
2.6 Influence de l'oxygène.....42
2.7 Influence de la pression.....43
2.8 Influence du pH initial du cacao.....44
2.8.1 Alcalinisation de cacaos de pH différents.....44
2.8.2 Relation entre pH et luminance de poudres commerciales.....46
2.9 Etat du cacao.....47
2.9.1 Influence de la torréfaction.....47
2.9.2 Etat de division du cacao.....47

3. Paramètres de séchage.....49
3.1 Evolution de la couleur au cours du séchage.....49
3.2 Influence de la température de séchage.....50

4. Essais enzymatiques.....50
4.1 Utilisation d'enzymes en remplacement de l'agent alcalin.....51
4.2 Utilisation d'enzymes favorisant l'action de l'agent alcalin.....52
4.2.1 Cellulase.....52
4.2.2 α amylase.....52
4.2.3 Levures (Saccharomyces cerevisiae).....53
4.3 Traitement enzymatique après alcalinisation.....54

5. Conclusion.....54

III. Caractérisation de la matière colorante développée au cours de l'alcalinisation.....56

1. Distinction entre matière colorante soluble et matière colorante insoluble.....56
1.1 Matière colorante soluble.....56
1.2 Matière colorante insoluble.....57

2. Conditions de développement de ces différentes couleurs
2.1 Matière colorante soluble.....57
2.2 Matière colorante insoluble.....58
2.3 Dualité du développement des deux matières colorantes....59

3. Etude de la matière colorante soluble.....60
3.1 Recherche des précurseurs.....60
3.1.1 Participation des flavanols à la formation de la matière colorante soluble.....60
3.1.2 Recherche d'autres précurseurs.....66
3.1.2.1 Phénols insolubles.....66
3.1.2.2 Anthocyanidols, théobromine, fructose, acides aminés.....66
3.1.2.3 Protéines.....67
3.2 Purification - fractionnement.....70
3.2.1 Détermination des conditions d'extraction.....70
3.2.2 Extraction et purification partielle.....71

3.2.3 Fractionnement.....71
3.2.4 Analyse des principales fractions.....75
3.2.4.1 Spectres d'absorption UV - visible.....75
3.2.4.2 Analyse élémentaire.....77
3.2.4.3 Analyse des acides aminés.....77
3.2.4.4 Dosage des phénols totaux.....78
3.3 Discussion.....78

4. Etude de la matière colorante insoluble.....82
4.1 Facteurs influençant le développement de la MCI.....82
4.1.1 Influence de l'humidité de la poudre.....82
4.1.2 Influence de la température.....84
4.1.3 Influence de la durée de traitement.....84
4.1.4 Influence de l'oxygène.....85
4.2 Recherche des précurseurs de la MCI.....86
4.2.1 Sucres simples.....86
4.2.2 Sucres simples et acides aminés.....88
4.2.3 Amidon 90
4.2.4 Composés phénoliques.....92
4.3 Discussion.....94

Conclusion 96

Annexes.....99

Bibliographie 103

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des tableaux

Page

Tableau 1 : Coloration de huit poudres obtenues après alcalinisation standard.....37

Tableau 2 : Influence de la nature de l'agent alcalin sur la couleur du cacao alcalinisé (correspondance basée sur des équivalence de normalité).....39

Tableau 3 : Influence de la quantité d'oxygène sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation.....43

Tableau 4 : Evolution de la couleur en fonction d'une surpression d'azote.....44

Tableau 5 : Influence de la désacidification sur la couleur finale des poudres alcalinisées.....47

Tableau 6 : Influence de la torréfaction sur la couleur d'un cacao alcalinisé.....47

Tableau 7 : Influence de l'état du cacao sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation.....48

Tableau 8 : Alcalinisation après infiltration de la solution alcaline dans les nibs.....49

Tableau 9 : Couleur de cacaos traités par du carbonate de potassium, un savon ou un mélange carbonate de potassium / savon.....49

Tableau 10 : Evolution de la couleur d'un cacao alcalinisé au cours du séchage suivant l'étape d'alcalinisation.....50

Tableau 11 : Influence de la température de séchage sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation.....50

Tableau 12 : Influence du traitement par une PPO d'un cacao fermenté sur sa couleur.....51

Tableau 13 : Influence d'un traitement par une cellulase avant alcalinisation sur la couleur d'un cacao alcalinisé.....52

Tableau 14 : Influence d'un traitement par une amylase avant alcalinisation sur la couleur d'un cacao alcalinisé.....52

Tableau 15 : Teneurs en maltose et en glucose de poudres délipidées.....53

Tableau 16 : Modifications de couleur observées après alcalinisation avec ou non hydrolyse préalable de l'amidon par traitement enzymatique.....53

Tableau 17 : Influence d'un traitement par Saccharomyces cerevisiae avant alcalinisation sur la couleur d'un cacao.....54

Tableau 18 : Influence du traitement par une polyphénoloxydase d'un cacao déjà alcalinisé sur sa couleur.....54

Tableau 19 : Mise en évidence d'une matière colorante insoluble.....57

Tableau 20 : Influence de la présence de l'agent alcalin sur le développement de la MCS.....58

Tableau 21 : Développement de la MCS au cours d'une alcalinisation selon les conditions standards, sur nibs, sur masse ou sur poudre délipidée.....58

Tableau 22 : Influence du broyage et de la délipidation sur le développement de la couleur insoluble au cours d'un traitement hydrothermique.....58

Tableau 23 : Influence du mode de séchage post traitement hydrothermique sur le développement de la couleur insoluble.....59

Tableau 24 : Développement de la MCI après traitement d'une poudre délipidée en présence ou non d'un agent alcalin.....60

Tableau 25 : Coloration développée au cours de l'alcalinisation de cacaos non fermentés et fermentés après élimination des phénols extractibles.....66

Tableau 26 : Teneur en protéines extractibles avant et après alcalinisation.....67

Tableau 27 : Analyse élémentaire de la fraction U3.....77

Tableau 28 : Composition en acides aminés des fractions T2 et U3.....78

Tableau 29 : Rôle de l'oxygène dans le développement de la matière colorante insoluble.....85

Tableau 30 : Influence d'une supplémentation en fructose sur la couleur des poudres alcalinisées.....87

Tableau 31 : Effet de la supplémentation en acides aminés et en fructose sur la couleur des cacaos.....88

Tableau 32 : Dosage des acides aminés libres de différents cacaos supplémentés ou non en fructose et en acides aminés et alcalinisés ou non.....89

Tableau 33 : Teneurs en acides aminés et en sucres des poudres de cacao fermenté délipidé traitées 3 h à 60°C à différentes humidités.....90

Tableau 34 : Modifications de couleur observées après alcalinisation avec ou sans hydrolyse enzymatique préalable de l'amidon.....90

Tableau 35 : Teneur en amidon d'un cacao fermenté avant et après traitement à chaud à différentes humidités.....92

Tableau 36 : Développement de la MCI sur cacao fermenté et non fermenté après élimination ou non des phénols solubles.....92

Tableau 37 : Teneurs en théobromine et en phénols d'un cacao non fermenté, de sa fraction pigmentée et de sa fraction non pigmentée.....93

Tableau 38 : Couleur de cacao non fermenté, "déphénolé" par extraction ou dépigmenté ou dépigmenté et "déphénolé" ayant subi ou non un traitement hydrothermique.....93

Tableau 39 : Teneur en phénols extractibles en fonction du degré d'humidification au cours du traitement hydrothermique.....94

Liste des figures

Figure 1 : Structure des composés phénoliques identifiés dans les fèves de cacao.....7

Figure 2 : Les principales étapes technologiques de la fabrication des produits de chocolaterie.....11

Figure 3 : Schéma du réacteur en verre utilisé pour l'alcalinisation du cacao.....20

Figure 4 : Schéma du réacteur métallique utilisé pour l'étude de l'influence de la pression et de la température sur la couleur développée au cours de l'alcalinisation du cacao.....20

Figure 5 : Influence de la durée d'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues.....39

Figure 6 : Influence de la température d'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues.....40

Figure 7 : Influence de la quantité d'eau utilisée lors de l'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues.....41

Figure 8 : Influence de la quantité de carbonate de potassium utilisé lors de l'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues.....42

Figure 9 : Influence de la surpression d'air appliquée lors de l'alcalinisation sur la couleur des poudres obtenues.....43

Figure 10 : Luminance des poudres de cacao en fonction de leur pH.....45

Figure 11 : pH des poudres de cacaos alcalinisés en fonction de leur pH avant alcalinisation.....45

Figure 12 : Spectres d'absorption en lumière visible :
1 : d'un extrait aqueux de cacao fermenté alcalinisé
2 : d'un extrait aqueux de cacao fermenté.....56

Figure 13 : Spectre d'absorption en lumière visible :
1 : d'une solution d'épicatéchol alcalinisé
2 : d'une solution d'épicatéchol alcalinisé en présence de métabisulfite de sodium
3 : d'une solution de MCS
4 : d'une solution de flavanols alcalinisés
5 : d'une solution de flavanols alcalinisés en présence de métabisulfite de sodium.....61

Figure 14 : Chromatogramme HPLC de l'extrait purifié de flavanols.....62

Figure 15 : Spectre d'absorption en lumière visible de :
0 : extrait purifié de flavanols de cacao
1 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potassium pH 9,5, 60 min. à 70°C
2 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potassium pH 10,9, 15 min. à 40°C
3 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potassium pH 9,5, 15 min. à 40°C
4 : flavanols alcalinisés par une solution de carbonate de potassium pH 9,5, 15 min. à 90°C
5 : solution aqueuse de MCS.....63

Figure 16 : Courbe d'élution sur gel TRISACRYL GF 05 de :
1 : solution de MCS
2 : extrait purifié de flavanols alcalinisé selon les conditions 2.....64

Figure 17 : Courbe d'élution sur gel TRISACRYL GF 05 de :
1 : extrait purifié de flavanols alcanilisé selon les conditions 1
2 : extrait purifié de flavanols alcalinisé selon les conditions 2.....65

Figure 18 : Spectre d'absorption en lumière visible de :
1 : fraction d'éluat correspondant au pic A1
2 : fraction d'éluat correspondant au pic A2.....65

Figure 20 : Spectres d'absorption en lumière visible des solutions F alcalinisées.....67

Figure 21 : Spectres en lumière visible d'un extrait phénolique alcalinisé seul ou en présence d'un extrait protéique.....68

Figure 22 : Spectre d'absorption en lumière visible de :
1 : un extrait purifié de flavanols alcalinisé selon les conditions 2
2 : un extrait purifié de flavanols alcalinisé en présence d'un extrait protéique selon les conditions 2.....69

Figure 23 : Courbe d'élution sur gel TRISACRYL GF 05 d'un extrait purifié de flavanols alcalinisé en présence d'un mélange protéique selon les conditions 2.....69

Figure 24 : Spectre d'absorption en lumière visible de :
A : un extrait aqueux de MCS
B : un extrait aqueux de MCS, ajusté à pH 10
C : un extrait pH 10 de MCS.....71

Figure 25 : Schéma de fractionnement par chromatographie d'exclusion de la matière colorante soluble développée au cours de l'alcalinisation du cacao.....73

Figure 26 : Courbes d'élution sur TRISACRYL GF 05 de la MCS brute et de la MCS dialysée.....74

Figure 27 : Courbe d'élution sur ULTROGEL ACA 34 de la fraction T1.....74

Figure 28 : Courbe d'élution sur SEPHADEX G 75 de la fraction U3.....75

Figure 29 : Spectres d'absorption en lumière visible et UV de toutes les fractions colorées constitutives de la MCS.....76

Figure 30 : Spectres d'absorption en lumière visible de la MCS avant et après dialyse.....76

Figure 31 : Evolution de la luminance au cours du séchage d'une poudre de cacao délipidé après un traitement hydrothermique.....83

Figure 32 : Couleur d'une poudre de cacao en fonction de l'humidité au cours d'un traitement hydrothermique.....83

Figure 33 : Couleur d'une poudre de cacao délipidé en fonction de la température utilisée lors du traitement hydrothermique.....84

Figure 34 : Evolution de la couleur d'une poudre de cacao délipidé en fonction de la durée de traitement hydrothermique en présence ou non d'un antioxydant.....85

Figure 35 : Spectre d'absorption en lumière visible d'une solution de fructose à 2 % et carbonate de potassium à 4,6 % chauffée pendant 1 h à 80°C.....87

Figure 36 : Spectre d'absorption en lumière visible :
1 : d'une solution aqueuse de matière colorante soluble
2 : du surnageant obtenu après alcalinisation et centrifugation de la fraction "amidon".....91

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Evolution de la couleur d'un cacao alcalinisé en fonction de la durée d'alcalinisation.....99

Annexe 2 : Influence de la température utilisée au cours de l'alcalinisation de nibs sur la couleur de la poudre obtenue.....99

Annexe 3 : Influence de la quantité d'eau utilisée au cours de l'alcalinisation sur la couleur de la poudre obtenue..... 99

Annexe 4 : Influence de la quantité de carbonate de potassium utilisé au cours de l'alcalinisation sur la couleur de la poudre obtenue.....100

Annexe 5 : Influence d'une surpression d'air ou d'azote utilisée pendant l'alcalinisation sur la couleur de la poudre obtenue.....100

Annexe 6 : Influence du pH de cacaos naturels et alcalinisés sur leur couleur.....100

Annexe 7 : Evolution au cours du séchage de la couleur d'un cacao délipidé ayant subi un traitement hydrothermique.....101

Annexe 8 : Influence de l'humidité utilisée au cours du traitement hydrothermique d'un cacao délipidé sur la couleur de la poudre obtenue.....101

Annexe 9 : Influence de la température utilisée au cours du traitement hydrothermique d'une poudre de cacao délipidé sur la couleur finale obtenue.....102

Annexe 10 : Evolution de la couleur d'une poudre de cacao délipidé au cours d'un traitement hydrothermique.....102

Annexe 11 : Evolution de la couleur d'une poudre de cacao délipidé au cours d'un traitement hydrothermique en présence d'un antioxydant.....102

La Goutte d'Encre .
ATELIER DE REPROGRAPHIE
67.65.30.96

Année : 1990

Nom de l'auteur (prénom) : BIANCHI Jacqueline

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC (MONTPELLIER II)

Résumé

L'étude de la matière colorante développée lors de l'alcalinisation du cacao a permis de préciser l'influence des conditions de traitement sur la couleur finale des poudres. L'augmentation de la durée de traitement, de la température, de la quantité d'agent alcalin ou du pH initial des fèves conduit à des poudres plus foncées et plus rouges. L'augmentation de la quantité d'oxygène présent dans le milieu a surtout pour effet d'augmenter la nuance rouge.
La variation de la température de séchage, les essais d'amélioration de la pénétration de la solution alcaline au sein des nibs et les tentatives de remplacement ou de complément du procédé classique d'alcalinisation par des traitements enzymatiques ne permettent pas d'intensifier la coloration. En fait, les couleurs les plus sombres et les plus rouges sont obtenues lorsque l'alcalinisation est réalisée sur tourteaux plutôt que sur nibs.
Cette étude a mis en évidence l'existence de deux types de composés colorés, des composés brun rouge extractibles dont la formation, la solubilité et l'intensité de coloration augmentent avec le pH, et des composés bruns non extractibles qui se forment même en absence d'agent alcalin mais à condition de travailler sur poudre dont l'humidité est comprise entre 20 et 50 %.
Le fractionnement par filtration sur gel de la matière colorante soluble montre que celle-ci est constituée de composés de taille différente mais de même couleur provenant vraisemblablement de l'association entre flavanols oxydés et certains composés aminés. Des composés phénoliques solubles ou non participeraient au développement des pigments insolubles.

Mots-clés :

Cacao
Alcalinisation
Couleur
Poudre
Composés phénoliques

CIDARC · I.S.T. · BIBLIOTHEQUE