



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE
UFR AGROFORESTERIE

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE :

N° D'ORDRE :
078

CANDIDAT

Nom : MIAN

Prénom : Tano Marie-Ange
Sakia

THESE DE DOCTORAT

Mention : Agriculture et Foresterie Tropicale

Spécialité : Biotechnologie et Nutrition

VALORISATION NUTRITIONNELLE, FONCTIONNELLE ET
BIOTECHNOLOGIQUE DU JUS DE MUCILAGE DE CACAO
(*Theobroma cacao*)

PRODUIT EN COTE D'IVOIRE

JURY

Présidente : Madame TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE, Professeur
Titulaire, Université Jean Lorougnon Guédé.

Directeurs : Monsieur BEUGRE Grah Avit Maxwell, Professeur
Titulaire, Université Jean LOROUGNON GUEDE
Madame CAMARA Fatoumata épouse FADIKA, Maître de
Conférences, Université Nangui ABROGOUA

Rapporteur : Monsieur ANGAMAN Djédoux Maxime, Professeur
Titulaire, Université Jean Lorougnon Guédé.

Examineur 1 : Monsieur BOUATENIN Koffi Maïzan Jean-Paul, Maître
de Recherche, Université Nangui ABROGOUA

Examineur 2 : Monsieur DIOMANDE Massé, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Soutenu publiquement
le :31 Juillet 2023

DEDICACE

Je dédie cette thèse

A mon époux, **COULIBALY Wahauwouélé Hermann**

Pour son soutien indéfectible, sa compréhension, ses réconforts et ses encouragements dans mes moments de doute.

A mon père **MIAN Tano Joseph** et à ma mère **LE Jeanine**,

vous m'avez enseigné l'amour du travail bien fait, la patience et la persévérance. Que Dieu vous bénisse et vous garde longtemps à mes côtés !

A mes enfants **Lamifihi Marie-Kenneth** et **Gninlfang Christ Paul-Kylian**,

vous m'avez rempli d'amour et de joie dans mes moments difficiles. Que Dieu demeure votre guide !

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires d'agro-valorisation de l'UFR Agroforesterie de l'Université Jean Lorougnon GUEDE et du laboratoire central de l'Université Nangui ABROGOUA.

Une thèse, tant nominative soit-elle, est avant tout un travail de réflexion collective. Ainsi, au terme de ce travail, il est pour nous un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation.

En premier lieu, je remercie les autorités académiques de l'Université Jean Lorougnon GUEDE et de l'Université Nangui ABROGOUA en l'occurrence les Professeurs titulaires **ADOHI Krou Adjo Viviane** et **TANO Yao**, respectivement Présidente et Président de nous avoir acceptés dans leur institution.

Nous tenons à remercier Monsieur **KONE Tidiani**, Professeur titulaire, Vice-Président chargé de la Pédagogie, de la Vie Universitaire et de l'Innovation Technologique de l'Université Jean Lorougnon GUEDE qui a toujours été disponible pour répondre aux préoccupations des étudiants au plan académique.

Nous tenons à dire également merci à Monsieur **AKAFFOU Doffou Sélastique**, Professeur titulaire, Vice-Président chargé de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures de l'Université Jean Lorougnon GUEDE pour son implication au bien-être des étudiants.

Nous remercions Monsieur **BEUGRE Grah Avit Maxwell**, Professeur titulaire à l'Unité de Formation et de Recherche d'Agroforesterie de l'Université Jean Lorougnon GUEDE (Daloa) et Madame **CAMARA Fatoumata épse FADIKA**, Maître de Conférences à l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologies des Aliments de l'Université Nangui ABROGOUA qui n'ont ménagé aucun effort pour superviser ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à Madame **TONESSIA Dolou Charlotte**, Maître de Conférences, Directrice de l'Unité de Formation et de Recherche d'Agroforesterie de l'Université Jean Lorougnon GUEDE, à qui nous exprimons toute notre reconnaissance pour sa disponibilité et son dynamisme à la tête de l'Unité de Formation et de Recherche d'Agroforesterie.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Pour le grand honneur qu'ils nous font en acceptant de juger ce travail.

A MON MAÎTRE ET PRESIDENTE DU JURY DE THESE, PROFESSEUR TIDOU ABIBA SANOGO EPSE

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury. Nous vous remercions de votre enseignement et nous vous sommes très reconnaissants de bien vouloir porter intérêt à ce travail. Nous avons bénéficié, au cours de nos études, de votre enseignement clair et précis. Votre gentillesse, vos qualités humaines, votre modestie n'ont rien d'égal que votre compétence. Veuillez trouver ici, professeur, l'expression de nos sincères remerciements.

A MES MAÎTRES ET ENCADREURS DE THÈSE PROFESSEUR BEUGRE GRAH AVIT MAXWELL ET DOCTEUR CAMARA FATOUMATA EPOUSE FADIKA

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de me confier ce travail. Je vous remercie de votre patience, votre disponibilité, de vos encouragements et de vos précieux conseils dans la réalisation de cette thèse. Votre compétence, votre dynamisme et votre rigueur ont suscité une grande admiration et un profond respect. Vos qualités professionnelles et humaines me servent d'exemple. Veuillez croire à l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon grand respect.

A MON MAÎTRE ET RAPPORTEUR DE THÈSE PROFESSEUR ANGAMAN DJEDOUX MAXIME

Votre présence au sein de notre jury constitue pour moi un grand honneur. Par votre modestie, vous m'avez montré la signification morale de notre profession. Nous vous remercions de votre enseignement et gentillesse. Qu'il me soit permis de vous présenter à travers ce travail le témoignage de mon grand respect et l'expression de ma profonde reconnaissance.

A MON MAÎTRE ET EXAMINATEUR DE THÈSE BOUATENIN KOFFI MAÏZAN JEAN-PAUL

Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi notre jury de thèse. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude pour votre

TABLE DES MATIERES

bienveillance et votre simplicité avec lesquelles vous nous avez accueillis. Veuillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de notre grande estime et de notre sincère reconnaissance.

A MON MATRE ET EXAMINATEUR DE THÈSE DOCTEUR DIOMANDE MASSE

Nous vous remercions de nous avoir honorés par votre présence. Nous vous remercions de votre enseignement et nous vous sommes très reconnaissants de bien vouloir porter intérêt à ce travail. Vous avez accepté aimablement de juger cette thèse. Cet honneur nous touche infiniment et nous tenons à vous exprimer notre profonde reconnaissance. Veuillez accepter, cher maître, dans ce travail l'assurance de notre estime et notre profond respect.

Nous remercions les grandes familles **MIAN** et **COULIBALY** de leur soutien spirituel, moral et financier.

Nos sincères remerciements au personnel de **CARE International Côte d'Ivoire-Guinée** en particulier l'équipe des projets Cargill et Hershey pour leur encouragement.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIÈRES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES ANNEXES	xxi
INTRODUCTION	1
GÉNÉRALITÉS	5
1- Généralités sur le cacao.....	6
1-1- Présentation du cacaoyer, de son fruit et sa graine	6
1-1-1- Origine.....	6
1-1-2- Description botanique	6
1-1-3- Habitat	7
1-1-4- Fruit	7
1-1-5- Graine ou fève	8
1-2- Différents types de cacao.....	9
1-2-1- Variété Criollo.....	9
1-2-2- Variété Forastero	10
1-2-3- Variété Trinitario.....	11
1-3- Variétés hybrides de cacao	11
1-3-1- Cacao Mercedes	11
1-3-2- Cacao brésilien	12
1-3-3- Cacao "Nacional"	13
1-3-4- Variété CCN-51 en Equateur	14
1-4- Production mondiale	14
2- Récolte et étapes post-récolte dans le traitement du cacao	15

TABLE DES MATIERES

2-1- Récolte des cabosses	15
2-2- Etapes post-récoltes dans le traitement du cacao.....	16
2-2-1- Écabossage	16
2-2-2- Fermentation.....	17
2-2-2-1- Fermentation en tas	17
2-2-2-2- Fermentation en caisses	18
2-2-2-3- Fermentation en panier	18
2-2-2-4- Fermentation en plate-forme.....	18
2-2-3- Réactions biochimiques impliquées dans la fermentation.....	19
2-2-3-1-Fermentation alcoolique.....	19
2-2-3-2-Fermentation lactique.....	19
2-2-3-3-Fermentation acétique	19
2-3- Brassage	20
2-4- Séchage	20
2-4-1- Séchage naturel.....	21
2-4-2- Séchage artificiel	21
2-5- Stockage	22
3- Microorganismes impliqués dans la fermentation du cacao.....	22
3-1- Levures	22
3- 2- Bactéries lactiques.....	23
3-3- Bactéries acétiques	24
3-4- Moisissures et bactéries du genre Bacillus	24
4- Jus de mucilage de cacao	25
4-1- Transformation de la pulpe en jus.....	25
4-2- Réactions biochimiques subies par le jus de mucilage de cacao.....	26
4-3- Composition biochimique du jus de mucilage de cacao.....	27
4-4- Valeur nutritionnelle du jus de mucilage de cacao.....	27
4-5- Composés phénoliques de jus de mucilage de cacao	28
5- Valorisation des sous-produits du cacao	30
5-1- Coques.....	30

TABLE DES MATIERES

5-2- Jus de mucilage de cacao	31
6- Bioéthanol	31
6-1- Définition et propriétés	31
6-2- Production mondiale de bioéthanol.....	33
3- Matières premières utilisées pour la production du bioéthanol pour les biocarburants	34
6-4- Modes de consommation du bioéthanol	35
6-4-1- Applications industrielles	35
6-4-2- Consommation pour le déplacement	35
7- Pectinases	36
7-1-Différents groupes de pectinases.....	36
7-1-1- Pectines méthylestérases.....	36
7-1-2- Polygalacturonases	37
7-1-3-Pectines lyases.....	38
7-2- Pectinases d'origine microbienne	39
MATÉRIEL & MÉTHODES	40
1- Matériel	41
1-1-Matériel végétal.....	41
1-2- Matériel technique.....	41
2- Méthodes	42
2-1- Méthodes d'enquêtes.....	42
2-1-1- Généralités sur les sites d'enquêtes et d'échantillonnage	42
2-1-2- Procédure d'enquête	43
2-1-3- Population d'étude et collecte des données	43
2-2- Echantillonnage	44
2-3- Analyses biochimiques du jus de mucilage au cours de la conservation.....	44
2-3-1-Détermination de la teneur en eau et matière sèche	44
2-3-2-Détermination de la teneur en cendres	44
2-3-3-Détermination de la teneur en lipides totaux	45
2-3-4-Détermination de la teneur en protéines totales	46
2-3-5- Détermination de la teneur en fibres brutes.....	46

TABLE DES MATIERES

2-3-6-Détermination de la teneur glucides totaux et valeur énergétique des jus de mucilage	47
2-3-7-Dosage des acides organiques et des vitamines.....	47
2-3-7-1-Dosage des acides organiques	47
2-3-7-2-Dosage des vitamines.....	48
2-3-8-Dosage des polyphénols totaux	49
2-3-9- Dosage des flavonoïdes totaux.....	49
2-3-10- Tanins totaux	49
2-3-4-Dosage des activités antioxydantes	50
2-3-4-1- Activité antiradicalaire : DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)	50
2-3-4-2-Pouvoir réducteur-antioxydant du fer : FRAP (ferricyanure de potassium-chlorure ferrique).....	50
2-4- Analyses physico-chimiques et microbiologiques du jus de mucilage au cours de la fermentation	51
2-4-1-Mesure du pH.....	51
2-4-2- Détermination de l'acidité titrable.....	51
2-4-3- Mesure de l'extrait sec réfractométrique	51
2-4-4-Dosage de l'éthanol.....	52
2-4-5- Détermination de la charge levurienne au cours de la fermentation	52
2-5-Isolement des levures	53
2-5-1-Screening des isolats de levures producteurs de pectinase.....	53
2-5-2-Optimisation de la production d'enzyme pectinase à partir d'isolats sélectionnés ..	54
2-5-2-1-Effet du temps d'incubation	54
2-5-2-2- Effet du pH.....	54
2-5-2-3-Effet de la température d'incubation.....	54
2-5-3-Dosage de l'activité pectinolytique	55
2-6-Identification moléculaire des isolats de levures producteurs de pectinase et résistants à l'éthanol	55
2-6-1- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de la région ITS-5.8S rDNA	55
2-6-2-Electrophorèse sur gel d'agarose	56
2-6-3-Séquençage des fragments amplifiés	56
3-Purification partielle de l'enzyme	57
3-1-Chromatographie d'échange d'anions sur le gel DEAE-sepharose Fast Flow	57

TABLE DES MATIERES

3-2-Détermination des paramètres cinétiques	57
4-Applications biotechnologiques des espèces identifiées productrices de pectinase et résistantes à l'éthanol.....	58
4-1-Essais de clarification enzymatique du jus d'orange (<i>Citrus sinensis</i>) et du jus d'ananas (<i>Ananas comosus</i>) et d'extraction de composés phénoliques par l'extrait enzymatique partiellement purifié des espèces de <i>Yarrowia lipolytica</i>	58
4-1-1-Analyses physico-chimiques des jus clarifiés	58
Le dosage des paramètres physico-chimiques des jus d'orange clarifiés à savoir le pH, l'acidité titrable et l'extrait sec refractométrique a été effectué comme définit aux sections 2-4-1 ; 2-4-2 ; 2-4-3.....	58
2-4-1-Mesure du pH.....	58
2-4-2- Détermination de l'acidité titrable.....	58
2-4-3- Mesure de l'extrait sec réfractométrique	59
4-1-2- Détermination de la clarté, la couleur et l'indice de brunissement	59
4-1-3- Dosage des composés phénoliques.....	60
2-3-8-Dosage des polyphénols totaux	60
2-3-9- Dosage des flavonoïdes totaux	60
4-1-4-Détermination de la viscosité	60
4-2-Production de bioéthanol par fermentation alcoolique du moût de sorgho (<i>Sorghum bicolor</i>) par les espèces de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Debaromyces hansenii</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> résistantes à l'éthanol.....	61
4-2-1-Préparation du moût	61
4-2-2-Conduite de la fermentation alcoolique.....	61
4-2-3-Analyses physico-chimiques du moût au cours de la fermentation alcoolique	61
4-2-3-1-Détermination du pH, l'acidité titrable et de l'extrait sec refractométrique	61
2-4-1-Mesure du pH.....	62
2-4-2- Détermination de l'acidité titrable.....	62
2-4-3- Mesure de l'extrait sec réfractométrique	62
4-3-Production de CO ₂ durant la fermentation alcoolique par les espèces <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Debaromyces hansenii</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	63
4-4-Distillation des moûts fermentés.....	63
5-Analyses statistiques.....	63
RÉSULTATS & DISCUSSION	65

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : ÉVALUATION DES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES, PHYTOCHIMIQUES, NUTRITIONNELLES ET FONCTIONNELLES DU JUS DE MUCILAGE DE CACAO AU COURS DE LA CONSERVATION À LA TEMPÉRATURE AMBIANTE (28±2 °C).....	66
1-Résultats	66
1-1-Profil socio-démographique des personnes interrogées.....	66
1-2-Niveau de connaissance du jus de mucilage de cacao par ocalité	68
1-3- Moment de consommation du jus de mucilage de cacao selon les localités	68
1-4- Nature des effets bénéfiques du jus de mucilage de cacao.....	69
1-5- Évolution des paramètres biochimiques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation	71
1-5-1- Évolution des paramètres biochimiques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	71
1-5-2- Évolution de la teneur en vitamines des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	74
1-5-3- Évolution de la teneur en acides organiques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	75
1-5-4- Évolution de la valeur énergétique des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	78
1-6- Évolution de la teneur en composés phénoliques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation à la température ambiante.....	78
1-6-1- Évolution de la teneur en polyphénols totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation à la température ambiante	78
1-6-2- Évolution de la teneur en flavonoïdes totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	79
1-6-3- Évolution de la teneur en tanins totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	80
1-7- Évolution de l'activité antioxydante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation	81
1-7-1- Évolution de l'activité antioxydante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation par la méthode de DPPH (1,1-diphényl -2- picrylhydrazyle)	81
1-7-2- Évolution de l'activité antioxydante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation par la méthode FRAP (ferricyanure de potassium-chlorure ferrique)	82
1-8- Analyse en composantes principales des caractéristiques phytochimiques et	

TABLE DES MATIERES

antioxydantes	83
1-9- Analyse en composantes principales et classification hiérarchique ascendante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation	89
1-9-1-En début de conservation (0 h).....	89
1-9-2-A 24 h de conservation.....	91
1-9-3-A 48h de conservation.....	93
1-9-4-En fin de conservation (72 h).....	95
2-Discussion	98
Conclusion partielle.....	101
CHAPITRE II : ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOTECHNOLOGIQUES	102
DES LEVURES DU JUS DE MUCILAGE DE CACAO EN FERMENTATION	102
1-Résultats	102
1-1- Évolution des paramètres chimiques et microbiologiques (levures) du jus de mucilage au cours de la fermentation spontanée du jus de mucilage de cacao	102
1-1-1-Évolution du pH et de l'acidité titrable (AT)	102
1-1-2- Évolution de la charge levurienne, de l'ESR et du taux d'éthanol au cours de fermentation spontanée du jus de mucilage de cacao.....	104
1-2- Identification moléculaire des isolats des levures résistants à l'éthanol.....	107
1-3-Screening des isolats de levures producteurs de pectinases	110
1-4- Détermination des conditions optimales de production de la pectinase par 6 isolats sélectionnés	111
1-4-1-Détermination du temps optimal de production de la pectinase.....	111
1-4-2-Effet du pH sur la production de la pectinase	112
1-4-3-Effet de la température d'incubation sur la production de la pectinase	112
1-5- Identification moléculaire des isolats de levures producteurs de pectinase sélectionnés	113
1-5-1- Amplification de la région 5.8S rDNA-ITS	113
1-5-2- Caractérisation moléculaire des 6 isolats de levures productrices de pectinase... sélectionnés	114
1-6- Purification et caractérisation partielles des pectinases des espèces <i>Yarrowia lypolitica</i>	116

TABLE DES MATIERES

1-6 1- Chromatographie par échange d'anions avec le gel DEAE Sepharose Fast Flow	116
1-6-2- Paramètres de la purification partielle des pectinases	116
1-6-3- Caractéristiques physico-chimiques des pectinases partiellement purifiées	118
1-6-3-1-Effet du pH sur l'activité enzymatique	118
1-6-3-2-Effet de la température sur l'activité enzymatique.....	118
1-6-4- Constantes cinétiques des pectinases partiellement purifiées.....	119
2-Discussion	121
Conclusion partielle.....	128
CHAPITRE III : APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES : ESSAI DE PRODUCTION DE BIOÉTHANOL PAR LES SOUCHES DE LEVURES RÉSISTANTES À L'ÉTHANOL, CLARIFICATION DE JUS D'ORANGE (<i>Citrus sinensis L.</i>) ET D'ANANAS (<i>Ananas comosus</i>) PAR LES SOUCHES DE LEVURES PRODUCTRICES DE PECTINASE	
1-Production de bioéthanol par fermentation du moût sucré de sorgho par les souches de levures résistantes à l'éthanol : <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Debaromyces hansenii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia kurdiavzevii</i>	129
1-1-Évolution des différents paramètres physico-chimiques au cours de la fermentation alcoolique.....	129
1-1-1- Évolution du pH et de l'acidité titrable	129
1-1-2- Vitesse de consommation des sucres des espèces de levures au cours de la fermentation.....	130
1-2-Évolution la cinétique fermentaire des souches de levure au cours de la fermentation alcoolique des moûts.....	131
1-2-1-Évolution du volume CO ₂ (g/L) dégagé au cours de la fermentation des moûts	131
1-2-2-Évolution de la croissance levurienne au cours de la fermentation des moûts	131
1-3- Degré alcoolique des distillats provenant des différentes fermentations.....	132
1-4-Clarification des jus d'orange et d'ananas par les pectinases produites par les espèces de <i>Yarrowia lipolytica</i>	134
1-4-1- Activités enzymatiques des extraits bruts et partiellement purifiés des espèces de <i>Yarrowia lipolytica</i> Tias J0-6 ; YA J3-1 et Buy J2-1.....	134
1-4-2- Paramètres physico-chimiques et phytochimiques des jus clarifiés.....	135
1-4-2-1- Paramètres physico-chimiques des jus d'orange et ananas clarifiés	135
1-4-2-2-Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante des jus clarifiés.....	137

TABLE DES MATIERES

1-5- Corrélation entre composés phénoliques et activité antioxydante des jus de fruits clarifiés	139
2-Discussion	140
CONCLUSION	144
RÉFÉRENCES	147
ANNEXES	182

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

°C	: Degrés Celsius
ADNr	: ADN ribosomique
AOAC	: Association des chimistes agricoles officiels
AT	: Acidité titrable
BET	: Bromure d'éthidium
CLHP	: Chromatographie liquide haute performance
CNRA	: Centre National de Recherche Agronomique
CNUCED	: Conférences des Nations Unies sur le Commerce et le Développement
CO ₂	: Dioxyde de Carbone
DNS	: acide 3,5-dinitrosalicylique
DO	: Densité Optique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl
EDTA	: Acide Ethylène diamine tétra-acétique
ESR	: Extrait sec réfractométrique
FAO	: Organisation pour l'alimentation et l'agriculture
FRAP	: Ferricyanure de potassium-chlorure ferrique
FRAP	: ferricyanure de potassium-chlorure ferrique
IRAD	: Institut de Recherche Agricole pour le Développement
J.-C.	: Jésus Christ
LAB	: Bactéries lactiques
LDL	: Low Density Lipoprotein
NaCl	: Chlorure de Sodium
NaOH	: Hydroxyde de Sodium
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
pH	: Potentiel d'Hydrogène
Rpm	: Rotation par minute
TBE	: Tris/Borate/EDTA
UFC/g	: Unité Formant colonie par gramme
UFC/mL	: Unité formant colonie par millilitre
YPDA	: Yeast peptone dextrose agar

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Composition biochimique du jus de mucilage de cacao	27
Tableau II : Valeur nutritionnelle du jus de mucilage de cacao	28
Tableau III : Propriétés physico-chimiques de l'essence et de l'éthanol.....	33
Tableau IV : Composition du mélange réactionnel (volume final : 50 µL).....	56
Tableau V : Profil socio-démographique des personnes interrogées	67
Tableau VI : Moment de consommation du jus de mucilage de cacao par localités	69
Tableau VII : Nature des effets bénéfiques du jus de mucilage de cacao par localité.....	69
Tableau VIII : Quantités de jus de mucilage de cacao consommées par localité	70
Tableau IX : Temps de conservation du jus de mucilage de cacao dans les localités.....	71
Tableau X : Teneur des paramètres biochimiques (%) des jus de cacao au cours de la conservation.....	73
Tableau XI : Teneur en vitamines (g/L) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	75
Tableau XII : Teneur en acides organiques (g/L) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	77
Tableau XIII : Valeurs propres et variances expliquées des axes principaux à 0h de conservation.....	84
Tableau XVII : Valeurs propres et variances expliquées des axes principaux à 48 h de conservation.....	87
Tableau XVIII : Corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en composés phénoliques à 48 h de conservation	87
Tableau XXII : Distribution des espèces de levures identifiées	109
Tableau XXIII : Identification des 6 isolats de levure sélectionnées.....	115
Tableau XXVII : Paramètres physico-chimiques des jus d'orange clarifiés.....	136
Tableau XXVIII : Paramètres physico-chimiques des jus d'ananas clarifiés.....	136
Tableau XXIX : Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante des jus clarifiés	138
Tableau XXX : Matrice de corrélation de Pearson entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes.....	139

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cabosse de cacao	8
Figure 2 : Graines de cacao avec et sans pulpe	9
Figure 3 : Cabosse de la variété Criollo	10
Figure 4 : Cabosse de la variété Forastero.....	10
Figure 5 : Cabosse de la variété trinitario.....	11
Figure 6 : Cabosse de la variété Mercedes	12
Figure 7 : Cabosse de la variété Cacao brésilien	13
Figure 8 : Cabosse de la variété Nacional	13
Figure 9 : Cabosse de la variété CCN-51	14
Figure 10 : Principaux pays producteurs de cacao	15
Figure 11 : Écabossage du cacao	16
Figure 12 : Fermentation en tas du cacao	17
Figure 13 : Fermentation en caisse	18
Figure 14 : Techniques de brassage au cours de la fermentation du cacao	25
Figure 15 : Dispositif de collecte de jus de cacao par entassement des fèves.....	25
Figure 16 : Production du jus de mucilage de cacao par activité pectinolytique des levures .	26
Figure 17 : Fermentation acétique se produisant dans le jus de mucilage.....	27
Figure 18 : Structure de l'épicatéchine	29
Figure 19 : Polyphénols en fonction de l'origine du cacao	30
Figure 20 : Production d'aliment pour bétail à partir de coques de cacao.....	31
Figure 21 : Production mondiale d'éthanol par zone géographique en 2019	34
Figure 22 : Matières premières utilisées pour la production d'éthanol pour les biocarburants.....	34
Figure 23 : Déméthylestérification des pectines par les PME.....	37
Figure 24 : Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique.....	38
Figure 25 : Réaction catalysée par les pectines lyases (PL)	39
Figure 26 : Cabosse de cacao	41
Figure 27 : Jus de mucilage de cacao	41
Figure 28 : Site d'échantillonnage et enquête	42
Figure 29 : Mesure de la viscosité.....	61
Figure 30 : Valeur énergétique des jus de mucilage cacao au cours de la conservation	78

LISTE DES FIGURES

Figure 31 : Teneur en polyphénols totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	79
Figure 32 : Teneur en flavonoïdes totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	80
Figure 33 : Teneur en tanins totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation.....	81
Figure 34 : Évolution de l'activité antioxydante (DPPH) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation	82
Figure 35 : Évolution de l'activité antioxydante (FRAP) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation	83
Figure 36 : Distribution (a) et projection (b) des caractéristiques phytochimiques et antioxydants à partir de l'analyse en composante principale des jus de mucilage à 0h de conservation.....	84
Figure 37 : Distribution (a) et projection (b) des caractéristiques phytochimiques et antioxydants à partir de l'analyse en composante principale des jus de mucilage à 24 h de conservation.....	85
Figure 38 : Distribution (a) et projection (b) des caractéristiques phytochimiques et antioxydants à partir de l'analyse en composante principale des jus de mucilage à 48 h de conservation.....	87
Figure 39 : Distribution (a) et projection (b) des caractéristiques phytochimiques et antioxydants à partir de l'analyse en composante principale des jus de mucilage à 72 h de conservation.....	88
Figure 40 : Projection des paramètres analysés et des jus de micilage de Akoupé, Yakassé-Attobrou, Tiassalé, Taabo et Buyo dans le plan factoriel 1-2 de l'ACP à 0 h de conservation	90
Figure 41 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendogramme des échantillons de jus de cacao (b) en début de conservation	91
Figure 42 : Projection des paramètres analysés et des jus de micilage de Akoupé, Yakassé-Attobrou, Tiassalé, Taabo et Buyo dans le plan factoriel 1-2 de l'ACP à 24 h de conservation.....	92
Figure 43 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendogramme des échantillons de jus de cacao (b) à 24 h de conservation	93
Figure 44 : Projection des paramètres analysés et des jus de micilage de Akoupé, Yakassé-Attobrou, Tiassalé, Taabo et Buyo dans le plan factoriel 1-2 de l'ACP à 48 h de conservation	94

LISTE DES FIGURES

Figure 45 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendogramme des échantillons de jus de cacao (b) au bout de 48 h de conservation	95
Figure 46 : Projection des paramètres analysés et des jus de micilage de Akoupé, Yakassé-Attobrou, Tiassalé, Taabo et Buyo dans le plan factoriel 1-2 de l'ACP à 72h de conservation	96
Figure 47 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendogramme des échantillons de jus de cacao (b) en fin de conservation (72 h).....	97
Figure 48 : Évolution du pH et de l'acidité titrable au cours de la fermentation des jus de mucilage de cacao.....	103
Figure 49 : Courbes de croissance (cercle), évolution de l'éthanol (carré) et de ESR (losange) au cours de la fermentation du jus de mucilage de cacao.....	106
Figure 50 : Révélation sur gélose pectine de production de pectinase par l'isolat TIAS J0-6	110
Figure 51 : Diamètre des halos des isolats	110
Figure 52 : Effet du temps d'incubation sur la production de pectinase par 6 isolats sélectionnés	111
Figure 53 : Effet du pH du milieu sur la production de pectinase par 6 isolats sélectionnés	112
Figure 54 : Effet de la température d'incubation sur la production de pectinase par 6 isolats sélectionnés.....	113
Figure 55 : Produits d'amplification par les amorces ITS 1 et ITS 4 de la région 5.8S-ITS de l'ADNr des 6 isolats de levures productrices de pectinase sélectionnés	114
Figure 56 : Représentation graphique de la souche <i>Yarrowia lipolytica</i> TIAS J0-6.....	116
Figure 57 : Effet du pH sur l'activité enzymatique	118
Figure 58 : Effet de la température sur l'activité enzymatique.....	119
Figure 59 : Détermination graphique des constantes cinétiques K_m et V_{max}	120
Figure 60 : Évolution du pH et de l'acidité titrable des moûts en fermentation avec les différentes espèces de levures.....	129
Figure 61 : Vitesse de consommation des sucres au cours de la fermentation alcoolique avec les différentes espèces de levures	130
Figure 62 : Dégagement de CO_2 au cours de la fermentation des moûts avec les différentes	131
Figure 63 : Évolution de la densité optique des moûtsensemencés par les souches de levures au cours de la fermentation.....	132
Figure 64 : Degré alcoolique des différents distillats	133

LISTE DES FIGURES

Figure 65 : Flacons de bioéthanol produit les différentes espèces de levures après distillation	133
Figure 66 : Activité totale des extraits brut et partiellement purifié.....	134

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Fiche d'enquête

ANNEXE II : Séquences nucléotidiques

ANNEXE III : Matériel technique

INTRODUCTION

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* Linné) est principalement cultivé pour ses fèves dans les plantations des régions tropicales du monde entier (Lopez & Dimick, 1995). Les principaux producteurs sont la Côte d'Ivoire, le Ghana et le Cameroun avec plus de 70% de la production mondiale. La production de la Côte d'Ivoire, seule représente pour plus de 35 % de la production mondiale (ICCO, 2019). Le pays occupe le 1^{er} rang au niveau mondial. La totalité de la production ivoirienne était destinée à l'exportation dans les pays industriels (Europe et Amérique) où les fèves de cacao fermentées rentaient principalement dans la préparation de chocolat et de graisses utilisées dans les cosmétiques, les industries pharmaceutiques et les produits alimentaires (Moscatto *et al.*, 2004, Guehi *et al.*, 2007). La fermentation du cacao est l'une des étapes de la transformation post-récolte qui influence la qualité finale du produit. Dans les cabosses, les fèves de cacao sont noyées dans une masse de pulpe mucilagineuse. Après avoir retiré les fèves entières, la pulpe mucilagineuse est dégradée par les enzymes pectinolytiques pour produire un jus de mucilage communément appelé "eau de cacao" (Barel, 2013). Ainsi, le processus de fermentation des fèves de cacao génère des sous-produits qui sont souvent abandonnés comme déchets.

En effet, lors du décortilage, plus de 300 millions de litres de jus de mucilage, produits chaque année, sont abandonnés dans les champs (Anvoh, 2013). Le jus de mucilage est riche en sucres fermentescibles tels que le glucose, (2,4-4,1 %), le fructose (4,2-6,2 %) et le saccharose (2,1-3,2 %) et présente une concentration élevée, notamment en acide citrique (2,1- 2,4 %) (Schwan, 1998 ; Ardhana & Fleet, 2003). Aussi d'autres acides organiques sont-ils également présents en plus petites quantités, comme l'acide lactique (0,03 %) et l'acide acétique (0,04 %) (Schwan, 1998 ; Ardhana & Fleet, 2003). Le pH du jus a été évalué à un peu moins de 4,0 (Sanchez *et al.*, 1985). Les caractéristiques de ce jus sont propices à la prolifération de plusieurs microorganismes, tels que les levures, les bactéries acétiques, les bactéries lactiques au cours de la fermentation. L'activité de ces microorganismes conduit à la formation de divers produits finaux métaboliques tels que les alcools, l'acide acétique et d'autres acides organiques. Plusieurs études antérieures ont examiné la dynamique microbienne et les espèces impliquées dans la fermentation spontanée des fèves de cacao (Roelofsen, 1958 ; Schwan *et al.*, 1995 ; Ardhana, 2003 ; Jespersen *et al.*, 2005 ; Nielsen *et al.*, 2005 ; Nielsen *et al.*, 2007 ; Camu *et al.*, 2007 ; Daniel *et al.*, 2009 ; Garcia-Armisen *et al.*, 2010 ; Lefeber *et al.*, 2011 ; Papalexandratou *et al.*, 2011a, b ; Nielsen *et al.*, 2012).

Aussi, le niveau élevé d'alcool obtenu après quelques jours de fermentation du jus pourrait-il suggérer la présence de levures susceptibles d'avoir une résistance et une tolérance relativement élevées à l'alcool. En effet, la forte teneur en éthanol du jus de mucilage de cacao

fermenté avait été déjà signalée par plusieurs auteurs. Ainsi, Anvoh (2013) a montré que les concentrations en alcool du jus de mucilage sous fermentation contrôlée à 28 °C et 35 °C étaient à $7,8\pm 0,2$ % et $8,4\pm 0,3$ % respectivement. Cocolin *et al.* (2016) ont rapporté que 38 % et 54 % du total des isolats de la fermentation des fèves de cacao étaient capables de se développer respectivement à 8, 10 et à 12 % (v/v) d'éthanol. *Saccharomyces cerevisiae* a montré la plus forte croissance à 12 % d'éthanol. De plus, le jus de mucilage de cacao fermenté, par sa forte teneur en éthanol, pourrait être utilisé pour la production de bioéthanol. Le bioéthanol a été identifié comme le biocarburant le plus utilisé dans le monde, car il contribue de manière significative à la réduction de la consommation de pétrole brut et de la pollution environnementale. Il peut être produit à partir de différents types de matières premières telles que le saccharose, l'amidon, la biomasse lignocellulosique et algale, par un processus de fermentation par des microorganismes (Azhar *et al.*, 2017). Ainsi, plusieurs études ont été réalisées dans le but de produire du bioéthanol afin de l'utiliser comme biocarburant (Yan *et al.*, 2015 ; Ishola *et al.*, 2015 ; Moon *et al.*, 2012 ; Peng *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2013).

Par ailleurs, le jus de mucilage contient une teneur importante en pectine (Baensch, 2000 ; Barel, 2009 ; Anvoh, 2013) qui suggérerait la présence de levures productrices de pectinases. Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, l' α -amylase, la cellulase, les pectinases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui fait d'elles, un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004). Les enzymes pectinolytiques occupent une position centrale avec 25 % du marché global des enzymes (Ruiz *et al.*, 2017). Une croissance de 5,8 % est attendue pour la période de 2017 à 2022 (Industrial Enzyme Market, 2017). Dans l'industrie agroalimentaire, les pectinases sont utilisées principalement dans la clarification des jus de fruits (Alkorta *et al.*, 1998 ; Kashap *et al.*, 2001 ; Duvetter *et al.*, 2005 ; Jayani *et al.*, 2005 ; Meryandini *et al.*, 2017). Les enzymes d'origine microbienne présentent un large domaine d'applications, tels que l'industrie alimentaire, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Environ 40 % des enzymes industrielles sont d'origine fongique (Botton *et al.*, 1990). En Côte d'Ivoire, l'industrie des enzymes est totalement absente.

En Côte d'Ivoire, la majeure partie des études sur le cacao se sont articulées autour des fèves (Guehi *et al.*, 2010 ; Kedjebo, 2016 ; Oussou *et al.*, 2022 ; Yao *et al.*, 2022). Concernant le jus de mucilage, seuls les travaux réalisés par Anvoh (2013) portant sur sa transformation en vinaigre et en marmelade ont été rapportés. Bien que le cacao soit important dans l'actuelle

économie de la Côte d'Ivoire, les acteurs de la filière cacao et les industriels auraient davantage intérêt à valoriser ses sous-produits, notamment le jus de mucilage de cacao.

C'est dans ce contexte que la présente étude a été réalisée. L'objectif est de valoriser le jus de mucilage de cacao à travers la détermination des paramètres biochimiques, phytochimiques, nutritionnelles, fonctionnelles et des propriétés biotechnologiques des levures impliquées dans la fermentation spontanée. Il s'agira spécifiquement de :

- Faire l'état des connaissances actuelles du jus de mucilage de cacao ;
- Déterminer les propriétés physico-chimiques, phytochimiques, nutritionnelles et fonctionnelles au cours de la conservation à la température ambiante ;
- Réaliser le screening des isolats de levures résistantes à l'éthanol et productrices de Pectinases et effectuer leur identification ;
- Procéder à des applications biotechnologiques, non seulement à travers la production de bioéthanol mais aussi la clarification des jus de fruits en fonction des caractéristiques des espèces de levures isolées

Les résultats obtenus dans cette étude ont été organisés en trois (03) chapitres :

Chapitre I : Évaluation des propriétés physicochimiques, nutritionnelles et fonctionnelles du jus de mucilage de cacao au cours de la conservation à la température ambiante

Chapitre II : Etude des propriétés biotechnologiques des levures du jus de mucilage de cacao en fermentation

Chapitre III : Essai de production de bioéthanol par les souches de levures résistantes à l'éthanol ; Essai clarification de jus d'orange (*Citrus sinensis* L.) et d'ananas (*Ananas comosus*) par les souches de levures productrices de pectinase

Ce mémoire de thèse est structuré en trois parties. Une revue bibliographique, qui présente les généralités sur le cacao, la production, l'utilisation, et l'usage du bioéthanol et les différents types de pectinases compose la première partie. La deuxième partie de ce manuscrit décrit les principales méthodes appliquées pendant cette étude. Elle présente les protocoles, les critères d'études retenus et les analyses statistiques réalisées. Les résultats obtenus sont regroupés dans la troisième partie et sont discutés en trois chapitres différents. Une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail et de les analyser de façon plus globale. Le manuscrit se conclut en présentant les principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

GÉNÉRALITÉS

1- Généralités sur le cacao

1-1- Présentation du cacaoyer, de son fruit et sa graine

1-1-1- Origine

Les cacaoyers sont originaires d'Amérique du Sud. L'utilisation des fèves de cacao remonte à au moins 1400 av. (Rosner, 1997). Les Aztèques et les Incas utilisaient les fèves de cacao comme monnaie d'échange et utilisaient les fèves de cacao pour fabriquer du chocolat. Le chocolat était des fèves de cacao torréfiées et moulues en une purée, souvent ajoutée à de l'eau et mélangée à d'autres ingrédients tels que la vanille, les épices et le miel (Afoakwa, 2010).

1-1-2- Description botanique

C'est Linné en 1753 qui a appelé *Theobroma cacao* "le cacao aliment des dieux". Connu sous le nom de cacaoyer, cet arbre appartient à la famille des Sterculiaceae et au genre *Theobroma*. Seule 1 des 22 espèces du genre cacao est consommée sous forme de cacao « *Theobroma cacao* » (Tixier, 2013).

Le cacaoyer est un arbre d'ombre d'environ 10 mètres de haut. Productif dès 4 ou 5 ans. Les fleurs du cacaoyer poussent à la fois sur le tronc et sur les branches principales (Tixier, 2013), elles sont nombreuses et se succèdent tout au long de l'année. Une soixantaine de fleurs produites par le cacaoyer ne sont pas pollinisées (pollinisation insectophile) et tombent au bout de 48 heures. Environ 5% seulement des fleurs pollinisées se décortiquent et forment le fruit du cacaoyer qui la cabosse (Braudeau, 1969). Ces derniers sont de gros fruits ovales de 15 à 20 cm de long. Il contient des graines et est appelé fèves de cacao ou cacao commercial après transformation. Le nombre de cabosses varie selon les espèces. Ces fèves sont attachées à une tige centrale et sont entourées d'une pulpe appelée mucilage. Après avoir traversé différentes étapes après la récolte, la fève de cacao résultante pèse environ 1 gramme et est recouverte d'une fine membrane résistante appelée la croûte. Le chocolat est fabriqué à partir de fèves de cacao décortiquées et de cotylédons (Braudeau, 1969).

GÉNÉRALITÉS

La classification du cacaoyer se fait selon le schéma systématique suivant :

Règne : Plantae

Sous-règne : Viridaeplantae

Division : Magnoliophyta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotylédones

Sous-classe : Rosidées

Ordre : Malvales

Famille : Sterculiaceae

Genre : Theobroma

Mais la classification du cacaoyer n'est pas évidente ; en effet, selon la classification phylogénétique, le *Theobroma cacao* appartient à la famille des Malvacées et à la sous-famille des Sterculiacées (Gilet, 2006).

1-1-3- Habitat

Le cacaoyer est un arbre fragile qui a besoin de chaleur, d'humidité et d'ombre pour pousser (Tixier, 2013). Les précipitations sont de l'ordre de 1500 à 2000 mm. De plus, les cacaoyers ont besoin de sols profonds, peu perméables, riches en humus et en minéraux (Tixier, 2013).

1-1-4- Fruit

Le fruit est appelé "cherelle" pendant le développement et une gousse à maturité (Figure 1). Sa croissance et sa maturité prennent 5 à 7 mois. La couleur des fruits est considérée comme un indicateur de maturité, car les cabosses passent du vert ou du rouge au jaune ou à l'orange. Le fruit est porté sur une tige ligneuse qui provient d'une tige charnue, dure et partiellement ligneuse contenant du mucilage et de 30 à 60 graines appelées haricots. La taille et le poids des cabosses varient de 10 à 35 cm et de 200 à 800 grammes (Mossu, 1990).

GÉNÉRALITÉS



Figure 1 : Cabosse de cacao (Hamdouche, 2015)

1-1-5- Graine ou fève

Les graines ou fèves de cacao sont plus ou moins bombées en forme d'amande, de 2 à 4 cm de long, 1 à 17 cm de large et 0,7 à 1,2 cm d'épaisseur. La graine est entourée d'une pulpe blanchâtre et collante qui est aigre-douce (figure 2A). Extérieurement, il se compose d'une coquille rose mince et dure, striée d'une fine membrane brillante translucide et de deux cotylédons (Figure 2B) (Mossu, 1990).

GÉNÉRALITÉS



(A) Graines de Cacao avec la pulpe

(B) Graines de Cacao sans la pulpe

Figure 2 : Graines de cacao avec et sans pulpe (Hamdouche, 2015)

1-2- Différents types de cacao

Le cacaoyer appartient à la superdivision des Spermatophyta, à la division des Magnoliophyta, à la classe Theobroma. Le genre *Theobroma* compte plusieurs variétés, dont : *Theobroma bicolor*, *T. cacao*, *T. helania*, *T. grandiflora*, *T. microcarpa* et *T. speciosa* (Braudeau 1969 ; Kennedy, 1995).

Le cacaoyer *Theobroma cacao* L. est très diversifié. Cette diversité repose sur les caractéristiques morphologiques des gousses ou des graines, qui présentent toutes une grande variabilité (Hamdouche, 2015). Seules les fleurs changent peu morphologiquement. Les trois variétés principales sont : "Criollo", "Amazonas Forastero" et "Trinitario". Des hybrides prolifiques sont croisés à partir de ces trois groupes principaux pour former la majorité des variétés utilisées dans les plantations.

1-2-1- Variété Criollo

Les cultivars Criollo sont couramment cultivés en raison de leur faible tolérance au froid et de leur sensibilité aux maladies, aux insectes du cacaoyer et aux conditions météorologiques défavorables (Figure 3) (Anvoh, 2013). Il produit de grosses fèves aux cotylédons "clairs" très aromatiques et n'a qu'une légère amertume (Colonges, 2021). La variété "Criollo" est principalement cultivée dans la zone mésoaméricaine (Mexique, Nicaragua, Guatemala, Colombie, Venezuela, etc.), l'arc antillais, Madagascar, Sri Lanka, Indonésie et Samoa. Cette variété ne représente que 1 à 5 % de la production mondiale de cacao.

GÉNÉRALITÉS



Figure 3 : Cabosse de la variété Criollo (Colonges, 2021)

1-2-2- Variété Forastero

La variété Forastero se localise à l'état sauvage dans la haute Amazonie. Il est très diversifié et largement utilisé dans les plantations de tous les pays producteurs (Figure 4) (Lima *et al.*, 2011). Les cabosses de cacao sont vertes et de forme variable. Leurs fèves sont plates et ont des cotylédons violet foncé qui leur donnent une saveur et une acidité de cacao amer. La variété « Forastero » est aujourd'hui largement plantée dans les pays producteurs (principalement la Côte d'Ivoire et le Ghana), fournissant plus de 80 % de la production mondiale de cacao. Les cacaoyers Forastero sont considérés comme à haut rendement et modérément résistants aux ravageurs et aux maladies (Lima *et al.*, 2011).



Figure 4 : Cabosse de la variété Forastero (Lima *et al.*, 2011)

GÉNÉRALITÉS

1-2-3- Variété Trinitario

La variété "Trinitario" est un hybride de "Criollo" et "Forastero". Les Trinitario ont des caractéristiques qui se situent entre les deux groupes. Les arbres de première génération peuvent être vigoureux et productifs (Hamdouche, 2015).

La couleur des gousses se situe entre Criollo clair et Forastero foncé (Figure 5) (Lachenaud *et al.*, 1997). Aujourd'hui, les cacaoyers 'Trinitario' sont cultivés dans tous les pays où la variété "Criollo" était autrefois cultivée, notamment au Mexique et en Amérique centrale. La variété « Trinitario » représente 10 à 15 % de la production mondiale. Les cacaoyers Trinitario sont également connus pour être les plus résistants aux maladies (Motamayor *et al.*, 2003).



Figure 5 : Cabosse de la variété trinitario (Lachenaud *et al.*, 1997)

1-3- Variétés hybrides de cacao

De ces trois grandes variétés sont nées par croisement des hybrides fertiles qui constituent la majorité des cultivars utilisés en plantation.

1-3-1- Cacao Mercedes

Afin de maintenir sa position de leader mondial des fèves de cacao production, le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) de Côte d'Ivoire a été chargé de renouveler le verger avec un nouvel hybride. Ce nouvel hybride s'appelle « Cocoa Mercedes » (Figure 6). Il est sélectionné en raison de ses principales caractéristiques : la précocité de sa

GÉNÉRALITÉS

production (18 mois au lieu de 5 ans pour le cacao traditionnel) et la productivité (3 tonnes par hectare par an au lieu de 0,3 tonnes pour cacao traditionnel). Il avait été massivement introduit au cours des cinq (5) dernières années dans les champs par les agriculteurs parce que les graines étaient gratuites (Carlier, 2016). Les plantes de cacao Mercedes ont été cultivées sous conditions tropicales à la ferme expérimentale (Station) du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) de Côte d'Ivoire. Les recherches antérieures ont augmenté la productivité et amélioré davantage la connaissance de la physicochimie et composition biologique de ce cacao. La plupart des études ont montré que la composition chimique et moléculaire du cacao a un intérêt thérapeutique et nutritionnel (Carlier, 2016).



Figure 6 : Cabosse de la variété Mercedes (Carlier, 2016)

1-3-2- Cacao brésilien

La variété brésilienne de cacao, une nouvelle variété largement cultivée et développée par l'Institut de développement agricole (IRAD) du Cameroun, a permis d'augmenter les rendements à 2 tonnes/ha, contribuant à la prospérité des planteurs (Figure 7). En effet, cette variété de semences de seconde génération développée par l'IRAD permet des rendements bien meilleurs par rapport à la première génération développée dans les années 1970 et 1980 (environ 1 tonne par hectare). Des variétés de semences de cacao de meilleure qualité ont aidé à résoudre le problème de l'exode rural (Tonye, 2020).

GÉNÉRALITÉS



Figure 7 : Cabosse de la variété Cacao brésilien (Tonye, 2020)

1-3-3- Cacao "Nacional"

Le cacao "Nacional" ne pousse qu'en Equateur. En fait, c'était pratiquement la seule variété cultivée jusqu'au début du XXe siècle (Loor, 2007). Il possède de grosses gousses très rugueuses et de très grosses graines violettes (Figure 8) (Tixier, 2013). Le cacao "Nacional" ne fournit qu'une petite fraction de la production mondiale de cacao. Les fèves des cacaoyers domestiques ont un arôme délicat et sont des cacaos fins et parfumés très prisés. Cet hybride est considéré comme la troisième variété de fèves de cacao (Chen-Yen-Su, 2020).



Figure 8 : Cabosse de la variété "Nacional" (Tixier, 2013)

GÉNÉRALITÉS

1-3-4- Variété CCN-51 en Equateur

Le cultivar équatorien CCN-51 est connu comme un croisement entre Nacional et Trinitario (Figure 9). Le nom "Ariba" a deux définitions : le premier fait référence à l'origine de la production et le second au caractère aromatique et à la saveur qu'il produit. La fève se caractérise par son arôme sucré d'où une faible acidité et faible amertume, générant lors de la mastication un parfum floral comparable à la fleur d'oranger (Chen-Yen-Su, 2020).



Figure 9 : Cabosse de la variété CCN-51 (Chen-Yen-Su, 2020)

1-4- Production mondiale

L'importance du cacao est aujourd'hui si élevée qu'il se classe au troisième rang après le sucre et le café sur le marché mondial des produits de base. Il existe trois principales régions productrices de cacao dans le monde : Amérique du Sud, Afrique de l'Ouest et Asie du Sud-Est (Owusu, 2010).

L'Afrique de l'Ouest produit environ 70 % du cacao mondial (Organisation internationale du cacao, ICCO, 2019). Ensemble, la Côte d'Ivoire et le Ghana produisent 2,5 millions de tonnes de cacao commercialisable sur les 4 millions de tonnes mondiales. Cette production mondiale se répartit entre l'Indonésie (10%), le Nigeria (5%), le Brésil (4%), le Cameroun (5%) et l'Equateur 4% (ICCO, 2019) (Figure 10).

GÉNÉRALITÉS

La production mondiale est dominée par le cacao de type Forastero (près de 90%). Les Criollos se font désormais rares (moins de 2,5 de la production mondiale, car c'est un cépage très fragile mais prisé pour ses qualités aromatiques). Trinitario représente environ 5 % de la production mondiale (Afoakwa, 2010). Cacao domestique, le cacao Grand Cru ne représente que 2% de la production mondiale

Selon l'Accord international sur le cacao (2010), 15 pays sont des producteurs qui exportent exclusivement ou partiellement du cacao aromatisé premium : Colombie, Costa Rica, Dominique, République dominicaine, Papouasie-Nouvelle-Guinée, Pérou, Sainte-Lucie, Équateur, Grenade, Indonésie, Jamaïque, Sao Tomé-et-Principe, Trinité-et-Tobago, Venezuela, Madagascar.

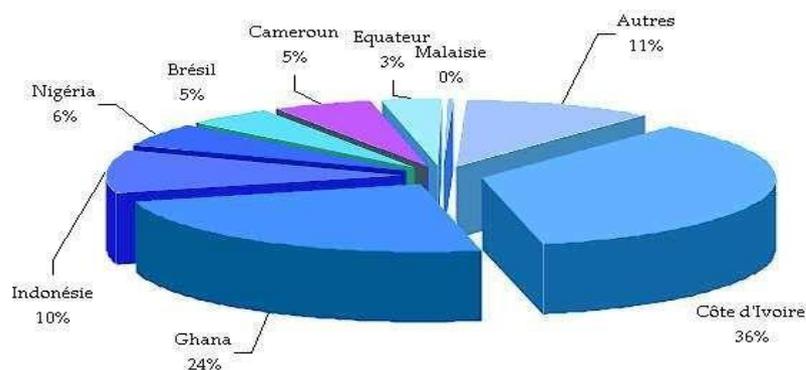


Figure 10 : Principaux pays producteurs de cacao

(Conférences des Nations Unies sur le Commerce et le Développement, CNUCED, Juin 2010)

2- Récolte et étapes post-récolte dans le traitement du cacao

2-1- Récolte des cabosses

Normalement, les cabosses de cacao mûrissent toute l'année et la récolte a lieu presque toute l'année, mais en pratique la grosse récolte a lieu d'octobre à décembre, principalement en Afrique de l'Ouest. La récolte des cabosses est principalement effectuée par les hommes. Séparer le fruit de l'arbre est une tâche laborieuse et délicate qui demande habileté et force (Bouet *et al.*, 1977). Les gaines autour du tronc sont coupées à la main ou à la machette, et les gaines autour des branches supérieures nécessitent l'utilisation d'une petite faucille à double tranchant au bout de la perche (Beckett, 2009).

GÉNÉRALITÉS

La récolte doit être effectuée toutes les 2 à 4 semaines, car une récolte fréquente réduit les pertes pour les rongeurs, les écureuils, les singes, les papillons de nuit et diverses maladies de flétrissement des gousses (Bouet *et al.*, 1977). Lorsqu'elles ne sont pas mûres, la biosynthèse de la graisse et de la pulpe n'est pas complète, de sorte que les cabosses doivent idéalement être récoltées à maturité. Si les cabosses sont trop mûres, elles commencent à se dessécher et la pulpe est sous-fermentée (Barel, 2013).

2-2- Etapes post-récoltes dans le traitement du cacao

Le traitement post-récolte du cacao représente l'ensemble des opérations technologiques permettant d'obtenir le cacao marchand à partir des fèves de cabosses récoltées.

2-2-1- Écabossage

Après la récolte, les cabosses sont soit cassées immédiatement, soit stockées par certains producteurs pendant plusieurs jours pour permettre aux cabosses immatures d'atteindre leur pleine maturité (Barel, 2013). Le temps qui s'écoule entre la récolte et l'ouverture des cabosses est appelé "temps de stockage". Le décortiquage consiste à ouvrir les cabosses en les coupant avec une machette, en frappant les cabosses au sol ou en les frappant avec une massue en bois (Figure 11) pour ouvrir les cabosses et libérer les graines. L'utilisation d'une machette risque d'abîmer la graine ou de créer une plaie qui facilite l'entrée des microbes. Pour cette raison, nous recommandons de frapper le pod avec un gourdin en bois (Barel, 2013).



Figure 11 : Écabossage du cacao (Hamdouche, 2015)

GÉNÉRALITÉS

2-2-2- Fermentation

La fermentation des fèves de cacao est une étape essentielle du traitement post-récolte. Cela prend 2 à 8 jours, selon la variété de cacao et la méthode de culture (De Vuyst et al., 2010). Il déclenche une série de réactions biochimiques qui se déroulent au centre de la pulpe et des cotylédons sous l'action de microorganismes qui contaminent la pulpe et les fèves de cacao lors de leur ouverture par simple contact des mains des agriculteurs ou par le matériel utilisé. Le processus de fermentation a trois objectifs principaux. L'action microbienne élimine le mucus, tue l'embryon, empêche la germination et finalement déclenche des réactions biochimiques dans les cotylédons pour former les précurseurs de l'arôme (Schwan & Wheals, 2004). Il existe plusieurs techniques de fermentation, les plus couramment utilisées sont réalisées en tas, caisses ou paniers (Guehi et al., 2010 ; Papalexandratou et al., 2011a ; Bankoffi et al., 2014).

2-2-2-1- Fermentation en tas

Dans la fermentation en tas, les fèves de cacao sont placées et couvertes sur des feuilles de bananier (Figure 12). Cette pratique concerne environ 60% du cacao produit. L'avantage de cette technique est de réduire le nombre d'extractions car elle assure un bon échange gazeux entre les fèves et le milieu extérieur, mais elle ne peut pas protéger les fèves des changements de température (Barel, 2013).



Figure 12 : Fermentation en tas du cacao (Hamdouche, 2015)

GÉNÉRALITÉS

2-2-2-2- Fermentation en caisses

La fermentation en caisses se déroule dans des caisses en bois ou en plastique (Figure 13) (Guehi *et al.*, 2010). La fermentation dans des boîtes en plastique est moins courante car elle produit un volume plus élevé de fèves sous-fermentées par rapport aux deux autres méthodes (fermentation en tas et en caisse). Le cacao fermenté en caisses perforées est généralement de meilleure qualité car il possède une meilleure isolation, indispensable à une fermentation en douceur (Barel, 2013).



Figure 13 : Fermentation en caisse (Hamdouche, 2015)

2-2-2-3- Fermentation en panier

La fermentation en paniers est une technique traditionnelle très pratiquée au Nigéria (Hamdouche, 2015). La fermentation est effectuée dans des paniers en fibres végétales contenant 10 à 150 kg de fèves, posés sur le sol et recouverts de feuilles de bananiers. Le brassage est réalisé en transvasant les fèves d'un panier à un autre.

2-2-2-4- Fermentation en plate-forme

Bien que la fermentation sur plateforme soit considérée comme une méthode dépassée (Doyle *et al.*, 2001), elle est encore largement utilisée, par exemple en Afrique de l'Ouest, en raison de son faible coût (Lainé, 2001). Cette technique se traduit par un taux de fermentation plus faible, probablement pour cette raison. Il a été historiquement appliqué aux fèves Criollo. En fait, les fèves Criollo nécessitent une courte période de fermentation (environ 2-3 jours). De plus, cette technique est considérée comme inadaptée à la variété Forastero car elle nécessite un temps de fermentation plus long (5-8 jours). La fermentation sur plate-forme favorise la

GÉNÉRALITÉS

croissance de moisissures indésirables et le développement conséquent de saveurs indésirables (Doyle et al., 2001).

2-2-3- Réactions biochimiques impliquées dans la fermentation

2-2-3-1-Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique a lieu dans les 48 premières heures et l'essentiel du travail des levures s'effectue. Elle se déroule en anaérobie stricte produit par une pulpe visqueuse qui réduit la diffusion de l'oxygène à travers la masse des fèves (Arana-Sanchez *et al.*, 2015). Les sucres de la pulpe sont convertis en alcool éthylique avec dégagement de dioxyde de carbone et une très forte augmentation de la température. A ce stade, la plupart des précurseurs de composés aromatiques sont formés.

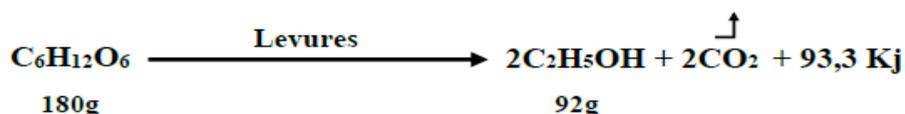


Figure 14 : Réaction de fermentation alcoolique

2-2-3-2-Fermentation lactique

La fermentation lactique est consécutive à celle de la fermentation alcoolique principalement sous l'action des bactéries lactiques. Ainsi, la liquéfaction de la pulpe induite par les bactéries lactiques conduit à une micro-aération, la transformation des sucres en alcools et l'augmentation du pH créent de nouvelles conditions favorables à leur développement. Cependant, la fermentation lactique est indésirable dans le cacao à cause de la production d'acide lactique qui est non-volatile (Mounjouenpou, 2008).

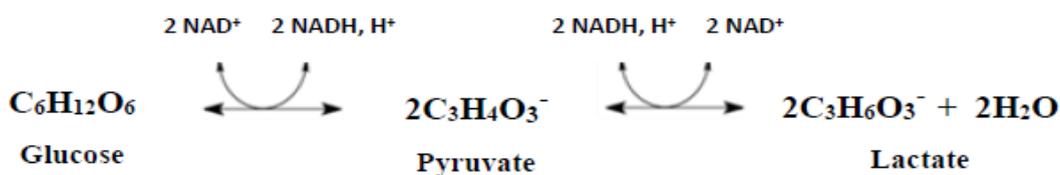


Figure 15 : Réaction de fermentation lactique

2-2-3-3-Fermentation acétique

Le stade aérobie est caractérisé par l'action de bactéries acétiques qui dégagent de la chaleur et oxydent l'alcool éthylique en acide acétique (Kedjébo, 2016). Ceci est suivi par la mort embryonnaire, le changement de couleur des cotylédons du violet au brun et la formation de composés précurseurs d'odeurs spécifiques (Crafack *et al.*, 2014).

GÉNÉRALITÉS

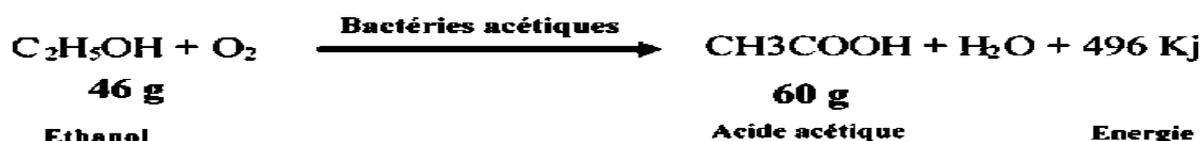


Figure 16 : Réaction de fermentation acétique

2-3- Brassage

Le brassage consiste à développer un système d'aération des fèves de cacao pendant la fermentation (Figures 14A et 14B) et est un facteur important pour le bon déroulement de celle-ci. L'aération est également essentielle pour la croissance des microorganismes qui jouent un rôle important dans la fermentation (Hamdouche, 2015).

Les temps de fermentation sont très variables. Cela dépend du type de cacaoyer, des conditions climatiques, de la quantité de masse de cacao pendant la fermentation et de la méthode utilisée. Évaluer le moment opportun pour arrêter la fermentation selon des critères subjectifs : gonflement des fèves, odeur de touffe, couleur des cotylédons, baisse de température. Tout cela exige de l'expérience et de la pratique. Cela prend en moyenne 5 à 7 jours.



(A) Brassage à la main

(B) Brassage à l'aide d'une planche

Figure 17 : Brassage au cours de la fermentation

2-4- Séchage

Après l'étape de fermentation, les fèves de cacao sont séchées. Le séchage est la deuxième opération la plus importante dans la transformation post-récolte du cacao (Barel, 2013). Le but du séchage est de réduire la teneur en humidité des fèves fermentées d'environ 50-60 % à 8 % (Djedjro *et al.*, 2008), bloquant ainsi les réactions enzymatiques et empêchant le développement de moisissures. Cette étape permet donc une bonne conservation du cacao

GÉNÉRALITÉS

commercial obtenu. La température de séchage doit être inférieure à 60°C. Deux modes de séchage ont été observés dans le monde du cacao qui sont le séchage solaire ou naturel et séchage artificiel.

2-4-1- Séchage naturel

En général, le séchage au soleil est le procédé le plus couramment utilisé par les producteurs qui fournissent la quasi-totalité de la production mondiale (Djedjro *et al.*, 2008). Le temps de séchage moyen est de 8 à 15 jours. Cette opération est réalisée avec divers dispositifs (bois, tôle, bâche, surfaces adhésives, bitume). Un cacao plus propre peut être obtenu en utilisant le râtelier comme zone de séchage (Kouakou *et al.*, 2013). L'avantage du séchage à l'air est qu'il ne nécessite pas d'énergie et facilite l'évaporation de l'acide acétique produit lors de la fermentation (Barel, 1998). Les réactions biochimiques devraient durer les premiers jours de la chirurgie. Les inconvénients du séchage au soleil sont la grande surface nécessaire pour étaler les fèves et la nécessité de mélanger régulièrement la masse. De plus, il est fortement influencé par le changement climatique de temps à autre. L'humidité reviendra et les fèves moisiront si des précautions ne sont pas prises.

2-4-2- Séchage artificiel

Le séchage artificiel est effectué dans une étuve ventilée (Hii *et al.*, 2009). N'affecte que 10 % du cacao produit (Barel, 2013). Utilisé dans des conditions climatiques défavorables (zones humides ou ombragées) ou dans de gros volumes de fèves. Cette méthode est principalement utilisée dans les coopératives. Les principaux inconvénients sont la rétention d'acides volatils et une forte consommation d'énergie. En raison de la différence de pression de vapeur et de diffusion de l'eau et de l'acide acétique observée aux températures de séchage au four (supérieures à 45 ° C), l'eau s'évapore d'abord des grains et les solutés s'accumulent autour d'eux, formant une barrière qui empêche l'acide acétique de s'échapper (Jaquet *et al.*, 1980). Ce type de séchage est la principale cause de la forte acidité volatile du cacao. Gardez à l'esprit que les séchoirs artificiels sont souvent maltraités. En fait, il est important de laisser le temps aux grains de sécher. Un séchage trop rapide extraira l'eau trop rapidement pour éliminer suffisamment d'acide acétique. Plusieurs études comparant le séchage naturel et artificiel ont conclu que le séchage naturel au soleil donne les meilleurs résultats (Bonaparte *et al.*, 1998 ; Zahouli *et al.*, 2010).

GÉNÉRALITÉS

2-5- Stockage

Le stockage des fèves sur le site de production est une tâche très délicate parce que la moindre contamination par des moisissures affecte la qualité finale du produit. Les fèves doivent être stockées dans de bonnes conditions, à l'abri de la chaleur et de l'humidité de l'air, qui favorisent la croissance des moisissures et des insectes (Barel, 2013). Certains producteurs stockent généralement les fèves de cacao sèches dans des sacs de jute de 60 à 65 kg. Celles-ci sont fermes mais peuvent réabsorber l'humidité. Ils peuvent être empilés les uns sur les autres et sont également biodégradables. Lorsqu'elles sont stockées correctement, la teneur en humidité des grains ne doit pas dépasser 6 ou 7 %, et au-dessus de 8 %, il existe un risque de développement de moisissures. En dessous de 5%, les fèves deviennent très cassantes. La période de stockage est illimitée et varie selon le fabricant. Les sacs sont expédiés dans des cales bien ventilées pour éliminer l'air humide (Cook, 1982 ; Beckett, 2009).

3- Microorganismes impliqués dans la fermentation du cacao

Diverses études décrivent la transition des groupes microbiens au cours des différentes étapes de la fermentation des fèves de cacao (Ardhana & Fleet, 2003 ; Koffi *et al.*, 2013). Cette étude scientifique a montré que la levure était le premier type de microorganisme (J1 à J2) à se développer, suivie des bactéries lactiques (LAB), puis des bactéries acétiques (AAB), et des bactéries aérobies sporulées en fin de fermentation. Les modifications microbiennes au cours de la fermentation reflètent l'évolution des propriétés du milieu de fermentation et de la composition chimique du cacao (pulpe et fèves). En effet, le relais précité du microbiote ne se produit qu'avec une aération adéquate, entraînant des profils de température et de pH (4,5) propices au développement de différentes familles microbiennes (Biehl *et al.*, 1989).

3-1- Levures

La fermentation alcoolique a lieu durant les deux premiers jours de fermentation. La levure est le microorganisme dominant. Elles libèrent du dioxyde de carbone pour convertir les sucres (saccharose, glucose et/ou fructose) en alcool éthylique. La réaction a lieu dans des conditions anaérobies (en raison de la densité de la pulpe qui empêche l'air de pénétrer entre les fèves) et en conditions acides (en raison de la présence d'acide citrique dans la pulpe, pH = 3,5). Certaines levures ont une bonne activité pectinolytique qui hydrolyse le mucilage de la fève, provoquant la liquéfaction de la pulpe (Schwan *et al.*, 1997 ; Crafacck *et al.*, 2013). A ce stade, la quantité maximale de levure est de 6 à 8 log UFC/g de cacao (Nielsen *et al.*, 2007 ; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007). Cette fermentation alcoolique est modérément exothermique (93,3 kJ, la

GÉNÉRALITÉS

température monte à 35-40 °C après 48 heures) et le pH légèrement élevé, probablement en raison de la consommation d'acide citrique par la levure. Des études menées sur des fèves fermentées ont montré que les levures *Hanseniaspora* sont le plus souvent isolées au cours des premières étapes de la fermentation (Ardhana & Fleet, 2003 ; Nielsen *et al.*, 2005 ; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007, 2008 ; de Melo Pereira *et al.*, 2013). Dans ce genre, *Hanseniaspora guilliermondii* est l'espèce la plus communément isolée du cacao fermenté au Ghana (Nielsen *et al.*, 2005, 2007 et 2008). *Hanseniaspora opuntiae* a également été isolée (Papalexandratou *et al.*, 2013). *Saccharomyces cerevisiae* est également impliqué dans la fermentation du cacao de diverses régions : Indonésie (Ardhana & Fleet, 2003), Brésil (de Melo Pereira *et al.*, 2013), République dominicaine (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007). De plus, il a été rapporté que des espèces telles que *Kloeckera apis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida zemplinina*, *Candida diversa*, *Issatchenkia orientalis* et *Pichia membranifaciens* jouent un rôle dans la fermentation alcoolique (Ardhana & Fleet, 2003 ; Nielsen *et al.*, 2005 ; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007, 2008 ; de Melo Pereira *et al.*, 2013). Aussi, Koffi *et al.* (2013) ont noté que la croissance des levures dans les fermentations de cacao en Côte d'Ivoire effectuées sur des feuilles de bananier était 17 fois plus élevée que dans les fermentations en bêche et en boîte.

3- 2- Bactéries lactiques

Les conditions micro-aérobies, le milieu acide (pH = 4) et la disponibilité du substrat favorisent le développement de lactobacilles principalement, atteignant une croissance de 7 à 7,8 log UFC/g de fèves de cacao (Nielsen *et al.*, 2007 ; Lagunes Galvez *et al.*, 2007). Des études ont montré que les bactéries lactiques les plus courantes trouvées dans le matériel végétal sont *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc pseudomesenteroides* (Camu *et al.*, 2007 ; Lefeber *et al.*, 2011 ; Papalexandratou *et al.*, 2011a, 2011b et 2013). D'autres espèces de bactéries lactiques des genres *Fructobacillus*, *Enterococcus* et *Weissella* ont également été détectées dans le cacao fermenté (Camu *et al.*, 2007 ; Lefeber *et al.*, 2011 ; Papalexandratou *et al.*, 2011b).

Les bactéries lactiques convertissent l'acide citrique et les sucres de la pulpe en acide lactique et, dans certains cas, en acide acétique et en éthanol par fermentation hétérolactique. Du fait de sa très faible volatilité, l'acide lactique synthétisé pénètre à l'intérieur de la fève et y reste en permanence. Par conséquent, l'acidité des cotylédons est augmentée, produisant des saveurs désagréables et des fèves finales de mauvaise qualité (Passos *et al.*, 1984). Ce type de fermentation est donc indésirable. Dans le cacao de Côte d'Ivoire, la croissance des lactobacilles

GÉNÉRALITÉS

pendant la fermentation de la bêche ($8,9 \cdot 10^9$ UFC/g) était significativement plus élevée que pendant la fermentation en boîte ($1,8 \cdot 10^8$ UFC/g) et la fermentation des feuilles de bananier ($1,5 \cdot 10^7$ UFC/g) (Kofi et al., 2013).

3-3- Bactéries acétiques

Les bactéries acétiques transforment l'éthanol en acide acétique par oxydation. Cette réaction très exothermique (496 kJ par molécule d'éthanol convertie) s'accompagne d'une montée rapide en température (jusqu'à 50 °C). La charge microbienne maximale d'*Acetobacter* des fèves de cacao varie entre 7,8 et 8 log UFC/g (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007). L'acide acétique produit dans ces conditions aérobies est un métabolite important dans le processus de fermentation des fèves de cacao. Cet acide pénètre dans les fèves et provoque la mort de l'embryon et la destruction des cellules internes en raison des températures élevées générées par l'oxydation de l'alcool. Cela marque la fin de la fermentation et initie des changements biochimiques dans la fève qui conduisent à la formation de molécules précurseurs de la saveur caractéristique du cacao (Nielsen *et al.*, 2005 ; Camu *et al.*, 2007). Ces propriétés se développent lors du séchage et de la torréfaction. La fève entière doit être mélangée régulièrement pour favoriser l'aération et obtenir une fermentation homogène. Le rythme le plus couramment employé est de brasser après 24 heures de fermentation et ensuite toutes les 48 heures.

Les bactéries d'acide acétique les plus courantes trouvées dans les fèves fermentées appartiennent au genre *Acetobacter*, avec une prédominance pour *A. pasteurianus*. D'autres espèces de *Acetobacter* (*A. syzygii*, *A. ghanensis*, *A. senegalensis*, *A. tropicalis*) constituent une communauté d'acétobactéries couramment identifiées sur le cacaoyer (Camu *et al.*, 2007 ; Papalexandratou *et al.*, 2011a, 2011b, 2013). Papalexandratou *et al.* (2011b) ont souligné la présence de *A. senegalensis* au début de la fermentation, tandis que Lefeber *et al.* (2011) ont montré que les bactéries acétiques n'étaient présentes qu'en fin de fermentation. Selon Nielsen *et al.* (2007), *A. syzygii*, *A. pasteurianus* et *A. tropicalis* prédominent tout au long de la fermentation. En Côte d'Ivoire, la fermentation en caisse et bêche a permis une meilleure croissance de *Acetobacter*, avec des valeurs maximales de $8 \cdot 10^6$ et $44 \cdot 10^4$ UFC/g de fèves (Koffi et al., 2013).

3-4- Moisissures et bactéries du genre *Bacillus*

Au fur et à mesure que la fermentation se prolonge, les conditions du milieu de fermentation évoluent vers l'épuisement du substrat microbien et l'aération reste importante. De

GÉNÉRALITÉS

nouvelles populations de bactéries apparaissent alors, notamment des bactéries sporulées, qui produisent un certain nombre de molécules qui affectent l'arôme final. Ces bactéries thermophiles ont peu de chances de se développer au début de la fermentation. En revanche, après les dernières étapes de la fermentation (augmentation du pH et de la température, modifications de la teneur en sucre et de la disponibilité en oxygène), ils peuvent devenir dominants dans la flore des fèves.

Les espèces observées dans le cacao fermenté comprennent *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus coagulans*. Cependant, leur rôle dans les processus de fermentation est inconnu (Ardhana & Fleet, 2003). *Bacillus licheniformis* se trouve dans les dernières étapes de la fermentation du cacao au Ghana (Nielsen *et al.*, 2007). Des bactéries non sporulées sont également présentes dans la fermentation du cacao, comme les entérobactéries : *Tatumella*, *Erwinia* et *Pantoea sp* (Papalexandratou *et al.*, 2011a ; Lefeber *et al.*, 2011).

4- Jus de mucilage de cacao

4-1- Transformation de la pulpe en jus

Les cabosses mûres de cacao contiennent normalement de 20 à 40 graines (fèves) enveloppées dans une pulpe mucilagineuse. Après la récolte, ces cabosses sont ouvertes, les fèves et la pulpe adhérente récupérées dans des sacs. Le jus brut de pulpe peut être ensuite obtenu par pressage ou par torsion de ces sacs ou par entassement des fèves (Figure 15). A partir de 10 kg de fèves fraîches, on peut obtenir approximativement jusqu'à 1,1 l/kg de jus selon ces procédés. Le jus s'écoulant doit être recueilli dans un récipient propre. En raison de sa teneur en acide, il ne doit pas rentrer en contact avec des objets métalliques. Pour la conservation, il faut au mieux utiliser les récipients en plastique (Baensch, 2000).



(B) Dispositif vue de l'intérieur

(A) Dispositif vue de l'extérieur

Figure 18 : Dispositif de collecte de jus de cacao par entassement des fèves (Baensch, 2000)

GÉNÉRALITÉS

D'un point de vue biologique, le jus de cacao est extrait de la pulpe mucilagineuse riche en pectine qui enrobe les fèves de cacao fraîches par l'action des enzymes pectinolytiques de la levure (Figure 16) (Barel, 2013). Ce jus blanchâtre contient des sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose (Made & Graham, 2003 ; Sandra *et al.*, 2007). En raison de sa forte teneur en sucres, notamment en glucose (56,6 mg/g) et en fructose (88,8 mg/g), et de sa richesse en micronutriments (Sandra *et al.*, 2007), le jus de cacao est favorable à la croissance de plusieurs microorganismes. Des études scientifiques menées à cet effet ont prouvé que la pulpe de cacao contient des microorganismes d'origines diverses. Certains microorganismes peuvent être présents sur les fèves à l'instar de levures trouvées dans le raisin. La charge varie autour de $4,4 \cdot 10^6$ UFC/ml (Elena *et al.*, 2007). Il s'agit de *Saccharomyces cerevisiae* (Rosslyn *et al.*, 2003 ; Elena *et al.*, 2007) et d'autres bactéries tels que *Lactobacillus fermentum* (Nielsen *et al.*, 2007 ; Camu *et al.*, 2007) et des moisissures.

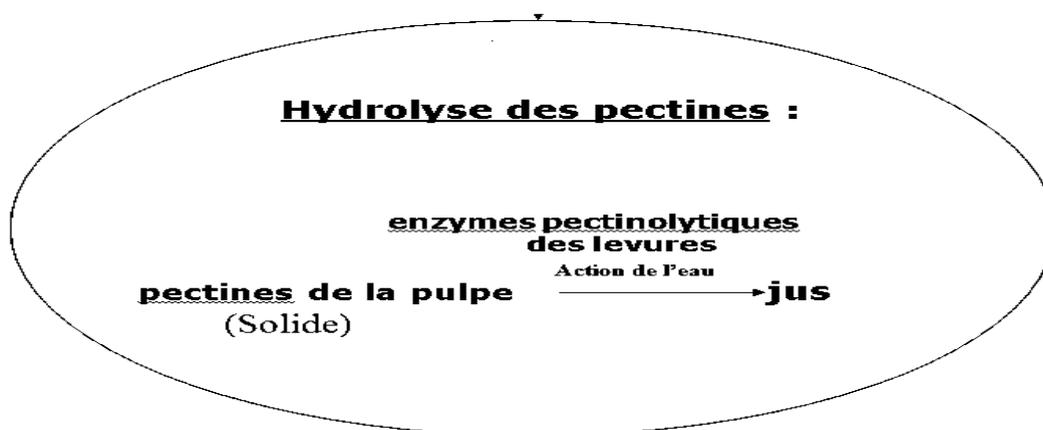


Figure 19 : Production du jus de mucilage de cacao par activité pectinolytique des levures (Barel, 2013)

4-2- Réactions biochimiques subies par le jus de mucilage de cacao

Une fois produit, le jus de mucilage est sujet à plusieurs réactions biochimiques à savoir la fermentation alcoolique réalisée principalement par les levures avec pour métabolite principal l'éthanol. L'éthanol produit est ensuite transformé en acide acétique par l'action des bactéries acétiques en conditions aérobies (Figures 17) (Barel, 2013). Par ailleurs, le taux relativement élevé d'éthanol dans le jus de mucilage pourrait supposer la présence de souches de levures résistant à l'éthanol (Cocolin *et al.*, 2016). En effet, ces auteurs ont rapporté que 38 % et 54 % du total des isolats issus de la fermentation des fèves de fermentation étaient capables de croître à 8, 10 et 12 % (v/v) d'éthanol, respectivement, *S. cerevisiae* affichait la plus forte croissance à 12 % d'éthanol.

GÉNÉRALITÉS

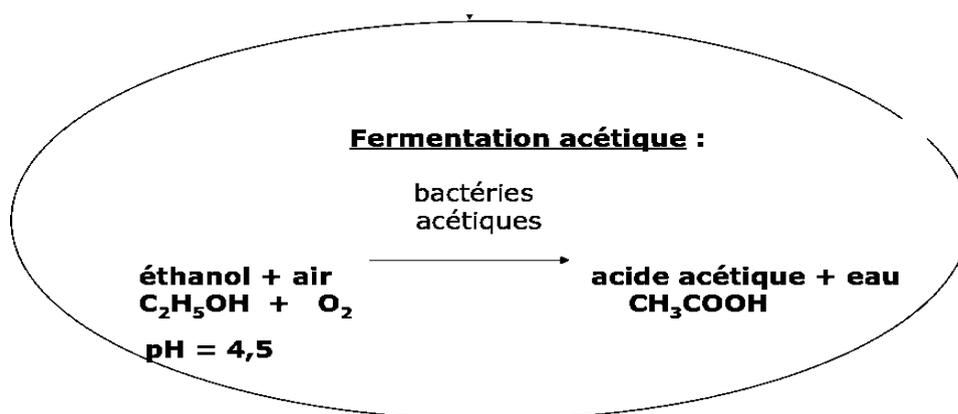


Figure 20 : Fermentation acétique se produisant dans le jus de mucilage (Barel, 2013)

4-3- Composition biochimique du jus de mucilage de cacao

Le jus de mucilage avec un pH compris entre 3,5 et 4 est composé principalement d'eau et de sucres (glucose et fructose). Il renferme également de l'acide citrique et de la pectine (Tableau I) (Pontillon, 1998 ; Baensch, 2000).

Tableau I: Composition biochimique du jus de mucilage de cacao

Composant	Concentration (%)
Eau	80
Sucres (Glucose/Fructose)	12-15
Acide citrique	5-7
Pectine	5-7

Source : Baensch, (2000)

4-4- Valeur nutritionnelle du jus de mucilage de cacao

Les principaux constituants du jus de mucilage sont l'eau, les glucides, protides, lipides, minéraux et vitamines (Tableau II).

Le jus de mucilage de cacao doit son importance nutritionnelle à sa teneur en vitamines et minéraux. Le taux élevé de sucres dans le jus, composants majoritaires et sources d'énergie rapide, lui confère une assez bonne valeur énergétique (Anvoh, 2013).

GÉNÉRALITÉS

Tableau II: Valeur nutritionnelle du jus de mucilage de cacao

Composant	Concentration
Saccharose	214 g/L
Glucose	3,2 g/L
Protéines	7,2 g/L
Lipides	5,5 g/L
Sodium	30,5 mg/L
Magnésium	82 mg/L
Acide citrique	9,1 mg/L
Acide acétique	2.3 mg/L
Acide malique	1,2 mg/L
Vitamine C	18 mg/L

Source : (Anvoh, 2013)

4-5- Composés phénoliques de jus de mucilage de cacao

A ce jour, il n'existe pratiquement pas aucune donnée sur les composés phénoliques du jus de mucilage de cacao. Toutefois, les composés phénoliques présents dans le jus de mucilage proviendraient probablement des fèves.

Selon Niemenak *et al.* (2004), les fèves de cacao sont riches en polyphénols en particulier les flavonoïdes où ils représentent 12 à 18 % du poids sec d'une fève en bonne santé. Ils ont révélé également que toutes les fèves de cacao, quelles que soient leur origine génétique et le processus de fermentation utilisé, contiennent qualitativement les mêmes composés phénoliques dont les principaux sont l'épicatéchine qui est présent avec 2 à 4 % du poids sec, la catéchine, la quercétine. L'épicatéchine (flavonoïdes) a un effet bénéfique pour la santé en (Figure 18). Ce composé joue un rôle d'anti-oxydant dans la lutte contre les radicaux libres de l'oxygène. Il fait diminuer le taux sanguin de LDL-Cholestérol (Mathur *et al.*, 2002 ; Carl *et al.*, 2005) tout en empêchant son oxydation (Kondo *et al.*, 1996 ; Osokabe *et al.*, 2002). L'épicatéchine inhibe les agrégations plaquettaires qui conduisent à la formation de thrombus au niveau des artères coronariennes (Rein, 2000 ; Murphy *et al.*, 2003). Le cacao est plus riche en polyphénols que le café et le thé (Lee *et al.*, 2003).

Les flavonoïdes sont également impliqués dans la défense immunitaire. En effet, plusieurs auteurs notamment Sanbongi *et al.* (1997) ont montré que le cacao a un effet bénéfique sur le système immunitaire. Thomas *et al.* (2007) ont étudié *in vitro* l'effet des flavonoïdes et les procyanidines sur les monocytes, les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 contenus dans la poudre de cacao. Ces auteurs ont conclu que les polymères ont un pouvoir de stimulation à la fois sur le système immunitaire inné et sur les réactions primitives de l'immunité adaptative. Wan *et al.* (2001) et Holt (2002) ont aussi montré une augmentation

GÉNÉRALITÉS

des procyanidines dans le plasma humain après consommation de flavonoïdes du cacao. Selon Mao *et al.* (2003), ces molécules ont un effet favorable sur la synthèse et la sécrétion d'interleukines 1 β dans les cellules mononucléaires périphériques du sang, lesquels ont une activité antivirale et anti proliférative.

Selon les travaux de recherches scientifiques de Levy *et al.* (1999) et de Davey *et al.* (2000), l'addition de l'interleukine-2 (IL-2) induisait une augmentation significative du nombre de lymphocytes CD4 circulants. Aussi ces auteurs ont-ils montré que des patients traités par IL-2 pendant au moins 3 ans ont une réponse immunologique soutenue.

De ce qui précède, les produits à bases de cacao pourraient être recommandés dans la prise en charge nutritionnelle des personnes vivant avec le VIH sous thérapie avec un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 350 copies/mm³(Hulgan *et al.*, 2005).

Par ailleurs, d'un point de vue quantitatif, les concentrations en polyphénols sont fonction de la variété. En effet, Niemenak *et al.* (2004) ont obtenues des valeurs allant de 67 à 149,2 mg de polyphénols par gramme de fèves fraîches. Ces dernières ont subi le même processus de fermentation pourtant toutes ne présentent pas les mêmes variations : pour certaines variétés, la quantité de polyphénols augmentait de 25%, pour d'autres cette valeur diminuait de l'ordre de 14 à 25 %, enfin pour les certains, les quantités restaient constantes. Ces différences pourraient être attribuées aux différentes conditions de culture, le climat (l'intensité de la lumière ou l'humidité), la position de la cabosse sur l'arbre, la zone géographique ou l'origine du cacao. Des grands pays producteurs de cacao, la Côte d'Ivoire occupe la 3^{ième} place en termes de richesse de ses fèves en polyphénols derrière l'Equateur et le Brésil (Figure 19).

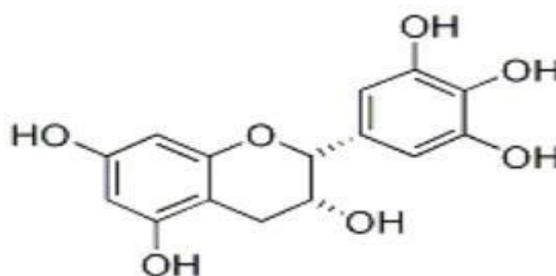


Figure 21 : Structure de l'épicatéchine

GÉNÉRALITÉS



Figure 22 : Polyphénols en fonction de l'origine du cacao (Bloch, 2014)

5- Valorisation des sous-produits du cacao

Le processus de fermentation des fèves de cacao comporte plusieurs étapes, générant des sous-produits souvent abandonnés en tant que déchets à savoir les coques et le jus de mucilage.

5-1- Coques

La coque de cacao représente 52 à 56 % du poids d'une cabosse mûre. Plusieurs travaux menés sur la composition chimique des coques de cabosse ont montré que la coque est riche en énergie brute (4150 kcal/kg), en cellulose (18,6 %) et en potassium (2,5 %). La coque de cacao connaît des utilisations diverses qui vont de l'abandon pur et simple à la fabrication de savon grâce à sa teneur en potassium en passant par l'alimentation animale et la production d'engrais (Pitcholo, 1990). En effet, la grande partie de la coque est abandonnée dans les champs après les opérations d'écabossage. Les coques pourrissent et fournissent ainsi des engrais potassiques aux cacaoyers. Mais selon les agriculteurs, les engrais à base de coque favorisent l'installation de la pourriture brune des cabosses, maladie très répandue en cacao-culture. De plus en plus, les coques de cabosses sont ramassées et servent de matériaux de chauffage après séchage. La cendre est ensuite recueillie pour la fabrication de potasse, puis de savon après saponification (Pitcholo, 1990). En alimentation animale, les coques de cabosses sont utilisées comme complément dans l'alimentation des porcins au Brésil, du bétail au Nigéria, des volailles au Sénégal où elles ont contribué aux performances de croissance (Opeke, 1982 ; Pitcholo, 1990). En effet, les coques évidées subissent un séchage solaire, puis sont moulues à l'aide d'un moulin ou d'un mortier. La poudre obtenue est ensuite additionnée

GÉNÉRALITÉS

à une céréale (maïs) avec un ratio de 1:3 de poudre de coque et 2:3 de poudre de maïs (Figure 20) (Adabe & Ngo-Samnack, 2000).



Figure 23 : Production d'aliment pour bétail à partir de coques de cacao (Adabe & Ngo-Samnack, 2000)

5-2- Jus de mucilage de cacao

Le jus de cacao est extrait de la pulpe mucilagineuse qui enrobe les fèves fraîches de cacao. Jusqu'à ce jour malheureusement, très peu de travaux ont été consacrés au jus de cacao. En Côte d'Ivoire, seul Anvoh (2013) a entrepris des travaux scientifiques de valorisation du jus de mucilage de cacao à travers la transformation du jus de mucilage de cacao en pâte à tartiner, en marmelade et en vinaigre. Par ailleurs, le jus de mucilage, utilisé comme complément alimentaire dans l'élevage de lapins au Nigéria (Ayindé *et al.*, 2010) et dans la production de pectine en Amérique latine (Bazarte *et al.*, 2008). Aujourd'hui aucune étude n'a été encore consacrée à la valorisation biotechnologique, nutritionnelle et fonctionnelle du jus de mucilage de cacao.

6- Bioéthanol

6-1- Définition et propriétés

L'éthanol est aussi connu sous le nom d'alcool éthylique. Sa formule chimique est $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Le bioéthanol, ou éthanol biosourcé, est de l'éthanol produit à partir de biomasse fermentée. C'est le même éthanol qui est retrouvé dans les boissons alcoolisées. De nos jours, le bioéthanol est le biocarburant liquide le plus utilisé au monde (Cruz *et al.*, 2014). Il est principalement produit par fermentation microbienne de sucre ou d'amidon à partir de diverses matières premières, y compris la canne à sucre, la betterave à sucre, le maïs, les céréales, les déchets agricoles, les déchets forestiers, les déchets municipaux, les fumiers de bétail, etc. Lorsque les sucres sont présents sous forme de polysaccharides, un processus d'hydrolyse (acide ou enzymatique) est généralement utilisé pour la déliquification et la formation de sucres

GÉNÉRALITÉS

fermentescibles avant la fermentation. À l'aide de microorganismes (par exemple, la levure), les sucres hydrolysés (par exemple, le glucose) sont convertis en éthanol (bioéthanol) pendant le processus de fermentation. La distillation et la déshydratation sont ensuite utilisées pour produire un alcool sans indice d'octane élevé, également appelé éthanol déshydraté ou éthanol anhydre (Champagne, 2008 ; Escobar *et al.*, 2009). Le bioéthanol produit peut-être directement utiliser comme substitut de l'essence dans les moteurs. Le tableau III illustre les propriétés physico-chimiques de l'essence et de l'éthanol (bioéthanol). Il a été observé que l'éthanol a un pouvoir calorifique inférieur (21,1 MJ/L) à celui de l'essence (30 – 33 MJ/L), donc plus d'éthanol est nécessaire pour obtenir le même rendement. Cependant, l'indice d'octane plus élevé de l'éthanol permet d'utiliser un taux de compression du moteur plus élevé, ce qui conduit à une efficacité thermique améliorée et à une puissance accrue, réduisant ainsi quelque peu la différence de consommation de carburant (Cruz *et al.*, 2014). Il a également été observé qu'il existe des différences importantes entre les autres propriétés des deux carburants, par exemple, viscosité, gravité spécifique, point de congélation, point d'ébullition, point d'éclair, pression de vapeur, limite d'inflammabilité, température d'auto-inflammation, richesse nécessaire du mélange air-carburant, etc.

GÉNÉRALITÉS

Tableau III: Propriétés physico-chimiques de l'essence et de l'éthanol

Propriétés	Essence	Éthanol
Formule	C4 à C12	C ₂ H ₅ OH
Poids moléculaire	100-105	46,07
Densité à 15 °C (kg/L)	0,69-0,79	0,79
Densité (densité relative) à 15 °C	91	106-110
Point de congélation (°C)	- 40	- 114
Point d'ébullition (°C)	27-225	78
Pression de vapeur à 38 °C (kPa)	48-103	15,9
Chaleur spécifique (kJ/kg/K)	2,0	2,4
Viscosité à 20 °C (mPa.s)	0,37- 0,44	1,19
Pouvoir calorifique inférieur (kJ/L)	30-33	21,1
Point d'éclair (°C)	- 43	13
Température d'auto-inflammation (°C)	257	423
Limite inférieure d'inflammabilité (% vol)	1,4	4,3
Limite supérieure d'inflammabilité (% vol)	7,6	19,0
Rapport stœchiométrique air-carburant	14,7	9,0
Indice d'octane de recherche	88-100	108,6
Indice d'octane moteur	80-90	89,7

Source : Ruan *et al.* (2019)

6-2- Production mondiale de bioéthanol

L'Amérique du Nord était le premier producteur mondial d'éthanol en 2019 et représentait près de la moitié de la production mondiale, suivie de l'Amérique latine (Figure 21). Le continent américain concentrait à lui seul 79 % de la production mondiale de ce type de biocarburants grâce aux États-Unis et au Brésil. Le reste du monde dont l'Afrique fait partie ne produit que seulement 1 % ; ce qui reste très faible témoignant ainsi la dépendance des pays Africains aux énergies fossiles ("Perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO 2020-2029", données extraites le 14 mars 2021)

GÉNÉRALITÉS

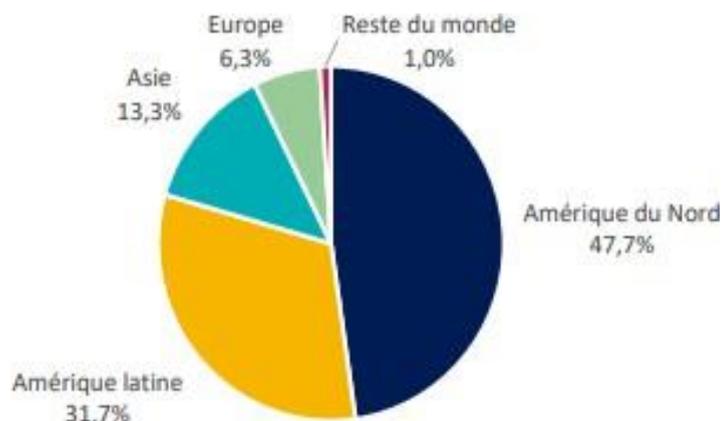


Figure 24 : Production mondiale d'éthanol par zone géographique en 2019

(Source : "Perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO 2020-2029", données extraites le 14 mars 2021)

6-3 Matières premières utilisées pour la production du bioéthanol pour les biocarburants

Les biocarburants restaient encore largement produits à partir de matières agricoles de première génération en 2020. Le maïs a servi à fabriquer les deux tiers de la production mondiale d'éthanol, devant la canne à sucre (26 %) (Figure 22). Les huiles végétales représentaient près des trois quarts de la production de biodiesels et des huiles végétales hydrotraitées (HVH), avec une part importante d'huile de colza. D'après le dernier rapport de l'OCDE et la FAO, « les biocarburants avancés issus de produits celluloseux (tels résidus de récolte, cultures dédiées à la production énergétique ou bois) occupent une place marginale dans la production totale de biocarburants ». Les autres céréales sont représentées par manioc, betteraves sucrières, sorgho etc.

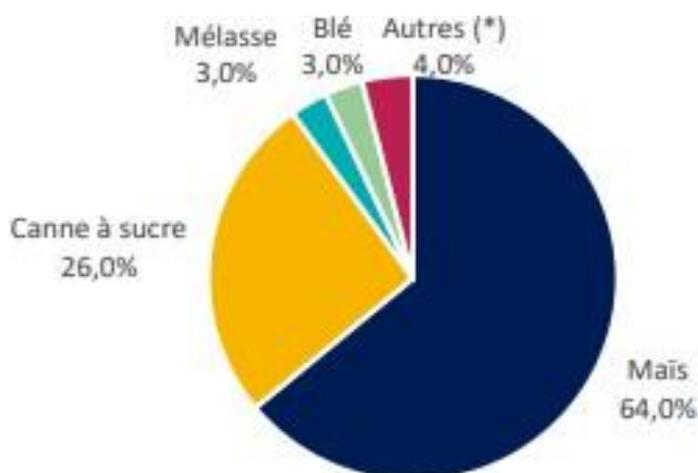


Figure 25 : Matières premières utilisées pour la production d'éthanol pour les biocarburants

(Source : Perspectives Agricoles de l'OCDE et de la FAO 2020-2029)

GÉNÉRALITÉS

6-4- Modes de consommation du bioéthanol

En général, le bioéthanol est utilisé dans 3 secteurs d'activités à savoir : les carburants, les boissons et en industries.

6-4-1- Applications industrielles

Le bioéthanol occupe une place de choix dans les industries chimiques et para chimiques au même titre que l'éthanol produit par voie chimique. Il est utilisé principalement dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques et articles de toilette, détergents et produits de nettoyage, les encres d'imprimerie, les peintures et revêtements, le lavage d'écran et dégivreurs pour l'industrie automobile, les biocides et autres utilisations médicales et dans la production d'importants intermédiaires chimiques, comme pour les polymères et les plastiques (Alio, 2021).

6-4-2- Consommation pour le déplacement

L'usage du bioéthanol pour la mobilité s'est généralisé pour les moteurs essence en France et dans beaucoup de pays, et ce parce que le bioéthanol est un biocarburant que l'on incorpore à l'essence. Ainsi, l'éthanol biosourcé est majoritairement destiné à être utilisé comme carburant, soit environ 66 % de la consommation de l'éthanol en France selon le Syndicat National des Producteurs d'Alcool Agricole (Alio, 2021). Cet éthanol doit être anhydre (moins de 1 % d'eau) et il est dénaturé (rendu impropre à la consommation humaine) pour une utilisation pour le transport, en ajoutant 2 à 5 % en volume de dérivés pétroliers, généralement des pentanes. Cet éthanol dénaturé est principalement utilisé en mélange à faible concentration avec de l'essence moteur pour son apport en oxygène ou comme activateur (booster) d'octane. À des concentrations élevées, il est utilisé pour alimenter des véhicules à carburant alternatif spécialement conçus pour son utilisation. Ainsi, différentes flottes de véhicules à éthanol s'inscrivent dans une conception évolutive de la mobilité (moins carbonée et plus diversifiée), sont déployées depuis quelques années. Toujours selon le Syndicat National des Producteurs d'Alcool Agricole en France l'utilisation de bioéthanol comme carburant permet de réduire de près de 50 % les émissions de gaz à effet de serre par rapport aux carburants conventionnels fossiles, ce qui représente un atout non négligeable en termes environnementaux. Sur le plan économique, le bioéthanol présente un autre avantage majeur : il est bien moins cher à la pompe que l'essence, même s'il faut bien avouer que cela provient de subventions à la production ou de taxes réduites à la vente. Dans un contexte de hausse à long terme du prix des produits pétroliers liés à l'épuisement des ressources, le bioéthanol offre une des meilleures solutions de repli puisque son prix est jusqu'à 75 % plus bas que celui des

GÉNÉRALITÉS

autres carburants. Cependant, un désavantage réside dans une légère surconsommation du véhicule par rapport à l'essence sans plomb (Alio, 2021).

7- Pectinases

Issu de la dégradation des matériaux pectiques enrobant les fèves par action de levures pectinolytiques, le jus de mucilage de cacao pourraient contenir ces levures productrices de pectinases.

7-1-Différents groupes de pectinases

L'hydrolyse des pectines est catalysée par un groupe d'enzymes appelées pectinases. Les enzymes pectinolytiques utilisées se divisent en deux groupes : les enzymes déestérifiantes (Pectines méthylestérases : EC 3.1.1.11), les enzymes dépolymérisantes (polygalacturonases : EC 3.2.1.15 et les pectines lyases : EC 4.2.2.10). Cette classification est fonction du pH optimum d'hydrolyse, de l'activité catalytique, de la spécificité du substrat, des besoins en métaux et du mécanisme réactionnel (Favela-Torres *et al.*, 2006). La différence la plus évidente entre ces enzymes est la présence ou l'absence de groupements méthyles (Mehri-Kamoun, 2001). Les pectinases catalysent l'hydrolyse de liaisons glycosidiques à l'intérieur des polymères de pectine. Différentes pectinases ont différentes préférences pour les formes méthylées et non-méthylées de la pectine (Gagnon, 2009). Les pectinases constituent l'unique groupe des enzymes qui catalysent la dégradation des polymères pectiques présents dans la paroi cellulaire des plantes (Forgarty & Kelly, 1983).

7-1-1- Pectines méthylestérases

Les pectines méthylestérases (EC 3.1.1.11) sont des enzymes pectinolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques de pectines hautement méthyles (PHM) entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique (Figure 23) (Jayani *et al.*, 2005). Elles hydrolysent principalement les groupes esters adjacents à un groupe carboxyle libre et enlèvent ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée (Sakai *et al.*, 1993). Elles agissent par récurrence le long de la chaîne pectique selon un mécanisme mono chaîne multiple attaque (Jeantet *et al.*, 2007).

GÉNÉRALITÉS

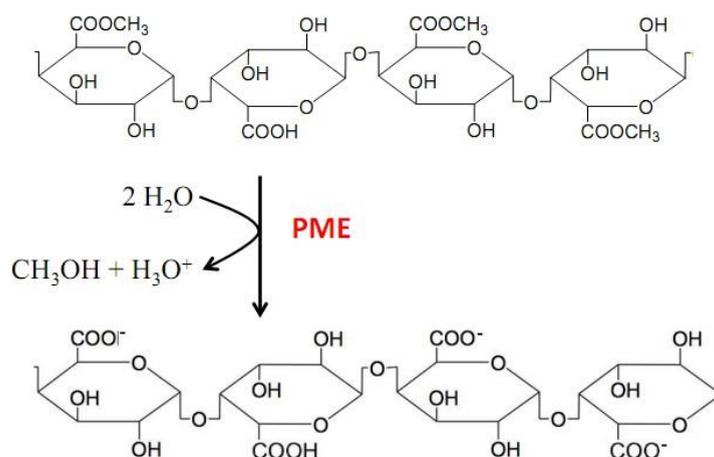


Figure 26 : Déméthylestérification des pectines par les PME (Micheli et al., 2001 ; Ridley et al., 2001)

7-1-2- Polygalacturonases

Les polygalacturonases (PG) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1-4) des acides polygalacturoniques (pectines acides). Les endo-polygalacturonases (EC 3.2.1.15) libèrent des mono, di, triacides galacturoniques par un mécanisme d'attaque « multi-chaîne », dans lequel les mono-, di-, et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Pour les pectines hautement méthylées (HM), l'hydrolyse n'a lieu qu'au niveau des résidus d'acides galacturoniques non méthylés. Pendant l'hydrolyse, la configuration anomérique change de α à β : ce qui fait que cette enzyme fonctionne par inversion (Biely *et al.*, 1996). Cependant, lorsque le degré de méthylation augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (Sakai *et al.*, 1993). Les endo-polygalacturonases hydrolysent le substrat de façon aléatoire à l'intérieur du polymère, tandis que les exo polygalacturonases font l'hydrolyse à partir de l'extrémité non réductrice du polymère libérant des acides galacturoniques (EC 3.2.1.67) ou des acides digalacturoniques (EC 3.2.1.82) (Gainvors *et al.*, 2000). La présence de groupements méthyles et de rhamnose bloque leur action (Brudieux, 2007). La figure 24 montre l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique par une endo-polygalacturonase (endo-PG), et pour chacune des hydrolyses, la longueur du polymère diminue et il y a formation d'un groupe réducteur à une des extrémités.

GÉNÉRALITÉS

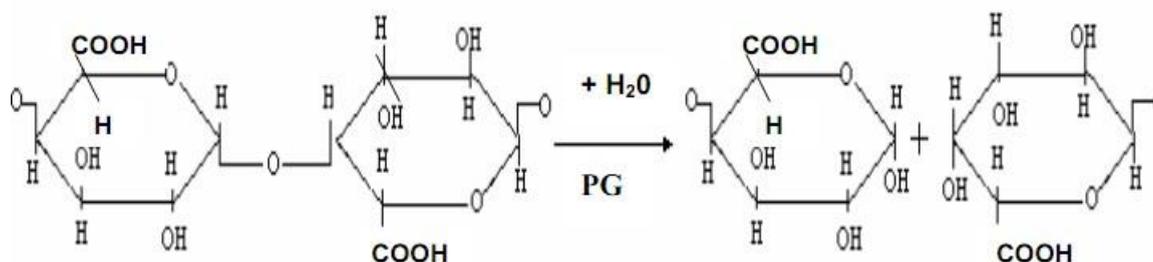


Figure 27 : Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique (Kester et al., 1996)

7-1-3-Pectines lyases

Les pectines lyases (PL) agissent sur les pectines, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique en catalysant la rupture entre deux motifs d'acide galacturonique par un mécanisme de β -élimination (Jeantet *et al.*, 2007 ; Combo *et al.*, 2011). Les PL (EC 4.2.2.10) hydrolysent les liaisons entre résidus d'acides galacturoniques méthoxylés (Figure 25). Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petites tailles. Au cours de la formation du pectate, il y a une diminution du pH entraînant la libération des ions hydroniums (H_3O^+). L'hydrolyse d'une micromole de groupe ester nécessite la libération d'une micromole de H_3O^+ (Gonzalez & Rosso, 2011). Les lyases sont les seules dépolymérase capable de dégrader les pectines hautement méthylées (HM) sans action préalable d'autres enzymes (Jayani *et al.*, 2005, Dixit *et al.*, 2013). Les pectines lyases ont pour substrat préférentiel la pectine et agissent selon deux modes : les endopectines-lyases (endo PL, E.C. 4.2.2.10) agissent par β -élimination et ont une préférence pour les pectines HM. Leur affinité pour les pectines diminue avec le degré de méthylation (DM) du substrat et sont inactives sur l'acide polygalacturonique (APG). Elles coupent la liaison soit entre deux acides galacturoniques (AG) méthoxylés, ou entre un résidu AG libre et un résidu AG méthoxylé (Lemberg *et al.*, 2000). Quant aux exopectines-lyases, elles agissent sur les pectines fortement estérifiées, elles ont été isolées d'*Aspergillus niger* (Sutherland, 1995).

GÉNÉRALITÉS

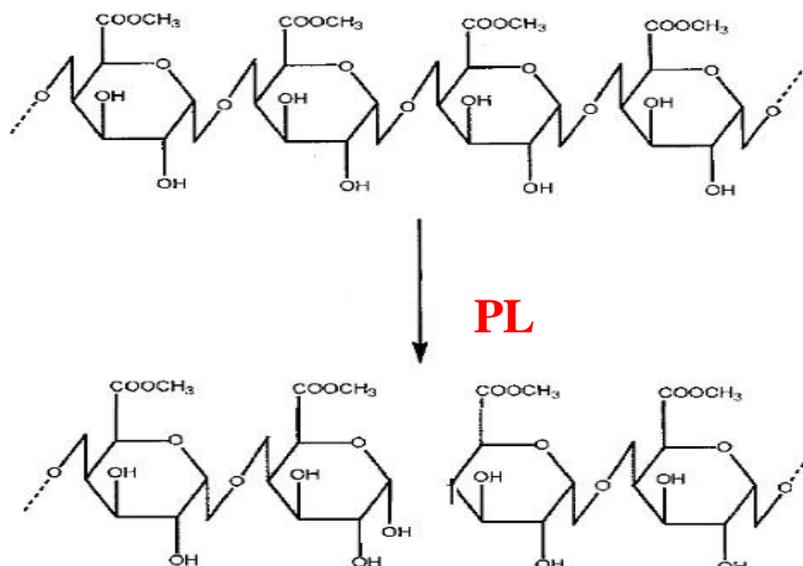


Figure 28 : Réaction catalysée par les pectines lyases (PL) (Jeantet et al., 2007)

7-2- Pectinases d'origine microbienne

Les pectines méthylestérases, les polygalacturonases et les pectines lyases sont produites et sécrétées par divers microorganismes tels que certaines bactéries, levures et champignons. Les champignons comme *Aspergillus japonicus*, *Penicillium paxilli*, *Pichia pinus*, *Aspergillus flavus*, *Stereum purpureum* et *Botrytis cinerea* produisent et sécrètent diverses pectine méthylestérase et polygalacturonase (Kars *et al.*, 2005 ; Gonzalez *et al.*, 2011 ; Combo *et al.*, 2012). La plupart des pectines lyases ont été produites par des microorganismes, tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*... (Albersheim, 1966 ; Yandav & Shastri, 2005 ; Pedrolli & Carmona, 2014). Quelques levures produisent aussi des polygalacturonases comme certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Gainvors *et al.*, 2000 ; Blanco *et al.*, 2002 ; Sieiro *et al.*, 2003 ; Radoi *et al.*, 2005) et d'autres levures comme *Kluyveromyces marxianus* (Siekstele *et al.*, 1999 ; Jia & Wheals 2000) et *Kluyveromyces fragilis* (Sakai *et al.*, 1984). La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique. *Aspergillus niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (Jayani *et al.*, 2005).

DEUXIÈME PARTIE
MATÉRIEL & MÉTHODES

MATERIEL ET METHODES

1-Matériel

1-1-Matériel végétal

Le matériel biologique de cette étude est composé de jus de mucilage de cacao (*Theobroma cacao*) provenant de cabosses de cacao (Figures 26 et 27). Les jus de mucilage de cacao ont été prélevés dans les champs de cacao de zones rurales chez cinq (05) producteurs de cacao dans différents sites . Ils ont été obtenus de diverses variétés de cacao (tout venant). Des échantillons de cinq litres (5 L) de jus de mucilage, de la grande traite (allant d'Octobre à Novembre 2020) ont été recueillis de façon stérile dans un bidon et mis dans une glacière contenant de la carboglace et acheminés au laboratoire de biotechnologie et microbiologie des aliments de l'Université Nangui Abrogoua.



Figure 29 : Cabosse de cacao



Figure 30 : Jus de mucilage de cacao

1-2- Matériel technique

Le matériel technique était constitué plusieurs appareils de laboratoire à savoir un spectrophotomètre pour la lecture des densités optiques, un pH-mètre qui a permis la mesure du pH, d'un refractomètre à main pour la détermination de l'extrait sec refractométrique, un

MATERIEL ET METHODES

thermocycleur utilisé pour l'amplification de la région de l'ADN d'intérêt, d'une chaîne de chromatographie liquide à haute performance pour doser les acides organiques, vitamines.

2- Méthodes

2-1- Méthodes d'enquêtes

2-1-1- Généralités sur les sites d'enquêtes et d'échantillonnage

Cinq (05) sites de la boucle du cacao ont été choisis pour réaliser des enquêtes sur la consommation du jus de mucilage. Il s'est agi de Akoupé (6.3879° N, 3.8808° W) et Yakassé-Attobrou (6. 1853° N, 3.6446° W) au Sud-Est ; Tiassalé (5.9043° N, 4.8261° W) au Sud, Taabo (6.2338° N, 5.1394° W) au Centre et Buyo (6.4556° N, 6.9961° W) à l'Ouest (Figure 28).

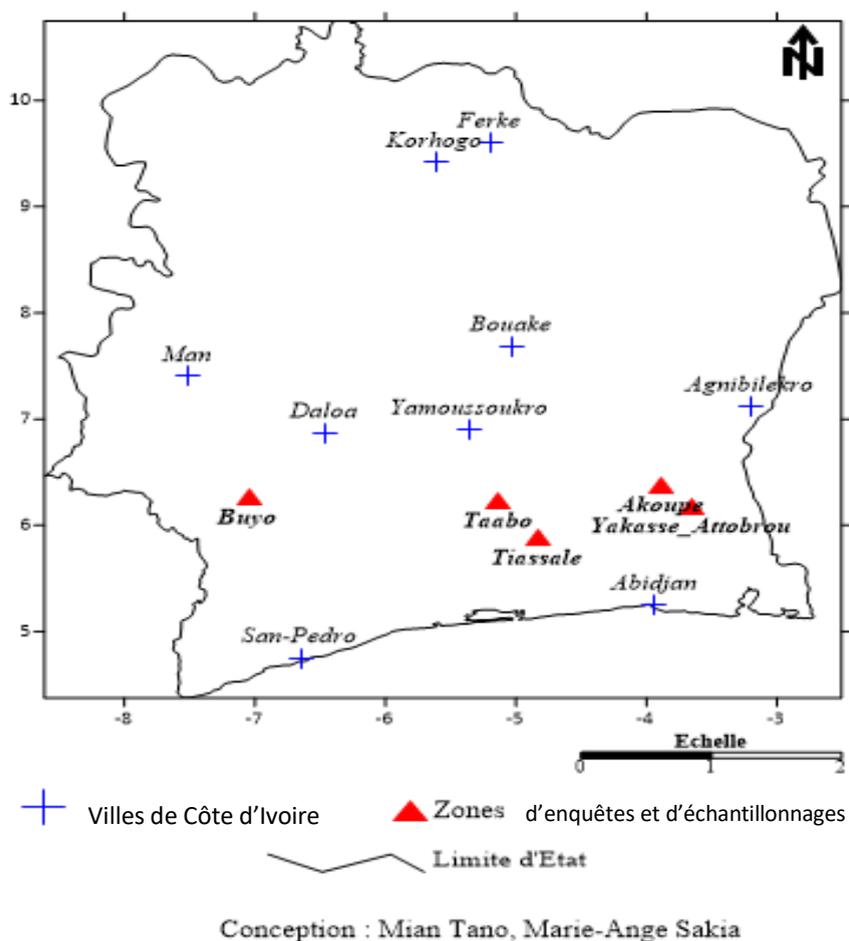


Figure 31 : Site d'échantillonnage et enquête

MATERIEL ET METHODES

2-1-2- Procédure d'enquête

Une fiche d'enquête a été élaborée (voir annexe I). Elle a permis de déterminer le niveau de connaissance (consommation, temps de conservation, éventuel effet bénéfique...) du jus mucilage de cacao, de dresser le profil socio-économique et socio démographique des répondants. L'enquête s'est déroulée de novembre 2019 à Juin 2020. Une première phase constituant une pré-enquête a permis de collecter quelques données de la littérature, d'observer les personnes interrogées, d'établir des relations avec eux et de concevoir un questionnaire portant sur la connaissance (consommation, temps de conservation, éventuel effet bénéfique...) du jus de mucilage de cacao.

2-1-3- Population d'étude et collecte des données

Pour cette étude, 500 personnes ont été interrogées à raison de 100 par localité. La taille de la population a été déterminée en utilisant la formule d'Israël, (1992) pour un échantillon indépendant non exhaustif.

$$N = t^2 \frac{[p(1-p)]}{e^2} \quad (1)$$

Avec "N" : taille de l'échantillon

"e" : marge d'erreur,

"t" : le coefficient de marge

"p" : la population de la zone d'étude. L'échantillon pour chaque zone a été obtenu par la méthode probabiliste proportionnelle à la taille de la population dans chaque localité à partir des données du recensement général de la population de la Côte d'Ivoire.

La collecte des données a été réalisée par le biais d'un questionnaire soumis aux personnes interrogées de l'ensemble des sites. Afin de permettre une meilleure compréhension du questionnaire aux personnes interrogées et de faciliter leurs réponses, une personne de la localité ayant un niveau d'étude primaire ou secondaire ou supérieure et parlant la même ethnie que les ces personnes a été sollicitée pour servir de point focal et d'interprète. Les questions étaient des questions à choix multiple avec possibilité de 2 à 6 réponses proposées ou des questions avec des réponses oui ou non et vrai ou faux.

MATERIEL ET METHODES

2-2- Echantillonnage

Au niveau de chaque site 3 passages ont été effectués à raison d'un échantillon par passage ce qui donne un total de 15 échantillons. Un premier lot d'échantillons a été conservé à la température ambiante (28 ± 2 °C) pendant 72 h. Un second lot de jus de mucilage de cacao a été laissé en fermentation spontanée pendant 120 h à la température ambiante (28 ± 2 °C) et toutes les 24 h des échantillons ont été prélevés pour les différentes analyses.

2-3- Analyses biochimiques du jus de mucilage au cours de la conservation

2-3-1-Détermination de la teneur en eau et matière sèche

La détermination de la teneur en eau a été réalisée selon la méthode AOAC (1990). Une masse de cinq grammes (5 g) de chaque échantillon de jus de mucilage de cacao (Me) a été pesée dans une capsule en verre de masse connue (M_0). La capsule contenant l'échantillon (masse totale M_1) a été placée à l'étuve (Memmert) réglée à 105 ± 2 °C pendant une durée de 24 h. Au bout de 24 h la capsule a été retirée et placée au dessiccateur pour être refroidie. L'ensemble (échantillon séché plus capsule) a été pesé (M_2) après le refroidissement au dessiccateur. L'expérience est répétée trois (3) fois et la teneur en eau (TE) exprimée en pourcentage est déterminée par la relation mathématique suivante :

$$TE (\%) = \frac{(M_1 - M_2)}{Me} * 100 \quad (2)$$

La teneur en matière sèche (TMS) est déduite de la relation mathématique suivante :

$$TMS (\%) = 100 - TE(\%) \quad (3)$$

Avec :

Me : masse (g) de l'échantillon (5g)

M_1 : masse (g) de l'ensemble (capsule + échantillon) avant étuvage

M_2 : masse (g) de l'ensemble (capsule + échantillon) après étuvage

TE : teneur en eau (%)

2-3-2-Détermination de la teneur en cendres

La détermination de la teneur en cendres a été faite selon la méthode AOAC (1990). Dans une capsule d'incinération (porcelaine) de masse connue (M_0), cinq grammes (5 g) de chaque échantillon de jus de mucilage (M_e) a été prélevé. La capsule contenant l'échantillon

MATERIEL ET METHODES

(masse totale M_1) a été placée dans un four à moufle (Nobertherm) à 550 °C pendant une durée de 24 h. Après les 24 h, la capsule contenant l'échantillon a été retirée du four et placée au dessiccateur pour être refroidie. L'ensemble (capsule + échantillon incinéré) a été pesé (M_2). L'expérience est répétée trois (3) fois et la teneur en cendre exprimée en pourcentage est obtenue par la formule mathématique suivante :

$$\text{Cendres (\%)} = \frac{(M_1 - M_0)}{M_e} * 100 \quad (4)$$

Avec

M_0 : masse (g) du creuset vide

M_e : masse (g) de l'échantillon (M_e)

M_1 : masse (g) de l'ensemble (creuset + cendres) après incinération

2-3-3-Détermination de la teneur en lipides totaux

Les lipides totaux ont été extraits selon la méthode d'extraction liquide-liquide. Trois extractions consécutives ont été réalisées. Pour la première extraction, à vingt (20 mL) de jus mucilage ont été ajoutés 20 mL d'hexane, le mélange a ensuite été vigoureusement agité et laissé à décanter. Un volume de 10 mL d'hexane a été ajouté à 20 mL du décantat de la première extraction, pour la deuxième extraction. Cette même opération a été répétée pour la troisième extraction. L'hexane a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif après l'extraction des lipides. Le ballon d'extraction, préalablement taré, a été séché dans une étuve à 105 °C pendant 20 min. A l'issue de cette opération, l'ensemble (flacon lipidique) a été pesé à la fin de cette opération. L'expérience est répétée trois (3) fois et la détermination de la teneur en lipides totaux du jus de mucilage de cacao est obtenue selon la relation mathématique suivante :

$$\text{Lipides totaux (\%)} = \frac{(M_1 - M_0)}{M_e} * 100 \quad (5)$$

Avec :

M_0 : masse (g) du ballon vide

M_e : masse (g) de l'échantillon

M_1 : masse (g) de l'ensemble (ballon + lipides) après évaporation

MATERIEL ET METHODES

2-3-4-Détermination de la teneur en protéines totales

La détermination des protéines totales a été réalisée selon la méthode AOAC (1990) utilisant le Kjeldahl. Dans un matras de Kjeldahl, un gramme (1 g) de chaque échantillon de jus de mucilage de cacao (M_e) a été ajoutée à (20 mL) d'acide sulfurique concentré (96 %) en présence d'une pincée de catalyseur de minéralisation (sélénite). La minéralisation a été faite pendant 2 h dans un matras de Kjeldahl à 400 °C. Le minéralisât obtenu a été transvasé dans une fiole de 100 mL puis complété avec de l'eau distillée. Un volume de 10 mL du mélange a été prélevé auquel a été ajouté un volume de 50 mL de NaOH (40 %). Ensuite, une distillation du mélange a été effectuée pendant 10 min, en prenant soin de piéger le distillat dans un ballon contenant 20 mL d'acide borique additionné à indicateur mixte (rouge de méthyle + vert de bromocresol). Le distillat obtenu a été titré par une solution d'acide sulfurique 0,01 N jusqu'à ce que la solution vire du vert au rose (V_1). Il a été réalisé un essai à blanc (V_0). L'expérience est répétée trois (3) fois et la teneur en protéines totales a été déterminé selon la relation mathématique suivante :

$$Protéines\ totales\ (\%) = \frac{(V_1 - V_0) * 14 * 6,25 * N}{M_e} * 100 \quad (6)$$

Avec :

V_0 : volume (mL) de solution d'acide sulfurique versé pour l'essai à blanc

V_1 : volume (mL) de solution d'acide sulfurique versé pour l'essai (échantillon)

N : normalité de la solution d'acide sulfurique : 0,01

M_e : masse (g) de l'échantillon

14 : masse atomique de l'azote

6,25 : coefficient correspondant au taux de conversion de l'azote en protéine

2-3-5- Détermination de la teneur en fibres brutes

La méthode de Weende décrite par Wolf (1968) a été utilisée pour la détermination des fibres brutes. Un volume de 50 mL d'acide sulfurique 0,25 N a été ajouté à une masse de 2 g de chaque échantillon de jus de mucilage de cacao (M_e) et homogénéisé. Le tout a été porté à ébullition pendant 30 min sous réfrigérant à reflux. Un volume de 50 mL de soude 0,31 N a été ajouté au mélange et porté à ébullition pendant 30 min sous réfrigérant à reflux. L'extrait obtenu a été filtré sur papier filtre (Whatman N° 42) puis le résidu a été lavé plusieurs fois à l'eau chaude jusqu'à l'élimination complète des alcalis. Le résidu contenu dans le papier filtre a été

MATERIEL ET METHODES

séché à l'étuve à 105 °C pendant 8 h, et refroidi au dessiccateur puis pesé (M_1). Après la pesée, le résidu a été incinéré au four à moufle à 550 °C pendant 3 h puis refroidi au dessiccateur et pesé à nouveau (M_2). L'expérience est répétée trois (3) fois et la teneur en fibres brutes est déterminée par la relation mathématique suivante :

$$\text{Fibres brutes (\%)} = \frac{(M_1 - M_2)}{M_e} * 100 \quad (7)$$

Avec :

M_1 : masse (g) du résidu séché

M_2 : masse (g) des cendres obtenues

M_e : masse (g) de l'échantillon

2-3-6-Détermination de la teneur glucides totaux et valeur énergétique des jus de mucilage

Les glucides totaux (GT) et la valeur énergétique (VE) ont été déterminés par différence suivant la méthode de calcul préconisée par la FAO (2002). Cette méthode prend en compte d'une part les teneurs en humidité, en matière grasse, en protéines, en cendre, et d'autre part les coefficients énergétiques relatifs aux condiments fermentés.

$$GT (\%MS) = 100 - [PT(\%MS) + LT(\%MS) + C(\%MS) + H(\%)] \quad (8)$$

$$VE (kcal/100gMS) = 22,4 * PT(\%MS) + 8,37 * LT(\%MS) + 3,57 * GT(\%MS) \quad (9)$$

Avec :

PT : Pourcentage en protéines totales

LT : Pourcentage en lipides totaux

C : Pourcentage en cendres

GT : Pourcentage en glucides totaux

H : Humidité

VE : Valeur énergétique en kcal/ 100 g de matière sèche

2-3-7-Dosage des acides organiques et des vitamines

2-3-7-1-Dosage des acides organiques

Le dosage des acides organiques a été réalisé selon les instructions du fabricant de l'appareil. Les échantillons ont été d'abord centrifugés (3000 rpm pendant 10 min) et les

MATERIEL ET METHODES

surnageants filtrés sur filtre millipore 0,45 µm (Sartorius AG, Goettingen, Allemagne). Les acides organiques (acide lactique, acide tartrique, acide citrique, acide fumarique, acide tannique acide acétique) ont été séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) (Shimadzu Corporation, Japon). Il est équipé d'une pompe (Shimadzu LC-6A Liquid Chromatograph), d'un détecteur UV (Shimadzu SPD6A UV Spectrophotometric detector) et d'un intégrateur (Shimadzu C-R 6A Chromatopac). La séparation chromatographique a été réalisée avec une colonne d'exclusion ionique ORH-801 (300 mm x 6.5 mm, Interchrom, France) maintenue à 35°C à l'aide d'un four MetaTherm™ (Interchrom, France). L'éluant est de l'acide sulfurique 0,004 N à une vitesse d'élution de 0,8 mL.min⁻¹ et le détecteur a été fixé à la longueur d'onde de 210 nm. Un volume de 20 µL de chaque échantillon centrifugé et filtré a été injecté pour l'analyse HPLC. Les analyses ont été effectuées en double. Les étalons d'acides organiques ont été préparés dans de l'eau distillée à des concentrations de 0,005 à 0,4 g/L. Les standards ont été filtrés et injectés séparément. Les différents composés ont été identifiés et quantifiés en comparant les temps de rétention et les aires des pics des étalons à ceux obtenus dans les échantillons.

2-3-7-2-Dosage des vitamines

Les échantillons ont été d'abord centrifugés (3000 rpm pendant 10 min) et les surnageants ont été ensuite filtrés sur filtre millipore 0,45 µm (Sartorius AG, Goettingen, Allemagne). Les vitamines (acide ascorbique : vitamine C, acide folique : B9, cyanocobalamine : B12) ont été séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) (Shimadzu Corporation, Japon). Le chromatographe en phase liquide à haute performance est équipé d'une pompe (Shimadzu LC-6A Liquid Chromatograph), d'un détecteur UV (Shimadzu SPD6A UV Spectrophotometric detector) et d'un intégrateur (Shimadzu C-R 6A Chromatopac). La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide une colonne Nucleodur HTEC C18 de 5 µm (250/4,6 mm ID) (Macherey-Nagel, Allemagne).

La phase mobile est un mélange de deux phases A et B utilisées en mode gradient.

-La phase A était composée d'un mélange d'eau acidifiée avec 0,2 % d'acide métaphosphorique (m/v) et d'acetonitrile (98/2 v/v), ajusté à pH = 3,5 avec une solution de NaOH 10 N.

- La phase B était constituée de 100 % d'acetonitrile.

Les solutions ont été filtrées et dégazées sous vide dans un bain à ultrasons avant d'être utilisées. Les vitamines ont été analysées par une méthode d'élution à gradient à un débit de 0.75 mL/min comme suit : 0-7 min : 100 % A ; 7-20 min : 100 % A à 87 % ; 20-23 min : 87 % A à 100 % ; 23 min à 100 % . A à 100 % ; 23 min jusqu'à la fin du cycle : 100 % A.

MATERIEL ET METHODES

Le volume d'injection était de 20 µL. Chaque vitamine a été quantifiée à une longueur d'onde spécifique : 245 nm (C), 280 nm (B9) et 360 nm (B12). Les étalons (0,5, 2,5, 15 et 30 mg/L) ont été préparés par dilution de chaque solution mère dans de l'eau désionisée. Les standards ont été filtrés et injectés séparément. Les différents composés ont été identifiés et quantifiés en comparant les temps de rétention et les aires des pics des étalons à ceux obtenus dans les échantillons.

2-3-8-Dosage des polyphénols totaux

Le contenu phénolique total des jus de mucilage de cacao a été estimé par une méthode spectrophotométrique avec le réactif de « Folin-Ciocalteu ». Le dosage des polyphénols totaux par ce réactif a été décrit par Singleton *et al.* (1999).

Cinquante (50 µL) d'échantillon de jus de mucilage a été mélangé avec 250 µL de réactif de Folin- Ciocalteu non dilué. Après 5 min d'incubation à la température ambiante, 750 µL de carbonate de sodium (Na₂CO₃) (20% (P/V)) est ajouté au mélange réactionnel. Après 2 heures d'incubation, l'absorbance est mesurée à 760 nm avec un spectrophotomètre UV. Visible type Analytics. Les mesures ont été réalisées en triple. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-250 µg/mL). Elle est exprimée en microgramme (µg) d'équivalent d'acide gallique par millilitre d'échantillon de jus de mucilage.

2-3-9- Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des jus de mucilage de cacao a été déterminée selon la méthode colorimétrique décrite par Meda *et al.*, (2005) en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Un volume de 0,5 mL d'aliquote a été mélangé avec les mêmes volumes d'eau distillée, de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) 10% (p/v) (Labosi, Paris, France), d'acétate de sodium (1 M) et 2 mL d'eau distillée. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 415 nm a été évaluée (spectrophotomètre UV Analytic ; USA). La teneur en flavonoïdes totaux a été estimée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine de 0-300 µg/mL (Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim, Allemagne). Elle a été ensuite exprimée en µg d'équivalents quercétine (QE)/mL.

2-3-10- Tanins totaux

La détermination de la teneur en tanins facilement extractibles a été effectuée à l'aide de la réaction de Bate-Smith, dans laquelle les proanthocyanidines incolores sont transformées en

MATERIEL ET METHODES

anthocyanes colorés par chauffage à 100 °C en milieu acide et leur teneur est mesurée en fonction de leur absorbance à 550 nm (Ribereau-Gayon & Stonestreet, 1966).

Dans deux tubes à essai, il a été ajouté consécutivement 2 mL d'échantillon de jus de mucilage de cacao, 1 mL d'eau distillée et 3 mL d'acide chlorhydrique 12 N. Un premier tube à essai contenant le précédent mélange a été laissé à la température ambiante tandis que l'autre a été hermétiquement fermé et placé dans un bain-marie à 100 °C pendant 30 min, puis refroidis pendant 10 min dans de la glace. Un volume de 0,5 mL d'éthanol a été ajouté à chacun des tubes à essai et leurs densités optiques ont été mesurées. La teneur en tanins proportionnelle à la teneur en anthocyanes, a été calculée en g/L selon la relation mathématique suivante :

$$\boxed{\text{Tanins totaux (g/L)} = 19,33 * \Delta DO} \quad (10)$$

2-3-4-Dosage des activités antioxydantes

2-3-4-1- Activité antiradicalaire : DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)

La méthode de DPPH° a d'abord été décrite par Blois en 1958, et a ensuite été largement modifiée par de nombreux chercheurs (Pereira Nunes *et al.*, 2012). Le DPPH° (1,1-diphényl - 2- picrylhydrazyle) (C₁₈H₁₂N₅O₆ ; M= 394,33g/mole) est un radical libre stable, de couleur violette (Figure 5) qui réagit avec des composés qui peuvent donner un atome d'hydrogène. Cette activité a été testée selon la méthode décrite par Brand *et al.* (1995). Le mélange de 2 mL d'une solution méthanolique de DDPH à 0,14 mg/mL avec 2 mL de chaque échantillon de jus de mucilage de cacao est réalisé. Le mélange est ensuite agité vigoureusement pendant quelques secondes et laissé à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance était mesurée à 517 nm contre le blanc correspondant.

$$\boxed{AA(\%) = (Abs\ DPPH - Abs\ finale) / Abs\ DPPH \times 100} \quad (11)$$

Avec :

Abs DPPH : Absorbance de départ de la solution 0,14 mg/mL du DPPH.

Abs finale : La valeur stable de l'absorbance après l'ajout de l'échantillon

2-3-4-2-Pouvoir réducteur-antioxydant du fer : FRAP (ferricyanure de potassium-chlorure ferrique)

La capacité de réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) des échantillons de jus de mucilage de cacao a été étudiée en utilisant la méthode du ferricyanure de potassium-chlorure ferrique (Liuk *et al.*, 2009). Un volume de 0,5 mL de chaque échantillon, 0,5 mL de tampon phosphate (0,2

MATERIEL ET METHODES

M, pH 6,6) et 0,5 ml de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1 %) ont été mélangés et incubés à 50 °C pendant 20 min. La réaction a été arrêtée en ajoutant 0,5 mL d'acide trichloracétique (10 % (p/v)). Un volume de 0,5 mL du mélange réactionnel précédent a été mélangé avec 0,8 mL d'eau distillée et 0,1 mL de $FeCl_3$ (0,1 %) et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. Le pouvoir réducteur de chaque échantillon a été exprimé en μg d'équivalents d'acide ascorbique (AAE) par mL.

2-4- Analyses physico-chimiques et microbiologiques du jus de mucilage au cours de la fermentation

2-4-1-Mesure du pH

Le pH a été mesuré directement à l'aide d'un pH-mètre (PHS 550. pH/mV meter) dans 10 mL d'échantillon selon la méthode AOAC, (1990). La mesure est répétée trois fois.

2-4-2- Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable a été obtenue par dosage de 5 mL de l'échantillon avec une solution de NaOH 0,1 N après ajout au préalable de 2 à 3 gouttes de phénolphaléine à 1 % (AOAC, 1990). La fin du dosage est marquée par une coloration rose pâle persistante. Les résultats obtenus constituent la moyenne de trois essais. Le taux d'acidité titrable exprimé en pourcentage (%) d'acide lactique est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ acidité titrable} = \frac{\text{Vol NaOH} * \text{N NaOH} * 0,09 * 100}{PE} \quad (12)$$

Avec :

Vol NAOH = volume de la solution d'hydroxyde de sodium

NNaOH = Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium

PE = Prise d'essai

0,09 = milliéquivalent gramme d'acide lactique

2-4-3- Mesure de l'extrait sec réfractométrique

L'extrait sec réfractométrique (ESR) ou l'indice réfractométrique est déterminé selon la méthode décrite par Audigié *et al.*, (1980) à l'aide d'un réfractomètre à main (ATAGO, N-20E, Japon). Il représente la matière sèche soluble présente dans le jus de mucilage et est corrélé à la teneur en sucres. Les concentrations sont exprimées en °Brix. Le réfractomètre est constitué

MATERIEL ET METHODES

d'un prisme mobile, d'un prisme fixe et d'un oculaire. Pour l'analyse, quelques gouttes de l'échantillon sont placées sur le prisme fixe après ouverture de l'appareil. Le prisme mobile (volet) est rabattu. L'oculaire est porté à l'œil et dirigé vers une source de lumière. Une échelle graduée et une surface divisée en deux champs, l'un clair et l'autre sombre sont observées dans la lunette. L'oculaire est tourné pour le régler à la vue de l'opérateur de façon que l'échelle soit parfaitement nette. A ce moment, la ligne de séparation des deux champs est également nette. La teneur en matière sèche soluble de l'échantillon est lue au point où la ligne de séparation des deux champs divise l'échelle. Le chiffre lu correspond à l'extrait sec réfractométrique de l'échantillon examiné.

2-4-4-Dosage de l'éthanol

Les échantillons ont été d'abord centrifugés (13000 rpm pendant 3 min) et les surnageants filtrés sur filtre millipore 0,45 μm (Sartorius AG, Goettingen, Allemagne). L'éthanol a été dosé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Agilent Technologies, 1200 series, UK). L'appareil est équipé d'un détecteur UV barrette de diodes (Agilent Technologies, 1200 series) et d'une colonne Aminex HPX 87H (300 mm x 7,8 mm, Biorad, France) couplée à un réfractomètre (Agilent Technologies, 1200 series). La température du four a été fixée à 50 °C. L'éluant a été de l'acide sulfurique 5 mM à une vitesse d'élution de 0,5 mL/min et le détecteur UV a été fixé à la longueur d'onde de 210 nm. Un volume de 20 μL des échantillons a été injecté et l'analyse a duré 35 min. Les solutions étalons ont été préparées à des concentrations allant de 1 à 10 % (v/v) respectivement et injectées séparément. La détermination quantitative de l'éthanol a été effectuée par la méthode de standard externe tandis que la détermination qualitative a été basée sur le temps de rétention.

2-4-5- Détermination de la charge levurienne au cours de la fermentation

Le milieu de culture est le milieu YPDA (10 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de bactopeptone, 10 g/L de D-glucose, 10 g/L d'agar) préalablement préparée et coulée dans des boîtes de Pétri. Les échantillons ont subi des dilutions décimales de façon aseptique jusqu'à la dilution 10^{-14} dans de l'eau peptonée tamponnée stérilisée. Les échantillons dilués ont été alorsensemencés en double par étalement de 0,1 mL de l'inoculum sur la gélose sur les milieux YPDA (10 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de bactopeptone, 10 g/L de D-glucose, 10 g/L d'agar) coulée dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 30°C. Après 72 h d'incubation, les colonies de levures sont dénombrées en prenant en compte seulement les boîtes où le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 (Norme NF ISO 6611, 1996). Les colonies ont un diamètre de 0,5 à 2 mm, des bords réguliers. Elles sont bombées, lisses, laiteuses

MATERIEL ET METHODES

avec une odeur de pain. Le nombre de levures dans 1 mL de la culture mère est déterminé par la formule mathématique suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{d * (n1 + 0,1n2) * V} \quad (13)$$

N: Nombre de levures dans l'échantillon (UFC/mL)

ΣC : Somme de colonies des boîtes de Pétri retenues

n1: Nombre de boîte de Pétri à la première dilution considérée

n2: Nombre de boîte Pétri à la deuxième dilution considérée

V : Volume de la dilution prélevée pour l'étalement (mL)

d : Facteur de dilution correspondant

2-5-Isolement des levures

Toutes les 24 h et ce pour chaque jus de mucilage de cacao, 20 colonies issues du dénombrement ont été isolées pour le screening des isolats de levures productrices de pectinase sur la gélose YPDA soit un total de 100 colonies. Parallèlement, l'isolement des levures des jus de mucilage de cacao dont les concentrations en éthanol en fin de fermentation ont été comprises entre 7 et 10% (v/v) a également été réalisé sur la gélose YPDA comme résistant à l'éthanol. Ce sont 08 colonies qui ont été sélectionnées pour chaque jus de mucilage de cacao dont les concentrations étaient comprises entre 7 et 10 % (v/v) d'éthanol. Ces isolats ont été choisies sur la base de leurs caractéristiques macroscopiques (taille, forme, couleur).

2-5-1-Screening des isolats de levures producteurs de pectinase

La sélection des isolats de levures productrices de pectinases a été réalisée selon la méthode de Jaafar *et al.* (2006). Les souches de levures préalablement isolées sur le milieu YPDA ont été repiquées sur le milieu pectine. La gélose pectine contenant l'acide polygalacturonique comme seule source de carbone a permis la mise en évidence de l'activité pectinolytique des isolats de levures. Les isolats ont été inoculés par touche centrale. Après 24 h d'incubation à 30 °C, la boîte a été inondée par une solution aqueuse d'acétate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) à 7,5% pendant 15 à 30 min et la présence d'un halo blanc indique la présence d'une activité pectinolytique. Les isolats ayant les diamètres d'halo les plus élevés (≥ 10 mm) ont été retenus et codifiés pour la suite de l'étude.

MATERIEL ET METHODES

2-5-2-Optimisation de la production d'enzyme pectinase à partir d'isolats sélectionnés

Les isolats sélectionnés ont été soumis à différentes conditions (temps d'incubation, pH et température) de culture afin de déterminer les conditions optimales de production de pectinase.

2-5-2-1-Effet du temps d'incubation

Les isolats sélectionnés ont été utilisés pour produire l'enzyme pectinase. Les extraits bruts enzymatiques ont été préparés selon la méthode décrite par Kumar & Sharma (2012) dans le bouillon pectine. Le bouillon pectine était composé (g/L) de 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,5 g KH_2PO_4 , 1 g d'extrait de levure, 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, et 10 g d'acide polygalacturonique. Tous ces ingrédients ont été dissous dans de l'eau distillée et le pH du milieu ajusté à 5. Les milieux ont été stérilisés en autoclave à 121 °C sous une pression de 1 atmosphère pendant 17 min. Des ballons de capacité de 250 mL renfermant 100 mL de milieu liquide chacun sont inoculés séparément à une densité optique de 0,3 par chaque isolat sélectionné préalablement cultivé dans le bouillon pectine. Les cultures ont été incubées à 30 °C sous agitation rotative ($105 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$; 1 tour = 2π rad) durant 24 heures. Des prélèvements ont été effectués toutes les 4 heures pendant 24 h et centrifugés à 4 °C pendant 10 mn à vitesse de 9000 rpm et les surnageants ont constitué les extraits bruts enzymatiques pour la détermination de l'activité pectinolytique.

2-5-2-2- Effet du pH

L'influence du pH du milieu de culture sur la production de pectinase a été réalisée en faisant varier le pH des milieux de culture de 5 à 8. Pour cela, les valeurs de pH des milieux ont été ajustées à 5 ; 5,5 ; 6 ; 7 et 8 et inoculés séparément par chaque isolat à 0,3 DO. Ils ont été ensuite incubés dans un incubateur agitateur (Shaking incubator, Biobase) à 30 °C pendant 24 heures. A la fin du temps d'incubation les milieux ont été centrifugés à 9000 rpm à 4 °C pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (TGL 16 M). Les surnageants obtenus ont constitué les extraits bruts enzymatiques pour la détermination de l'activité pectinolytique.

2-5-2-3-Effet de la température d'incubation

L'effet de la température d'incubation a été mis en évidence en incubant les milieux inoculés séparément par chaque isolat à 0,3 DO pendant 24 heures dans un incubateur agitateur (Shaking incubateur, Biobase) à 30 °C (Behera *et al.*, 2017). Les milieux ont été ensuite centrifugés à 9000 rpm à 4 °C pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (TGL 16 M).

MATERIEL ET METHODES

Les surnageants obtenus ont constitué les extraits bruts enzymatiques pour la détermination de l'activité pectinolytique.

2-5-3-Dosage de l'activité pectinolytique

Le dosage de l'activité pectinolytique a été réalisé selon la méthode de Miller (1959). Un volume de 100 µL de l'extrait enzymatique partiellement purifié a été ajouté à 100 µL de substrat (tampon acétate de sodium 0,05M ; pH 5). Le mélange a été incubé au bain marie à 40 °C pendant 30 min. Au terme du temps d'incubation 400 µL de DNS sont ajoutés au mélange. L'ensemble est ainsi incubé à nouveau à 100°C pendant 15 min, puis 4,4 mL d'eau distillée sont ajoutés. L'activité enzymatique est la quantité d'enzyme dans 1 mL qui libèrerait des sucres réducteurs, équivalent à 1 mg d'acide galacturonique. La teneur en acide galacturonique est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage. L'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

2-6-Identification moléculaire des isolats de levures producteurs de pectinase et résistants à l'éthanol

2-6-1- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de la région ITS-5.8S rDNA

La PCR a été réalisée selon la méthode décrite par Jeyaram *et al.* (2008) sur colonies avec quelques modifications. Des colonies fraîches de levure (moins de 5 jours d'âge) cultivée sur la gélose YDPA sont diluées dans 100 mL d'eau pour biologie moléculaire en respectant les conditions de stérilité.

Le mélange réactionnel pour l'amplification de la région 5.8S ADN_r-ITS est présenté dans le tableau IV. Les amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA-3') utilisées dans cette étude ont été décrites par White *et al.* (1990).

Les réactions d'amplification de la région 5.8S rDNA-ITS ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Techne Prime, UK) selon le programme décrit par van Aa Kühle *et al.* (2001) avec quelques modifications : la première étape est une dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 min suivie d'une deuxième étape correspondant à 30 cycles (dénaturation à 94 °C pendant 2 min ; hybridation à 55,8 °C pendant 1 min ; élongation à 72 °C pendant 2 min) et d'une troisième et dernière étape qui est une élongation finale à 72 °C pendant 7 min. Cette dernière étape marque la fin de la réaction d'amplification. La taille des amplicons est analysée sur un gel d'agarose 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (BET). Les amplicons sont conservés à – 20°C pour d'autres utilisations.

MATERIEL ET METHODES

Tableau IV : Composition du mélange réactionnel (volume final : 50 μ L)

Composant	Volume (μ L)	Concentration
Tampon Taq (5X Green Go Taq Flexi Buffer) (Promega Madison, WI, USA)	10	5X
MgCl ₂ (Promega Madison, WI, USA)	8	[1-4] mM
dNTP mix (Promega Madison, WI, USA)	1	0,2 mM chaque dNTP
ITS 1 (Integrated DNA Technologies)	0,25	[0,1-1] μ M
ITS 4 (Integrated DNA Technologies)	0,25	[0,1-1] μ M
DNA polymerase (Promega Madison, WI, USA)	0,25	5u/ μ L
Colonie levurienne	5	
Eau pour biologie moléculaire (Ambion the RNA company)	30,25	

2-6-2-Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation et la détermination de la taille des fragments d'ADN amplifiés par PCR.

Le gel a été préparé à 1,5 % dans du tampon TBE 0,5X [45 mM Tris-Base (Sigma), 45 mM acide borique (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma)]. La suspension est chauffée jusqu'à ébullition et à l'obtention d'une solution limpide. Le gel liquide est refroidi et deux gouttes de bromure d'éthidium (BET) y sont ajoutées avant d'être coulé dans un support de gel.

Une fois solidifié, le gel a été immergé dans une cuve à électrophorèse contenant du TBE 0,5X. Des aliquotes de 10 μ L des fragments amplifiés sont additionnés de 2 μ L de tampon de charge (50 % TE pH 8, 50% glycérol, bleu de bromophénol) avant d'être déposés dans les puits du gel. Le gel a été visualisé (Clearver Scientific Ltd, - Clear view UV Transilluminator USA) sous illumination UV après une migration à 80 V pendant 45 min pour l'ADN amplifié. La taille des fragments d'ADN est déterminée directement à partir du logiciel Vision Pact en utilisant le marqueur de taille moléculaire 200 pb DNA Ladder (Promega) comme référence.

2-6-3-Séquençage des fragments amplifiés

Sur la base des résultats de l'identification des levures par la PCR-RFLP, 30 souches de levures ont été sélectionnées pour l'analyse du domaine D1/D2 de l'extrémité 5' de l'ADN codant la sous unité ribosomique 26S dont 24 souches résistantes à l'éthanol et 6 souches productrices de pectinase. La méthode utilisée repose sur l'amplification par PCR de la région

MATERIEL ET METHODES

suscitée telle que décrite par Kurtzman et Robnett (1998). La réaction d'amplification est réalisée sur des colonies fraîches (moins de 5 jours d'âge) à l'aide des amorces NL-1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') et NL-4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Les conditions de la PCR sont les suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min ; 36 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min, d'hybridation à 52°C pendant 2 min et d'élongation à 72°C pendant 2 min ; une extension finale à 72°C pendant 7 min. Les amplifiats obtenus sont envoyés à la société Génome Express (France) pour le séquençage. Les amorces NL-1 et NL-4 ont servi pour le séquençage. Les séquences sont ensuite assemblées grâce aux logiciels consed et phredPhrap. Les séquences obtenues sont alors comparées aux séquences disponibles dans la base de données GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3-Purification partielle de l'enzyme

La purification partielle de la pectinase a été conduite à travers une chromatographie Echangeuse d'ions sur gel DEAE-sepharose 6 fast flow.

3-1-Chromatographie d'échange d'anions sur le gel DEAE-sepharose Fast Flow

Le gel diéthylaminoéthyl (DEAE) Sepharose CL-6B (PHARMACIA Biotech.) est coulé dans une colonne (2,6 x 6,0 cm) et équilibré avec du tampon phosphate de potassium 100 mM (pH 7,0) pour la recherche de l' α -glucosidase (Dejob, 2013). Le débit est fixé à 1 mL/min et des fractions de 3 mL sont recueillies à l'aide d'un collecteur (GILSON TDC 80) relié à une pompe péristaltique (GILSON) qui est connectée à la colonne. Quinze (15) mL d'extrait brut sont déposés sur le gel DEAE-Sepharose CL-6B qui a été équilibré avec le tampon phosphate de potassium 100 mM (pH 7,0). Le gel est ensuite lavé avec 60 mL du même tampon pour éluer les protéines non fixées. Les protéines retenues par le gel sont éluées par une augmentation progressive de la force ionique à pH constant, par l'application d'un gradient en escalier croissant de 0 ; 0,3 ; 0,5, 0,7 ; 1 et 2 M de chlorure de sodium dans 60 mL de tampon acétate de sodium 20 mM (pH 5,0). Les fractions d'intérêt c'est-à-dire celles contenant l'activité pectinolytique ont été collectées.

3-2-Détermination des paramètres cinétiques

L'oxydation des substrats par l'enzyme purifiée a été déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde (540 nm) spécifique du substrat. Le test a été réalisé en mesurant l'augmentation à l'absorbance (A_{540 nm}) pour l'acide polygalacturonique dans un tampon acétate de sodium 50 mM (pH 5).

MATERIEL ET METHODES

La vitesse de réaction a été déterminée sur le substrat (acide polygalacturonique) dans un intervalle de concentrations compris entre 2 et 10 mg/mL. Les constantes cinétiques, K_m et V_m , de l'enzyme ont été déterminées à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver & Burk (1934).

4-Applications biotechnologiques des espèces identifiées productrices de pectinase et résistantes à l'éthanol

4-1-Essais de clarification enzymatique du jus d'orange (*Citrus sinensis*) et du jus d'ananas (*Ananas comosus*) et d'extraction de composés phénoliques par l'extrait enzymatique partiellement purifié des espèces de *Yarrowia lipolytica*

Les jus d'orange ont été pressés à l'aide d'un presseur mécanique en notre présence afin de s'assurer qu'ils ne subissent aucun autre traitement ou ajout. Cinq cent millilitres (500 mL) de jus, acheté dans la commune de Yopougon ont été placés dans une glacière contenant de la glace et acheminés au laboratoire. Les jus de fruits (orange et ananas) ont été transvasés dans des bouteilles et incubés au bain-marie à 85 °C pendant 15 mn. Après refroidissement, à 100 mL de chaque jus ont été additionnés à 200 µL d'extrait enzymatique partiellement purifié des espèces *Yarrowia lipolytica*. L'ensemble a été incubé au bain-marie à 40 °C pendant 2 h. A la fin du traitement, chaque milieu réactionnel est chauffé à 90 °C pendant 5 minutes pour inactiver les pectinases.

4-1-1-Analyses physico-chimiques des jus clarifiés

Le dosage des paramètres physico-chimiques des jus d'orange clarifiés à savoir le pH, l'acidité titrable et l'extrait sec refractométrique a été effectué comme définit aux sections 2-4-1 ; 2-4-2 ; 2-4-3.

2-4-1-Mesure du pH

Le pH a été mesuré directement à l'aide d'un pH-mètre (PHS 550. pH/mV meter) dans 10 mL d'échantillon selon la méthode AOAC, (1990). La mesure est répétée trois fois.

2-4-2- Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable a été obtenue par dosage de 5 mL de l'échantillon avec une solution de NaOH 0,1 N après ajout au préalable de 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine à 1 % (AOAC, 1990). La fin du dosage est marquée par une coloration rose pâle persistante. Les résultats obtenus

MATERIEL ET METHODES

constituent la moyenne de trois essais. Le taux d'acidité titrable exprimé en pourcentage (%) d'acide lactique est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ acidité titrable} = \frac{\text{Vol NaOH} * \text{NNaOH} * 0,09 * 100}{PE} \quad (12)$$

Avec :

Vol NAOH = volume de la solution d'hydroxyde de sodium

NNaOH = Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium

PE = Prise d'essai

0,09 = milliéquivalent gramme d'acide lactique

2-4-3- Mesure de l'extrait sec réfractométrique

L'extrait sec réfractométrique (ESR) ou l'indice réfractométrique est déterminé selon la méthode décrite par Audigié *et al.*, (1980) à l'aide d'un réfractomètre à main (ATAGO, N-20E, Japon). Il représente la matière sèche soluble présente dans le jus de mucilage et est corrélé à la teneur en sucres. Les concentrations sont exprimées en °Brix. Le réfractomètre est constitué d'un prisme mobile, d'un prisme fixe et d'un oculaire. Pour l'analyse, quelques gouttes de l'échantillon sont placées sur le prisme fixe après ouverture de l'appareil. Le prisme mobile (volet) est rabattu. L'oculaire est porté à l'œil et dirigé vers une source de lumière. Une échelle graduée et une surface divisée en deux champs, l'un clair et l'autre sombre sont observées dans la lunette. L'oculaire est tourné pour le régler à la vue de l'opérateur de façon que l'échelle soit parfaitement nette. A ce moment, la ligne de séparation des deux champs est également nette. La teneur en matière sèche soluble de l'échantillon est lue au point où la ligne de séparation des deux champs divise l'échelle. Le chiffre lu correspond à l'extrait sec réfractométrique de l'échantillon examiné.

4-1-2- Détermination de la clarté, la couleur et l'indice de brunissement

La clarté, la couleur et l'indice de brunissement ont été déterminés au spectrophotomètre (Thermo Fischer Scientific) aux longueurs d'ondes respectives de 660 nm, 440 nm et de 420 nm, avec l'utilisation de l'eau distillée comme contrôle (Chan & Cavaletto, 1986 ; Rai *et al.*, 2006 ; Dedehou *et al.*, 2015 ; Sharna *et al.*, 2015 ; Meryandini *et al.*, 2017). Trois mesures ont été faites pour chaque échantillon de jus traité et le jus non traité.

MATERIEL ET METHODES

4-1-3- Dosage des composés phénoliques

L'étude de l'extraction des composés phénoliques par l'extrait enzymatique partiellement purifié de pectinase. Les composés phénoliques à savoir les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux ont été dosés comme précédemment décrit aux sections 2-3-8 et 2-3-9.

2-3-8-Dosage des polyphénols totaux

Le contenu phénolique total des jus de mucilage de cacao a été estimé par une méthode spectrophotométrique avec le réactif de « Folin-Ciocalteu ». Le dosage des polyphénols totaux par ce réactif a été décrit par Singleton *et al.* (1999).

Cinquante (50 μ L) d'échantillon de jus de mucilage a été mélangé avec 250 μ L de réactif de Folin- Ciocalteu non dilué. Après 5 min d'incubation à la température ambiante, 750 μ L de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (20% (P/V)) est ajouté au mélange réactionnel. Après 2 heures d'incubation, l'absorbance est mesurée à 760 nm avec un spectrophotomètre UV. Visible type Analytics. Les mesures ont été réalisées en triple. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-250 μ g/mL). Elle est exprimée en microgramme (μ g) d'équivalent d'acide gallique par millilitre d'échantillon de jus de mucilage.

2-3-9- Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des jus de mucilage de cacao a été déterminée selon la méthode colorimétrique décrite par Meda *et al.*, (2005) en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Un volume de 0,5 mL d'aliquote a été mélangé avec les mêmes volumes d'eau distillée, de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) 10% (p/v) (Labosi, Paris, France), d'acétate de sodium (1 M) et 2 mL d'eau distillée. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 415 nm a été évaluée (spectrophotomètre UV Analytic ; USA). La teneur en flavonoïdes totaux a été estimée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine de 0-300 μ g/mL (Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim, Allemagne). Elle a été ensuite exprimée en μ g d'équivalents quercétine (QE)/mL.

4-1-4-Détermination de la viscosité

La viscosité a été mesurée par un viscosimètre (Thermo Scientific) (Figure 29). Le temps nécessaire pour traverser la section capillaire du viscosimètre a été noté à l'aide d'un chronomètre pour la référence. Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

MATERIEL ET METHODES

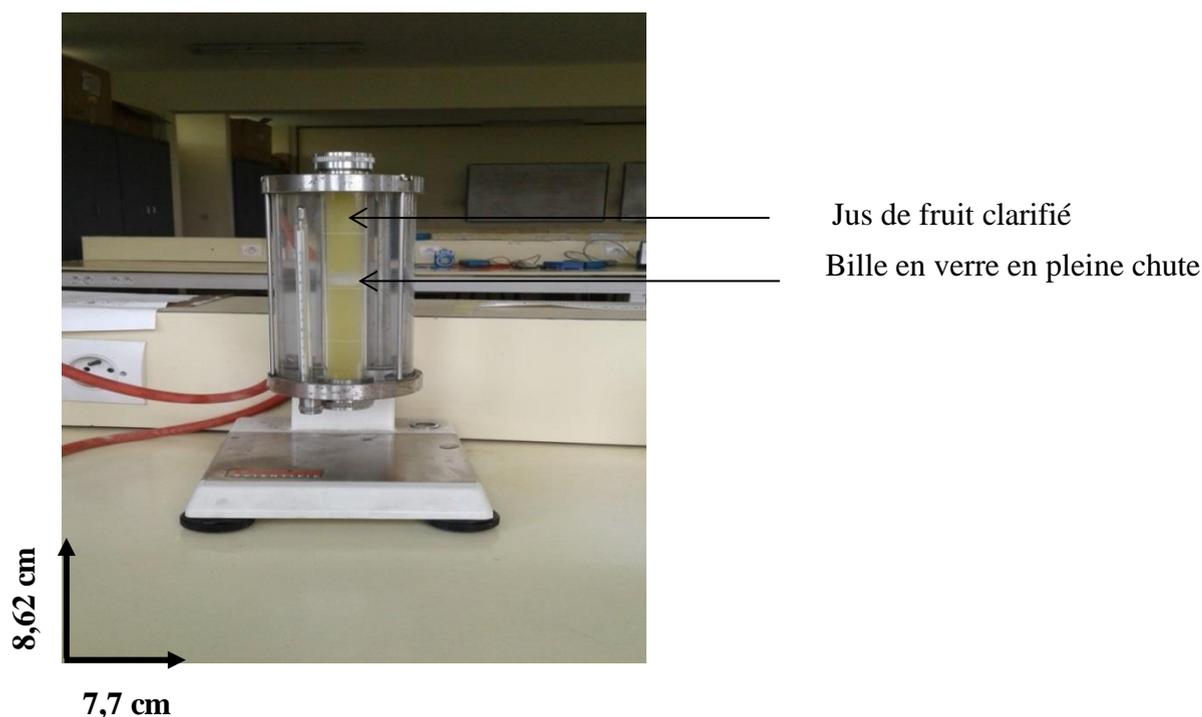


Figure 32 : Mesure de la viscosité

4-2-Production de bioéthanol par fermentation alcoolique du moût de sorgho (*Sorghum bicolor*) par les espèces de levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kudriavzevii* résistantes à l'éthanol

4-2-1-Préparation du moût

Les moûts ont été stérilisés à 121 °C pendant 15 min et refroidi à température ambiante en maintenant fermée hermétiquement les Erlenmeyers.

4-2-2-Conduite de la fermentation alcoolique

La conduite de la fermentation alcoolique a été réalisée selon la méthode décrite par Coulibaly *et al.* (2017). Un volume de 500 mL de moût a été ensemencé à 0,5 DO en culture mixte et en mono-culture pour chacune des espèces *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentation alcoolique s'est déroulée à 25 °C pendant 120 h sous agitation constante de 120 rpm.

4-2-3-Analyses physico-chimiques du moût au cours de la fermentation alcoolique

4-2-3-1-Détermination du pH, l'acidité titrable et de l'extrait sec refractométrique

Ces paramètres ont été déterminés comme précédemment décrit aux sections 2-4-1 ; 2-4-2 et 2-4-3.

MATERIEL ET METHODES

2-4-1-Mesure du pH

Le pH a été mesuré directement à l'aide d'un pH-mètre (PHS 550. pH/mV meter) dans 10 mL d'échantillon selon la méthode AOAC, (1990). La mesure est répétée trois fois.

2-4-2- Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable a été obtenue par dosage de 5 mL de l'échantillon avec une solution de NaOH 0,1 N après ajout au préalable de 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine à 1 % (AOAC, 1990). La fin du dosage est marquée par une coloration rose pâle persistante. Les résultats obtenus constituent la moyenne de trois essais. Le taux d'acidité titrable exprimé en pourcentage (%) d'acide lactique est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ acidité titrable} = \frac{\text{Vol NaOH} * \text{N NaOH} * 0,09 * 100}{PE} \quad (12)$$

Avec :

Vol NAOH = volume de la solution d'hydroxyde de sodium

NNaOH = Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium

PE = Prise d'essai

0,09 = milliéquivalent gramme d'acide lactique

2-4-3- Mesure de l'extrait sec réfractométrique

L'extrait sec réfractométrique (ESR) ou l'indice réfractométrique est déterminé selon la méthode décrite par Audigié *et al.*, (1980) à l'aide d'un réfractomètre à main (ATAGO, N-20E, Japon). Il représente la matière sèche soluble présente dans le jus de mucilage et est corrélé à la teneur en sucres. Les concentrations sont exprimées en °Brix. Le réfractomètre est constitué d'un prisme mobile, d'un prisme fixe et d'un oculaire. Pour l'analyse, quelques gouttes de l'échantillon sont placées sur le prisme fixe après ouverture de l'appareil. Le prisme mobile (volet) est rabattu. L'oculaire est porté à l'œil et dirigé vers une source de lumière. Une échelle graduée et une surface divisée en deux champs, l'un clair et l'autre sombre sont observées dans la lunette. L'oculaire est tourné pour le régler à la vue de l'opérateur de façon que l'échelle soit parfaitement nette. A ce moment, la ligne de séparation des deux champs est également nette. La teneur en matière sèche soluble de l'échantillon est lue au point où la ligne de séparation des deux champs divise l'échelle. Le chiffre lu correspond à l'extrait sec réfractométrique de l'échantillon examiné.

MATERIEL ET METHODES

4-3-Production de CO₂ durant la fermentation alcoolique par les espèces *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*

Le volume de gaz produit pendant la fermentation a été mesuré à l'aide d'un dispositif expérimental décrit par Lai (2010). Les fermentations ont été effectuées dans des Erlenmeyers de 500 mL. Des échantillons sont prélevés régulièrement pendant la fermentation alcoolique. Les Erlenmeyers sont pesés avant Poids (t-1) et après Poids (t) pour chaque échantillon afin de déterminer la cinétique de production de CO₂.

4-4-Distillation des moûts fermentés

L'extraction de l'éthanol a été effectuée par distillation des moûts à l'aide du distillateur à colonne de vigreux QUICKFIT/FC3/13 de 85cm de longueur et 4,45cm de diamètre. La température est maintenue à 79°C à la tête de colonne jusqu'à l'épuisement total de l'alcool des moûts fermentés contenu dans le ballon de chauffage. Le taux d'éthanol a été dosé à l'aide d'un pycnomètre.

5-Analyses statistiques

Les données de l'enquête ont été traitées avec le logiciel IBM SPSS (statistics 20). L'analyse de variance à un facteur (ANOVA) et les tests de Tukey et de Levene (test-t) ont été effectués avec le logiciel XLSTAT (Adinosoft Inc., version 2016) pour comparer les variables analysées sur les jus de mucilages de cacao, les jus d'orange clarifiés et les moûts fermentés. Les différences sont considérées comme significatives pour des valeurs de $P < 0,05$. L'analyse en composantes principales (ACP) a servi à comparer les échantillons de jus de mucilage à partir des variables mesurées. L'ACP permet de regrouper les variables mesurées en de nouvelles variables appelées "composantes" ou "facteurs". Ce regroupement est basé sur la corrélation des variables. Le logiciel XLSTAT (Adinosoft Inc.) a été utilisé pour faire l'analyse en composantes principales. L'analyse de la corrélation de Pearson permettant de révéler la nature de la corrélation entre les paramètres étudiés est réalisée avec le logiciel XLSTAT (Adinosoft Inc.).

La classification hiérarchique ascendante (CHA) a été utilisée pour agglomérer les échantillons de jus par similarité des paramètres analysés. CHA consiste à agréger les échantillons selon leur ressemblance mesurée à l'aide d'un indice de similarité ou de dissimilitude. Elle produit une suite de partitions emboîtées de l'ensemble d'échantillons à classifier. L'algorithme commence par rassembler les couples d'échantillons les plus ressemblants, puis à agréger progressivement

MATERIEL ET METHODES

les autres échantillons en fonction de leur ressemblance, jusqu'à ce que la totalité des échantillons ne forme plus qu'un seul groupe.

Les calculs et les figures ont été effectués à l'aide d'EXCEL 2010 (XP – Microsoft Corp.).

TROISIÈME PARTIE

RÉSULTATS & DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : ÉVALUATION DES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES, PHYTOCHIMIQUES, NUTRITIONNELLES ET FONCTIONNELLES DU JUS DE MUCILAGE DE CACAO AU COURS DE LA CONSERVATION À LA TEMPÉRATURE AMBIANTE (28±2 °C)

1-Résultats

Cette première partie des résultats nous a permis tout d'abord d'actualiser l'état actuel des connaissances sur le jus de mucilage de cacao à travers une enquête de consommation du jus de mucilage de cacao qui a été réalisée auprès des populations des zones échantillonnées. Cette enquête avait pour but d'établir le profil socio-démographique des personnes interrogées et de déterminer le niveau de connaissance du jus de mucilage, la consommation du jus de mucilage et sa fréquence, la quantité consommée, sa durée maximale de conservation et ses éventuels effets bénéfiques pour l'ensemble de tous les sites d'enquête. Ensuite, le jus de mucilage de cacao a été prélevé pour la détermination de ses propriétés nutritives, biochimiques, phytochimiques et fonctionnelles au cours de sa conservation à la température ambiante.

1-1-Profil socio-démographique des personnes interrogées

Pour l'ensemble des sites d'enquête, l'étude a permis de dresser le profil socio-démographique des personnes interrogées soit 500 personnes au total. Il ressort de ces résultats que 79 % des personnes enquêtées étaient de sexe masculin contre 31 % pour les femmes. Les tranches d'âge majoritaires étaient de 25 à 50 ans (62,2 %) et de 15 à 25 ans (30,8 %). La plupart des personnes interrogées n'avaient aucun niveau d'étude (54,4 %) dont la majorité exerçait dans le secteur agricole (71 %) et les mariés (67,8 %) étaient les plus nombreux. Parmi les personnes rencontrées les Ivoiriens (77,4 %) et le Burkinabé (19,8 %) étaient les plus dominants (Tableau V).

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau V: Profil socio-démographique des personnes interrogées

Paramètres	Effectifs	Pourcentages
Sexe (n = 500)		
Masculin	395	79
Féminin	105	21
Age (n = 500)		
De 5 à 15 ans	20	4
De 15 à 25 ans	154	30,8
De 25 à 50 ans	313	62,6
Plus de 50 ans	13	2,6
Niveau d'étude (n = 500)		
Aucun	272	54,4
Primaire	123	24,6
Secondaire	91	18,2
Supérieur	14	2,8
Profession (n = 500)		
Elève	57	11,4
Etudiant	8	1,6
Artisan	8	1,6
Chômeur	3	0,6
Agriculteur	355	71
Autre	69	13,8
Situation matrimoniale (n = 500)		
Marié	339	67,8
Célibataire	161	32,2
Nationalité (n = 500)		
Ivoirienne	387	77,4
Ghanéenne	10	2
Burkinabé	99	19,8
Togolaise	4	0,8

n = nombre de personnes interrogées

RESULTATS ET DISCUSSION

1-2-Niveau de connaissance du jus de mucilage de cacao par ocalité

Le niveau de connaissance du jus de cacao ne diffère pas quelle que soit la localité. Il est de 100% pour chaque localité (Figure 33). Par ailleurs, l'analyse statistique relatif au test de Khi-deux (χ^2) avec $p > 0,05$ révélé qu'il n'y a pas de lien entre la variable localité et niveau de connaissance du jus de mucilage de cacao.

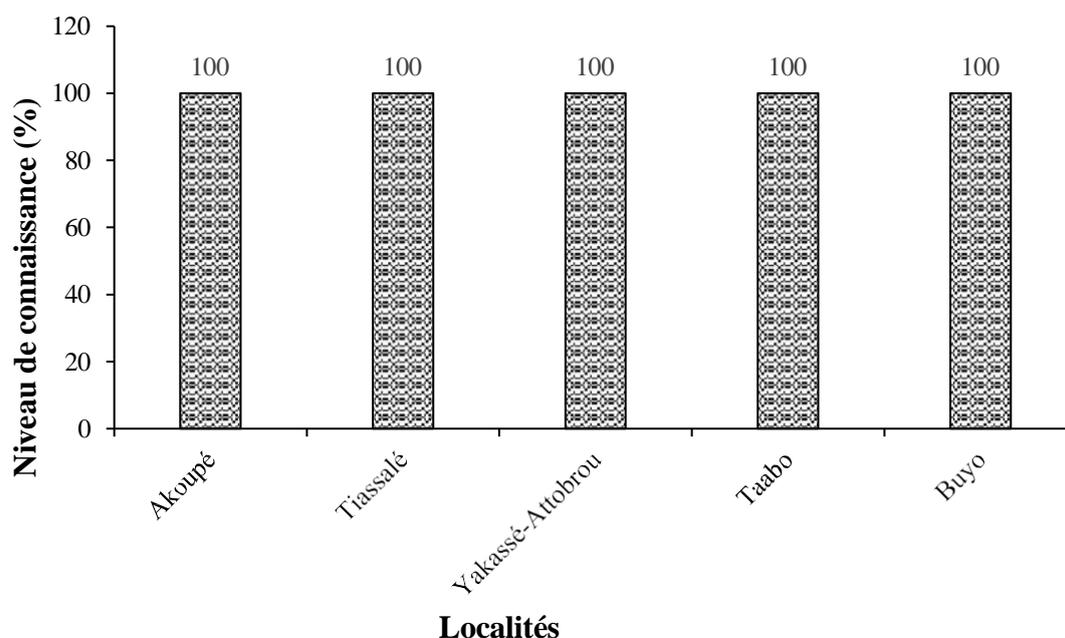


Figure 13 : Niveau de connaissance du jus de mucilage de cacao par localité

1-3- Moment de consommation du jus de mucilage de cacao selon les localités

Les résultats relatifs au moment de consommation du jus de mucilage de cacao montrent que le jus de mucilage de cacao est plus consommé le soir dans la localité de Yakassé-Attobrou avec un taux 41% suivi de la consommation durant les travaux champêtres avec 40% dans la localité Taabo. Toutefois, l'analyse statistique a montré $p > 0,05$ (Tableau VI). Par conséquent, il n'apparaît pas de dépendance entre la localité et le moment de consommation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau VI: Moment de consommation du jus de mucilage de cacao par localités

Localités	Moment de consommation (%)				Paramètres de Khi-deux (χ^2)			
	Matin	Travaux champêtres	Soir	Autres	ddl	(χ^2_{obs})	(χ^2_{theo})	P
Akoupé	10	29	38	23				
Tiassalé	12	31	36	21				
Yakasse-Attobrou	06	32	41	21	12	12,95	21,02	>0,05
Taabo	07	40	34	19				
Buyo	15	24	33	28				

1-4- Nature des effets bénéfiques du jus de mucilage de cacao

Les résultats de l'étude ont révélé divers effets bénéfiques à savoir laxatif, fortifiant, antidiarrhéique, digeste et autres. Ces effets bénéfiques varient quelle que soit la localité. L'effet le plus ressenti est laxatif. Les taux sont 42 %, 39 %, 41 %, 37 % et 34 % respectivement pour les localités de Akoupé, Tiassalé, Yakassé-Attobrou, Taabo et Buyo. Toutefois, $p > 0,05$ (Tableau VII). Ainsi aucun lien n'a été établi entre la nature de l'effet bénéfique ressenti et la localité.

Tableau VII: Nature des effets bénéfiques du jus de mucilage de cacao par localité

Localités	Nature des effets bénéfiques						Paramètres de Khi-deux (χ^2)			
	Laxatif	Fortifiant	Anti Diarrhéique	Digeste	Autre	Aucun	ddl	(χ^2_{obs})	(χ^2_{theo})	P
Akoupé	42	26	14	14	03	1				
Tiassalé	39	20	16	20	03	2				
Yakasse-Attobrou	41	35	12	11	0	1	20	22,72	31,41	>0,05
Taabo	37	26	17	18	0	2				
Buyo	34	25	12	19	7	3				

RESULTATS ET DISCUSSION

1-5- Quantités de jus de mucilage de cacao consommées

Les quantités de jus de mucilage de cacao diffèrent d'une localité à l'autre. La quantité la plus consommée est de 1 Litre. Elles sont de 51%, 50%, 52%, 48% et 51% respectivement pour les localités de Akoupé, Tiassalé, Yakassé-Attobrou, Taabo et Buyo. En effet $p > 0,05$ (Tableau VIII). Ainsi, il n'y pas de lien entre la quantité consommée de jus de mucilage de cacao et la localité.

Tableau VIII: Quantités de jus de mucilage de cacao consommées par localité

Localités	Quantité consommée (%)				Paramètres de Khi-deux (χ^2)			
	250 mL	500 mL	1 L	Plus de 1 L	ddl	(χ^2_{obs})	(χ^2_{theo})	P
Akoupé	09	21	51	19				
Tiassalé	12	20	50	18				
Yakasse-Attobrou	10	21	52	17	12	2,46	21,02	>0,05
Taabo	13	23	48	16				
Buyo	11	24	51	14				

1-6-Temps de conservation du jus de mucilage de cacao

Les analyses ont montré que le temps de conservation du jus de mucilage varie en fonction de la localité. Toutefois, le temps de maximale de conservation est de 3 jours. Les proportions du temps de conservation de 3 jours étaient de 51%, 50%, 52%, 48% et 51% respectivement pour les localités de Akoupé, Tiassalé, Yakassé-Attobrou, Taabo et Buyo. L'analyse statistique relatif au test de Khi-deux (χ^2) a montré que $p > 0,05$ (Tableau IX). Par conséquent, il n'existe pas de dépendance entre le temps de conservation du jus de mucilage de cacao et la localité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau IX: Temps de conservation du jus de mucilage de cacao dans les localités

Localités	Temps de conservation (%)				Paramètres de Khi-deux (χ^2)			
	1 Jour	2 Jours	3 Jours	Autre	ddl	(χ^2_{obs})	(χ^2_{theo})	P
Akoupé	09	21	51	19				
Tiassalé	12	20	50	18				
Yakasse-Attobrou	10	21	52	17	12	11,79	21,02	>0,05
Taabo	13	23	48	16				
Buyo	11	24	51	14				

1-5- Évolution des paramètres biochimiques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

I-5-1- Évolution des paramètres biochimiques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

Les paramètres biochimiques des jus de mucilage de cacao ont été évalués pour les différents échantillons au même temps de conservation.

L'analyse des paramètres biochimiques a concerné l'extrait sec, l'humidité, les cendres, les protéines, les lipides, les fibres et les glucides. Les valeurs de l'évolution de ces paramètres sont consignées dans le tableau X. De façon générale, quel que soit le paramètre et les échantillons, les valeurs évoluent de façon irrégulière au cours de la conservation. Ainsi, en début de conservation (0 h), les valeurs de l'extrait sec, des teneurs en cendres et en glucides totaux les plus élevées ont été observées l'échantillon de Taabo avec $12,29 \pm 0,06$ % ; $0,63 \pm 0,05$ % et $11,37 \pm 0,07$ % respectivement. S'agissant de la teneur en protéines, le taux le plus élevé a été enregistré au niveau de l'échantillon de Yakassé-Attobrou avec $0,40 \pm 0,01$. Au bout de 24 h de conservation, les valeurs les plus élevées de l'extrait sec, des teneurs en cendres et en glucides totaux ont été observées avec l'échantillon de Taabo avec $12,31 \pm 0,08$ % ; $0,59 \pm 0,06$ % et $11,46 \pm 0,10$ %. Le taux de protéines le plus élevé avec $0,66 \pm 0,02$ % a été observé avec l'échantillon de Tiassalé. Après de 48 h de conservation, les valeurs de l'extrait sec, des teneurs en protéines et en glucides totaux les plus élevées ont été observées l'échantillon de Taabo avec $11,89 \pm 0,01$ % ; $0,77 \pm 0,01$ % et $10,64 \pm 0,04$ % respectivement. La teneur la plus élevée en cendres a été obtenue au niveau de l'échantillon de Tiassalé avec $0,62 \pm 0,03$ %. En fin de

RESULTATS ET DISCUSSION

conservation (72 h), les teneurs les plus importantes d'extrait sec et de glucides totaux avec respectivement $10,04 \pm 0,01$ % et $9,21 \pm 0,07$ % ont été enregistrées avec l'échantillon de Yakassé-Attobrou, alors que celle en cendres avec $0,63 \pm 0,07$ % a été observée au niveau de l'échantillon de Tiassalé. La teneur la plus importante en protéines a été obtenue au niveau de l'échantillon de Buyo avec $0,46 \pm 0,01$ %. De plus, les analyses statistiques ont montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons au cours de la conservation.

De manière générale, les lipides et les fibres brutes n'ont pas été détectés dans nos échantillons.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau X: Teneur des paramètres biochimiques (%) des jus de cacao au cours de la conservation

	Temps(h)	Extrait sec(%)	Humidité(%)	Cendres(%)	Protéines(%)	Lipides(%)	Fibres(%)	Glucides(%)
Taabo	T0	12,29±0,06a	87,70±0,06i	0,63±0,05a	0,30±0,01fghi	0	0	11,37±0,07a
	T24	12,31±0,08a	87,64±0,01i	0,59±0,06abc	0,31±0,01fg	0	0	11,46±0,10abc
	T48	11,89±0,01b	88,11±0,01hi	0,48±0,02abcd	0,77±0,01a	0	0	10,64±0,04a
	T72	5,29±0,14i	94,72±0,16bcd	0,38±0,04cdef	0,37±0,01de	0	0	4,53±0,07hi
Yakassé Attobrou	T0	11,44±0,12c	88,56±0,12hi	0,44±0,01abcde	0,40±0,01cd	0	0	10,60±0,02ab
	T24	6,96±0,02g	93,03±0,02def	0,25±0,03efg	0,25±0,01hij	0	0	6,47±0,04fgh
	T48	8,60±0,10f	91,39±0,10fg	0,28±0,01defg	0,33±0,01ef	0	0	8±0,13def
	T72	10,04±0,01d	89,95±0,01gh	0,43±0,04abcde	0,41±0,02cd	0	0	9,21±0,07bcd
Akoupé	T0	5,46±0,11i	94,54±0,11cde	0,17±0,03fg	0,12±0,02l	0	0	5,17±0,06gh
	T24	4,12±0,01j	97,37±2,12a	0,14±0,04g	0,12±0,01l	0	0	2,37±0,05j
	T48	9,41±0,07 ^e	90,58±0,07g	0,44±0,03abcde	0,30±0,01fghi	0	0	8,68±0,04cde
	T72	8,70±0,16f	91,30±0,16fg	0,42±0,03abcde	0,40±0,01d	0	0	7,88±0,04def
Tiassalé	T0	5,87±0,02h	94,12±0,02de	0,61±0,02ab	0,30±0,01fghi	0	0	4,97±0,05gh
	T24	3,64±0,04k	96,36±0,04abc	0,42±0,05abcde	0,66±0,02b	0	0	2,56±0,05ij
	T48	3,54±0,01k	96,45±0,01abc	0,62±0,03ab	0,14±0,0kl	0	0	2,79±0,02ij
	T72	3,35±0,04kl	96,65±0,04ab	0,63±0,07a	0,2±0,0jk	0	0	2,52±0,06ij
Buyo	T0	7,28±0,02g	92,72±0,02ef	0,38±0,07cdef	0,27±0,0ghi	0	0	6,63±0,40efg
	T24	3,07±0,01l	96,92±0,01a	0,27±0,0defg	0,31±0,0fgh	0	0	2,5±0,02ij
	T48	2,67±0,16m	97,325±0,16a	0,40±0,04bcde	0,25±0,01ij	0	0	2,03±0,03j
	T72	2,44±0,03m	97,55±0,03a	0,35±0,02defg	0,46±0,01c	0	0	1,64±0,07j

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± l'écart type de 3 mesures. Dans la même la colonne, les valeurs moyennes ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p<0,05). T0 : 0h ; T24 : 24 heures ; T48 : 48 heures ; T72 : 72 heures

RESULTATS ET DISCUSSION

1-5-2- Évolution de la teneur en vitamines des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

L'analyse de la teneur en vitamines par chromatographie en phase liquide à haute performance a permis d'identifier et de quantifier 2 vitamines à savoir : l'acide ascorbique et la cobalamine. Une irrégularité dans l'évolution des teneurs des vitamines (acide ascorbique et la cobalamine) est observée pour tous les échantillons pour un même échantillon (localité) et au cours de la conservation (Tableau XI). De manière générale, les teneurs en cobalamine sont plus importantes que celles de l'acide ascorbique. Les teneurs les plus élevées en acide ascorbique et en cobalamine sont enregistrées en début de conservation (0 h) dans l'échantillon de Tiassalé avec respectivement $14,97 \pm 0,45$ et $34,51 \pm 0,69$ g/L. A 24 h de conservation, les concentrations les plus importantes d'acide ascorbique et cobalamine ont été observée dans l'échantillon de Taabo avec $9,6 \pm 0,63$ g/L et $13,75 \pm 0,03$ g/L respectivement.

Au de 48 h de conservation la concentration la plus élevée en acide ascorbique de $9,29 \pm 0,12$ g/L a été obtenu avec l'échantillon de Taabo alors que celle de la cobalamine de $20,61 \pm 0,25$ g/L a été observée avec l'échantillon de Akoupé. En fin de conservation (72 h) la concentration la plus élevée en acide ascorbique de $9,20 \pm 2,89$ g/L a été obtenu avec l'échantillon de Akoupé alors que celle de la cobalamine de $14,87 \pm 0,70$ g/L a été observée avec l'échantillon de Tiassalé. De plus les analyses statistiques ont montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons au cours de la conservation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XI : Teneur en vitamines (g/L) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

	Temps(h)	Acide ascorbique	Cobalamine
Taabo	T0	7,43±0,43cdefg	13,86±0c
	T24	9,60±0,63cd	13,75±0,03c
	T48	9,29±0,12cd	12,98±0,28d
	T72	4,73±0,38defg	12,94±0,11c
Yakassé-Attobrou	T0	4,62±0defg	14,66±0,38bc
	T24	8,21±2,96cde	13,56±0,01
	T48	7,74±1,65cde	12,87±1,06c
	T72	4,54±1,12defg	12,52±0,39c
Akouké	T0	10,43±0,86bc	10,245±0,5cd
	T24	7,50±0,70cdef	11,03±0,29c
	T48	5,27±0,29cdefg	20,61±0,25b
	T72	9,20±2,89cd	12,15±0,19c
Tiassalé	T0	14,97± 0,45ab	34,51±0,69a
	T24	2,46±0,02fg	14,30± 0c
	T48	3,59±0,57efg	13,52±0,67c
	T72	5,93±0,44cdefg	14,87±0,70bc
Buyo	T0	5,17±0,41defg	13,84±0,81c
	T24	2,26±1,67g	13,39±0,69c
	T48	2,25±1,41g	15,93±2,43d
	T72	5,25±0,64cdefg	10,25±1,09cd

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± l'écart type de 3 mesures. Dans la même la colonne, les valeurs moyennes ne portant pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).
T0 : 0h ; T24 : 24 heures ; T48 : 48 heures ; T72 : 72 heures

1-5-3- Évolution de la teneur en acides organiques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

L'analyse de la teneur en acides organiques par chromatographie en phase liquide à haute performance a permis d'identifier et de quantifier 6 acides organiques à savoir : les acides tannique, citrique, tartrique, fumarique, lactique et acétique (Tableau XII). A l'instar des autres paramètres, l'évolution des teneurs en acides organiques au cours de la conservation est irrégulière. La concentration la plus faible a été obtenue avec l'acide fumarique quel que soit l'échantillon et ce, durant toute la durée de conservation. Aussi, pour les échantillons analysés et durant toute la période de conservation les concentrations les plus importantes ont été observées avec l'acide citrique et l'acide tartrique. Ainsi en début de conservation (0 h), les concentrations les plus élevées étaient 23,52±1,38 g/L pour l'acide citrique et 25,13±1,37 g/L

RESULTATS ET DISCUSSION

pour l'acide tartrique ont été obtenues dans l'échantillon Yakassé-Attobrou. Au bout 24h de conservation les concentrations étaient de $75,66 \pm 1,32$ g/L pour l'acide citrique et $77,77 \pm 1,31$ g/L pour l'acide tartrique dans l'échantillon de Tiassalé. Après 48 h de conservation, l'échantillon de Buyo a enregistré les concentrations les plus importantes d'acide citrique et d'acide tartrique avec $36,38 \pm 0,51$ g/L et $37,39 \pm 0,57$ g/L respectivement. En fin de conservation (72 h), les concentrations en acide citrique et en acide tartrique les concentrations les plus élevées ont été obtenues dans l'échantillon de Buyo avec $28,25 \pm 1,59$ g/L et $29,97 \pm 1,68$ g/L respectivement. Par ailleurs, les analyses statistiques ont montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons au cours de la conservation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XII: Teneur en acides organiques (g/L) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

	Temps(H)	Acide tannique	Acide Acétique	Acide citrique	Acide lactique	Acide fumarique	Acide tartrique
Taabo	T0	0,80±0,02cde	1,48±0,01efg	14,48±1,13ef	6,92±0,02fg	0,54±0ab	15,88±0,07f
	T24	0,51±0,02de	0,86±0,04i	9,23±1,32g	4,32±0,20g	0,05±0,01b	8,97±1,31h
	T48	0,56±0,02de	0,97±0,01ghi	10,37±0,10fg	4,49±0,30g	1,03±0,07a	9,92±0,07h
	T72	1,57±0,09bcde	3,44±0,07b	27,91±1,37c	13,34±0,09bcd	0,19±0,02b	16,27±0,04a
Yakassé Attobrou	T0	1,40±0,02bcde	2,57±0,09c	23,52±1,38cd	10,55±1,34def	0,16±0b	25,13±1,37de
	T24	0,85±0,02bcde	1,66±0,29 ^e	14,66±0,25ef	6,71±0,37fg	0,1±0b	15,7±0,14f
	T48	0,99±0bcde	1,80±0,07d	19,41±0,72de	7,89±1,28efg	0,13±0,02b	18,41±0,01f
	T72	1,67±0,14bcd	2,55±0,11c	21,44±1,14d	10,88±0,20def	0,18±0b	24,31±1,4e
Buyo	T0	1,30±0,02bcde	2,30±0,07cd	23,30±1,55cd	10,34±0,07def	0,15±0b	24,09±2,87e
	T24	1,98±0,02bc	3,51±0,04b	35,75±0,14b	15,78±0,02bc	0,24±0,04b	36,43±0,57b
	T48	1,90±0,01bc	3,63±0,04b	36,38±0,51b	16,24±0,01bc	0,21±0,04b	37,39±0,57b
	T72	1,57±0,04bcde	2,82±0,05c	28,25±1,59c	12,49±1,28cde	0,19±0b	29,97±1,68c
Akoupé	T0	0,41±0,02e	0,74±0i	7,58±2,71g	3,33±1,37g	0,05±0b	7,77±1,31h
	T24	0,43±0,04e	0,75±0i	7,60±0,42g	3,56±0,12g	0,05±0b	7,87±0,09h
	T48	0,80±0,04cde	1,43±0,01efgh	14,48±0,11ef	6,39±0,12fg	0,09±0b	14,88±1,3fg
	T72	0,58±0,01de	1,04±0,01fghi	10,47±2,72gh	4,61±0,15g	0,07±0,01b	10,76±1,32gh
Tiassalé	T0	0,50±0,03de	0,89±0,11hi	9,20±0,11g	4,03±0,65g	0,06±0b	9,45±0,11h
	T24	4,19±0,04a	7,42±0a	75,66±0,66a	33,33±0,73a	0,51±0,0ab	77,77±0,09a
	T48	2,00±0,01b	3,71±0b	35,68±0,09b	17,53±0,01b	0,25±0b	36,80±0,02b
	T72	0,87±0,09bcde	1,55±0,48ef	15,83±0,70e	6,97±0,21fg	0,1±0b	16,27±0,15f

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± l'écart type de 3 mesures. Dans la même la colonne, les valeurs moyennes ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p<0,05).

T0 : 0h ; T24 : 24 heures ; T48 : 48 heures ; T72 : 72 heures

RESULTATS ET DISCUSSION

1-5-4- Évolution de la valeur énergétique des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

La valeur énergétique du jus de mucilage de cacao varie au cours de la conservation quelle que soit la localité (figure 34). La valeur énergétique la plus élevée a été obtenue avec l'échantillon de Taabo avec $40,59 \pm 0,8$ kcal/100 mL en début de conservation (0 h) suivi de celle l'échantillon de Yakassé-Attobrou avec $37,84 \pm 0,9$ kcal/100 mL au bout de 24 h de conservation. A 48 h de conservation, la valeur énergétique la plus importante est enregistrée avec l'échantillon de Taabo avec $37,98 \pm 0,6$ kcal/100 mL alors qu'en fin de conservation cette valeur était plus importante avec l'échantillon d'Akoupe ($37,09 \pm 0,8$ kcal/100 mL). Par ailleurs, l'analyse de variance a révélé une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons au cours de la conservation.

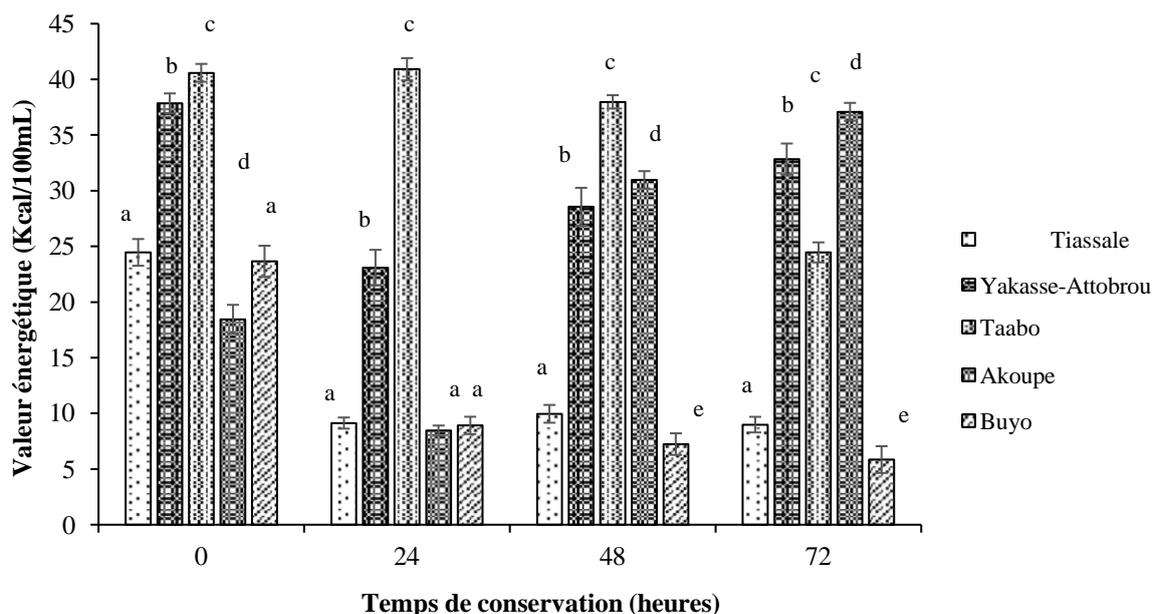


Figure 34 : Valeur énergétique des jus de mucilage cacao au cours de la conservation

1-6- Évolution de la teneur en composés phénoliques des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation à la température ambiante

1-6-1- Évolution de la teneur en polyphénols totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation à la température ambiante

RESULTATS ET DISCUSSION

Les teneurs en polyphénols totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation sont présentés à la figure 35. Ces teneurs varient au cours de la conservation. Cependant quelque soit l'échantillon, les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux ont été observées avec ceux de Tiassalé et ce tout au long de la conservation. Ces teneurs étaient de $1,17\pm 0,7$ en début de conservation à $1,32\pm 0$ g/L EAG en fin de conservation. Par ailleurs, les analyses statistiques ont montré une différence significative entre les échantillons au cours de la conservation.

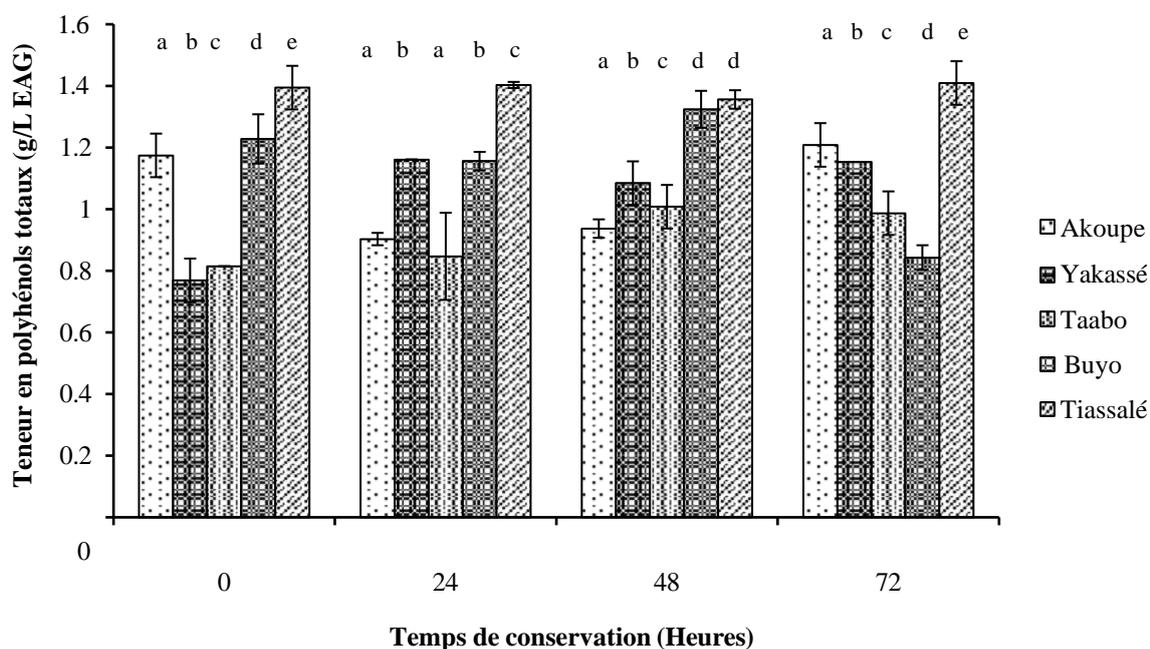


Figure 35 : Teneur en polyphénols totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

1-6-2- Évolution de la teneur en flavonoïdes totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

La figure 36 présente l'évolution des teneurs en flavonoïdes totaux de nos échantillons de jus de mucilage de cacao qui varie au cours de la conservation. Ainsi, en début de conservation (0h), la teneur la plus importante est obtenue avec l'échantillon de Akoupe avec $0,08\pm 0,01$ g/L EQ suivi 24 h après de l'échantillon Buyo avec $0,14\pm 0,01$ g/L EQ puis de l'échantillon de Yakassé-Attobrou avec $0,21\pm 0,04$ à 48 h et en fin de conservation (72h) avec respectivement $0,21\pm 0,01$ et $0,16\pm 0,01$ g/L EQ. Par ailleurs, l'analyse de variance a révélé une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons au cours de la conservation.

RESULTATS ET DISCUSSION

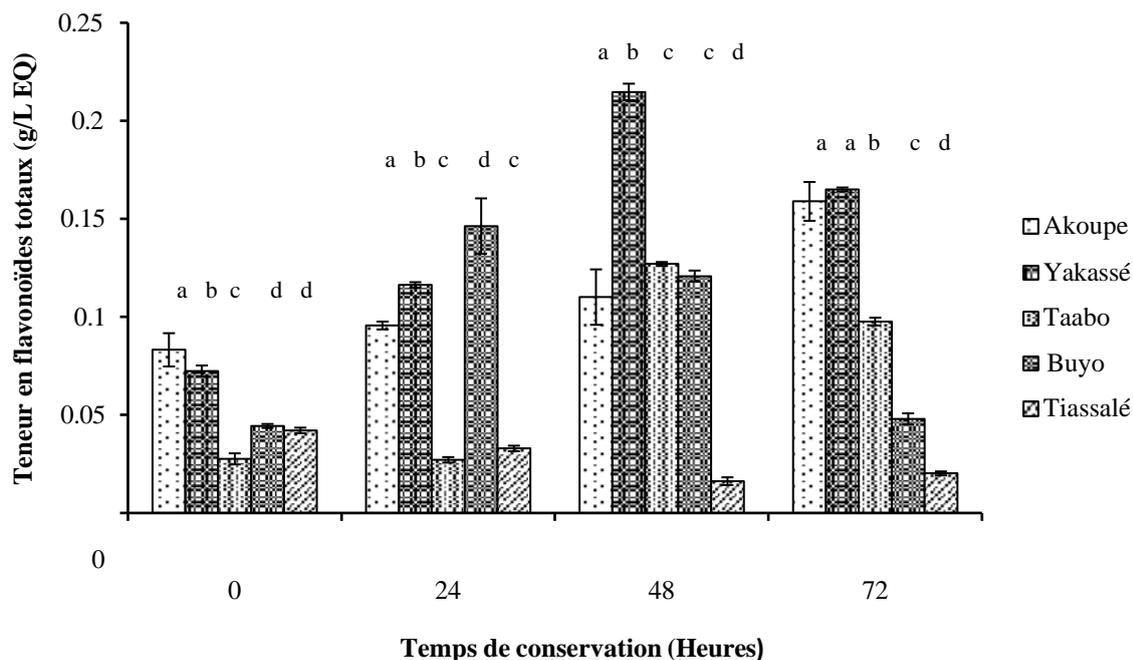


Figure 36 : Teneur en flavonoïdes totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

1-6-3- Évolution de la teneur en tanins totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

Les teneurs en tanins totaux varient au cours de la conservation (Figure 37). La concentration la plus élevée en tanins totaux a été observée en début de conservation (0 h) au niveau de l'échantillon de Tiassalé avec $60,40 \pm 0,68$ g/L. Après 24 h de conservation, la concentration la plus importante a été obtenue dans l'échantillon de Taabo avec $60,88 \pm 0,76$ g/L. Les échantillons de Taabo et Tiassalé ont été enregistrées les concentrations les élevées avec $35,27 \pm 2,56$ g/L et $35,27 \pm 0,23$ g/L respectivement. En fin de conservation (72 h) la concentration la plus importante a été obtenue dans l'échantillon de Taabo avec $18,38 \pm 1,23$ g/L. En outre, l'analyse de variance a révélé une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons au cours de la conservation.

RESULTATS ET DISCUSSION

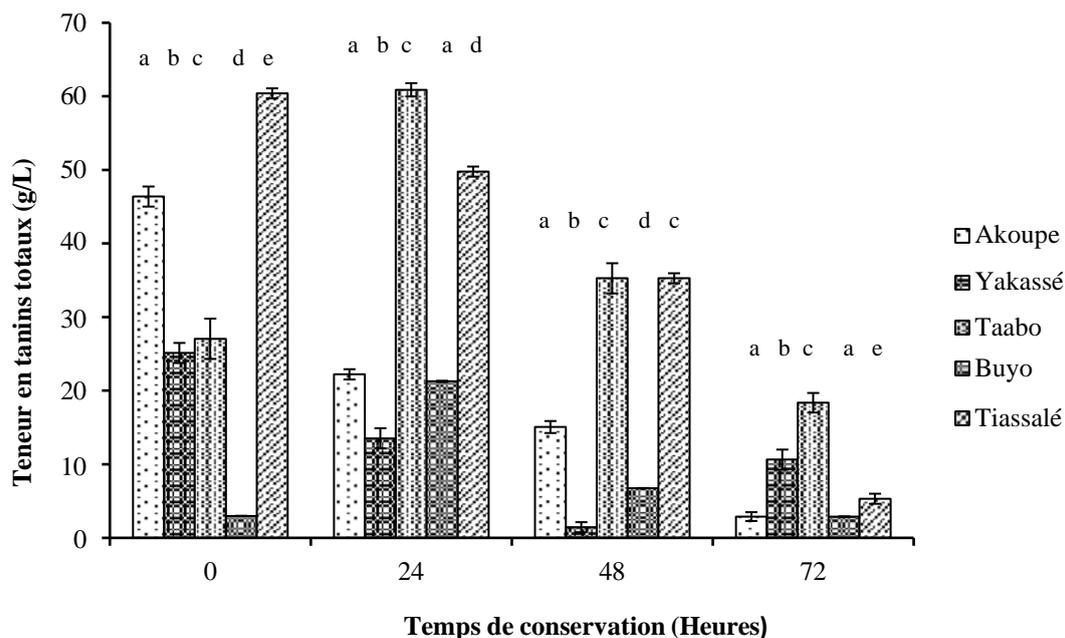


Figure 37 : Teneur en tanins totaux des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

1-7- Évolution de l'activité antioxydante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

1-7-1- Évolution de l'activité antioxydante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation par la méthode de DPPH (1,1-diphényl -2- picrylhydrazyle)

La figure 38 présente l'évolution de l'activité antioxydante des jus de mucilage déterminée par la méthode de DPPH. Quel que soit l'échantillon, l'activité la plus importante a été observée dans l'échantillon de Tiassalé et ce, durant toute la période de conservation. Les valeurs étaient de $89,66 \pm 4,34$ % ; $88,76 \pm 2,12$ % ; $86,7 \pm 0,87$ % et $87,78 \pm 1,56$ % respectivement à 0 h ; 24 h ; 48 h et 72 h. De plus, une différence significative ($p < 0,05$) a été enregistrée entre les échantillons au cours de la conservation.

RESULTATS ET DISCUSSION

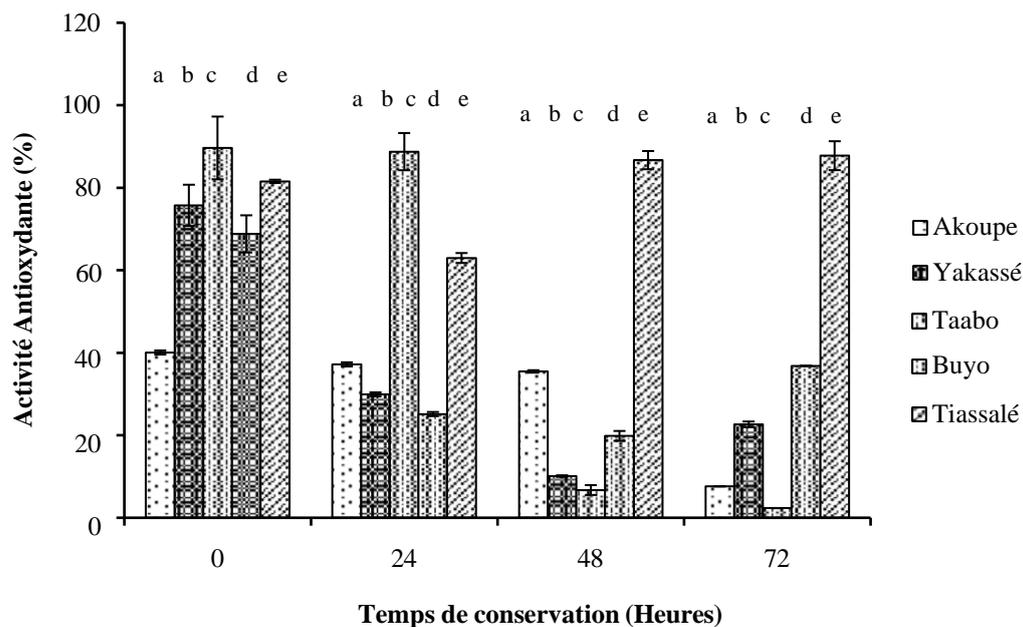


Figure 38 : Évolution de l'activité antioxydante (DPPH) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

1-7-2- Évolution de l'activité antioxydante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation par la méthode FRAP (ferricyanure de potassium-chlorure ferrique)

L'évolution des valeurs de l'activité antioxydante déterminée par la méthode FRAP est présentée à la figure 39. Pour l'ensemble des échantillons, l'activité antioxydante varie à l'exception des échantillons de Taabo et Tiassalé. L'échantillon de Taabo est caractérisé par une augmentation de l'activité antioxydante passant de $3,5 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ de vit C en début de conservation (0h) à $24,1 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ de vit C en fin de conservation (72h). Par contre, au niveau de l'échantillon de Tiassalé une baisse de l'activité antioxydante est observée tout au long de la conservation avec des valeurs passant de $23,8 \pm 2,77$ à $7,43 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ de vit C. Par ailleurs, quel que soit l'échantillon, l'activité antioxydante la plus importante a été obtenue avec l'échantillon de Buyo au bout de 48 h de conservation avec $29,93 \pm 1,30 \mu\text{g/mL}$ de vit C tandis que la plus faible activité a été enregistrée au niveau de l'échantillon de Taabo en début de conservation (0h) avec $3,5 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ de vit C. Aussi, une différence significative a ($p < 0,05$) été enregistrée entre les échantillons au cours de la conservation.

RESULTATS ET DISCUSSION

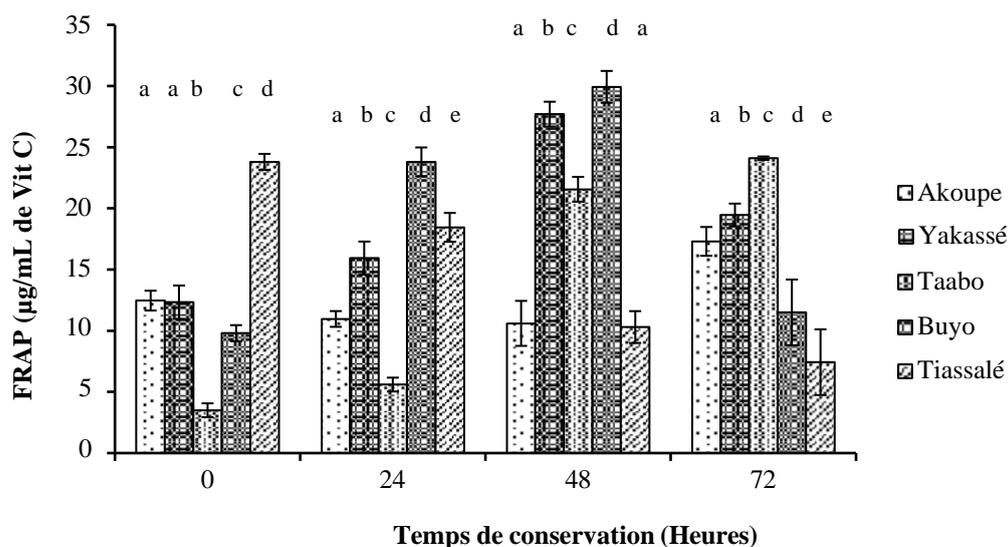


Figure 39 : Évolution de l'activité antioxydante (FRAP) des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

1-8- Analyse en composantes principales des caractéristiques phytochimiques et antioxydantes

L'analyse en composantes principales effectuée à partir des paramètres phytochimiques et antioxydants à 0 h de conservation est présentée à la figure 40A. Les deux axes Dim 1 et Dim 2 ont expliqué 80,20 % de la variabilité totale avec 47,86 % pour Dim 1 pour une valeur propre de 2,393 et 32,33 % pour Dim 2 pour une valeur propre de 1,617 (Tableau XIII). Ainsi en début de conservation (0h) l'activité antioxydante déterminée par la méthode FRAP est fortement corrélée à la teneur en phénols totaux et tanins totaux avec respectivement pour coefficient de corrélation $r=0,698$ et $r=0,688$. Cependant, une corrélation négative a été observée entre la teneur en flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante par DPPH ($r=-0,807$) (Tableau XVI). Les polyphénols totaux, les tanins totaux et l'activité antioxydante (FRAP) ont contribué fortement à la formation de l'axe Dim 1 tandis la formation de l'axe Dim 2 était due aux flavonoïdes totaux (Figure 40B).

RESULTATS ET DISCUSSION

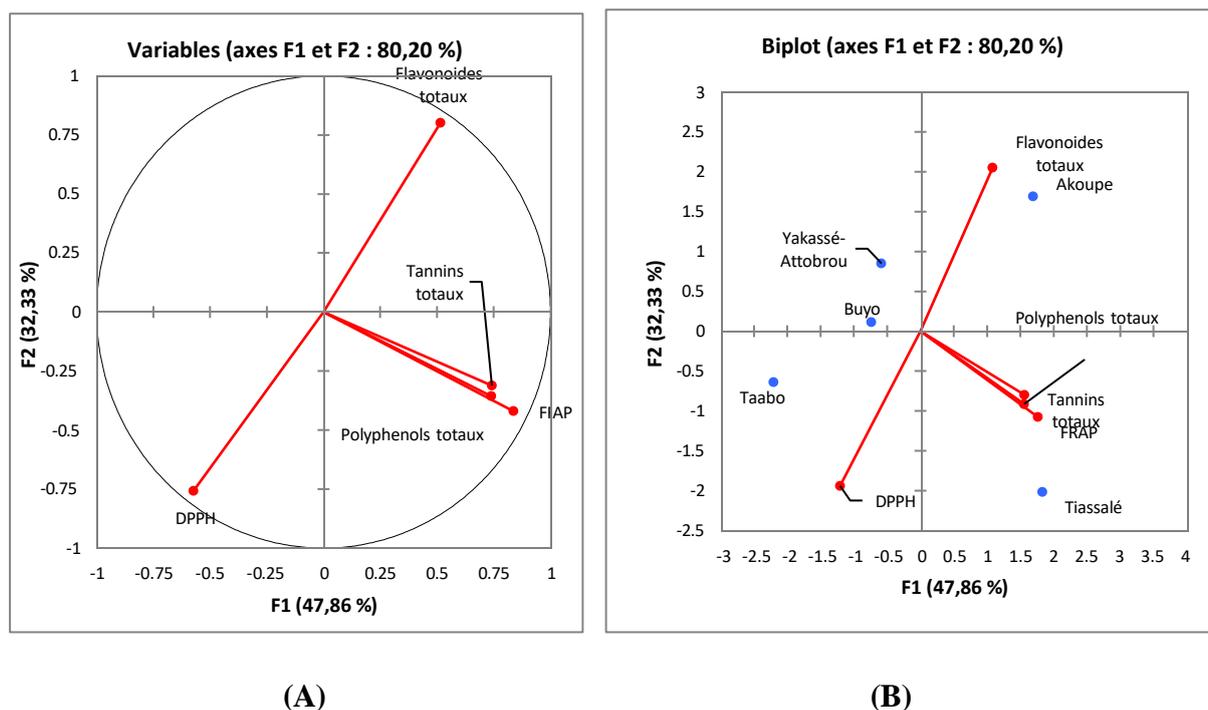


Figure 40 : Projection des variables initiales (paramètres phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 0h de conservation

Tableau XIII : Valeurs propres et variances expliquées des axes principaux à 0h de conservation

	F1	F2
Valeur propre	3,447	1,355
Variabilité (%)	68,937	27,094
% cumulé	68,937	96,031

Tableau XIV : Corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en composés phénoliques en début de conservation (0h).

	FRAP	DPPH
Polyphénols totaux	0,698*	-0,307
Flavonoïdes totaux	0,184	-0,807**
Tannins totaux	0,688*	-0,124

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (unilatéral).

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (unilatéral).

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

RESULTATS ET DISCUSSION

A 24 h de conservation, l'ACP présenté à la figure 41A a révélé que les deux axes Dim 1 et Dim 2 axes ont expliqué 96,03 % de la variabilité totale avec 68,94 % pour Dim 1 pour une valeur propre de 3,447 et 27,09 % pour Dim 2 pour une valeur propre de 1,355 (Tableau XV). Les flavonoïdes totaux, les tanins totaux, les activités antioxydantes ont contribué significativement à la formation de l'axe Dim 1 alors que seuls les polyphénols totaux ont contribué significativement à l'axe Dim 2 (Figure 41B). Au bout de 24h de conservation, une corrélation positive a été enregistrée entre l'activité antioxydante (FRAP) et les phénols totaux et flavonoïdes totaux avec $r = 0,761$ et $r = 0,610$ respectivement en revanche l'activité antioxydante (DPPH) a été positivement corrélée aux tanins totaux ($r = 0,967$) et négativement corrélée aux flavonoïdes totaux avec pour coefficient de corrélation $r = -0,936$ (Tableau XVI).

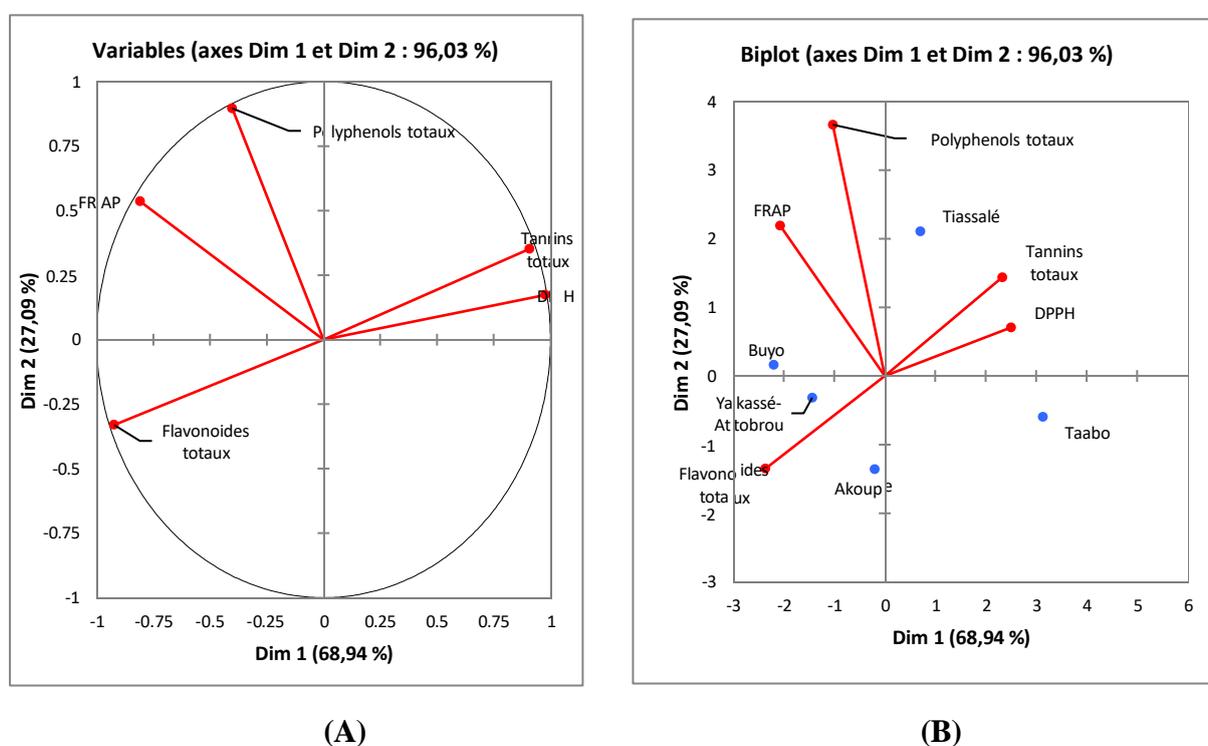


Figure 41 : Projection des variables initiales (paramètres phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 24 h de conservation

Tableau XV : Valeurs propres et variances expliquées des axes principaux à 24 h de conservation

	F1	F2
Valeur propre	3,447	1,355
Variabilité (%)	68,937	27,094
% cumulé	68,937	96,031

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XVI: Corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en composés phénoliques à 24 h de conservation.

	FRAP	DPPH
Polyphénols totaux	0,761**	-0,307
Flavonoïdes totaux	0,610*	-0,936**
Tannins totaux	-0,491	0,967**

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (unilatéral).

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (unilatéral).

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

A 48 h de conservation, l'ACP a montré à la figure 42A que les deux axes Dim 1 et Dim 2 axes ont expliqué 88,34 % de la variabilité totale avec 63,84 % pour Dim 1 pour une valeur propre de 3,192 et 24,50 % pour Dim 2 pour une valeur propre de 1,225 (Tableau XVII). Les flavonoïdes totaux, les tanins totaux, les activités antioxydantes ont contribué significativement à la formation de l'axe Dim 1 et la formation de l'axe Dim 2 était principalement due aux seuls les polyphénols totaux (Figure 42B). Le tableau XVIII présente les coefficients corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes à 48h de conservation. Il ressort de ce tableau XVIII que de façon générale, l'activité antioxydante (FRAP) est positivement corrélé aux flavonoïdes totaux ($r=0,678$) et négativement aux phénols totaux ($r=-0,867$) tandis que l'activité antioxydante évaluée par la méthode DPPH le contraire était observée. La corrélation entre l'activité antioxydante (DPPH) et les phénols totaux était positive ($r = 0,545$) et négative avec les flavonoïdes totaux ($r = -0,867$).

RESULTATS ET DISCUSSION

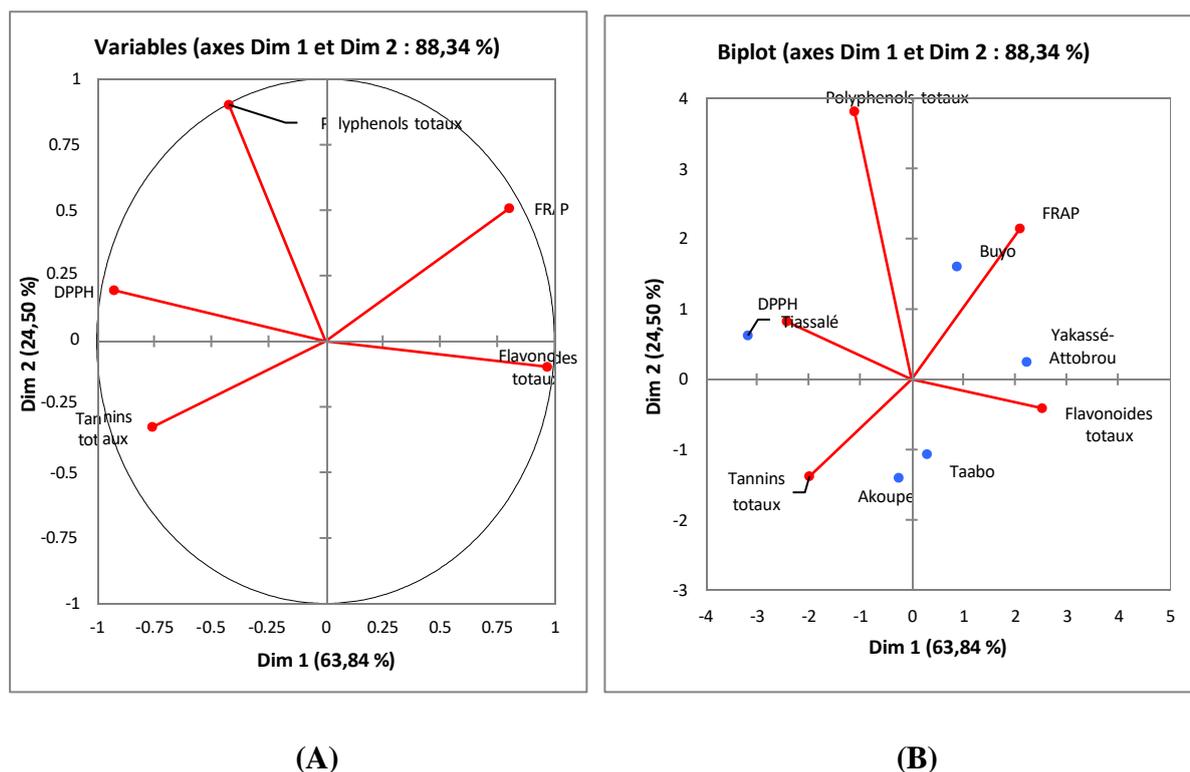


Figure 42 : Projection des variables initiales (paramètres phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 48 h de conservation

Tableau XVII : Valeurs propres et variances expliquées des axes principaux à 48 h de conservation

	F1	F2
Valeur propre	3,192	1,225
Variabilité (%)	63,838	24,503
% cumulé	63,838	88,342

Tableau XVIII : Corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en composés phénoliques à 48 h de conservation.

	FRAP	DPPH
Polyphénols totaux	-0,847**	0,545*
Flavonoïdes totaux	0,678*	-0,867**
Tannins totaux	0,370	-0,009

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (unilatéral).

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (unilatéral).

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

RESULTATS ET DISCUSSION

En fin de conservation (72h), les deux axes Dim 1 et Dim 2 axes générés par l'ACP (figure 43A) ont exprimé 81,74 % de la variabilité totale avec 61,79 % pour Dim 1 pour une valeur propre de 3,089 et 19,95 % pour Dim 2 pour une valeur propre de 0,997 (Tableau XIX). A l'instar des autres temps de conservation, les flavonoïdes totaux, les tanins totaux, les activités antioxydantes ont contribué majoritairement à la formation de l'axe Dim 1 et la formation de l'axe Dim 2 était le fait seul des polyphénols totaux (Figure 43B). En fin de conservation (72 h), le pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux (FRAP) était positivement corrélé aux flavonoïdes totaux ($r = 0,705$) et aux tanins totaux ($r = 0,759$). En revanche, avec l'activité antiradicalaire (DPPH), l'analyse a montré une corrélation positive avec les phénols totaux avec $r = 0,549$ et une corrélation négative avec les flavonoïdes totaux où $r = -0,732$ (Tableau XX).

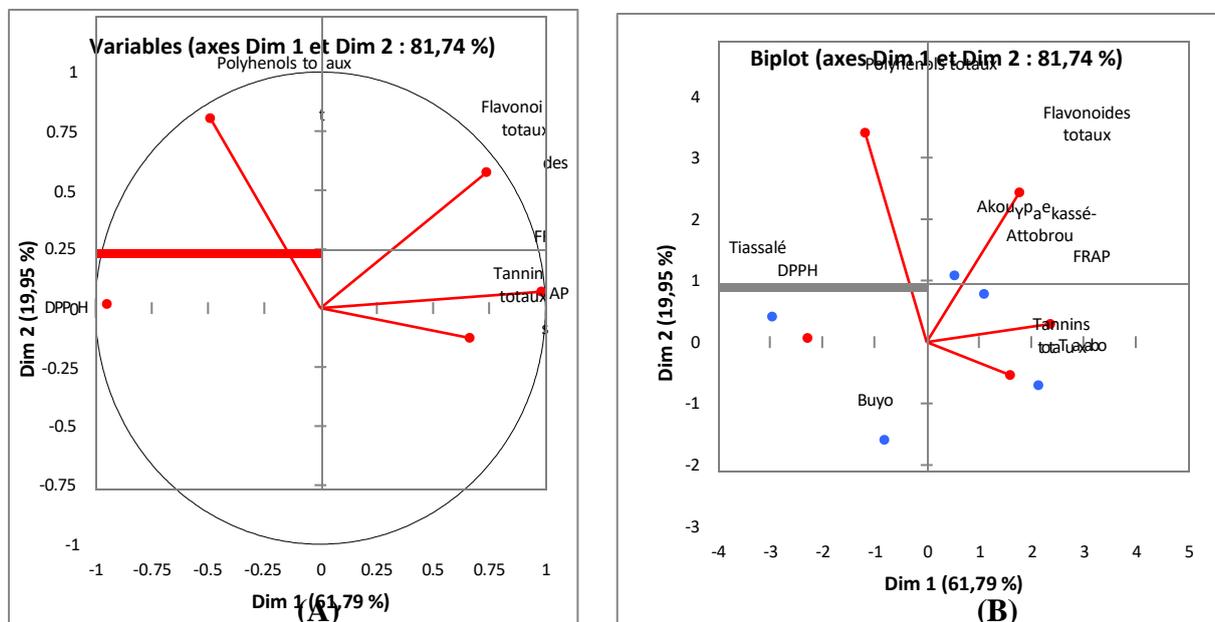


Figure 43 : Projection des variables initiales (paramètres phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 72 h de conservation

Tableau XIX : Valeurs propres et variances expliquées des axes principaux à 72 h de conservation

	F1	F2
Valeur propre	3,089	0,997
Variabilité (%)	61,788	19,947
% cumulé	61,788	81,735

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XX : Corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en composés phénoliques en fin de conservation (72h).

	FRAP	DPPH
Phénols totaux	-0,366	0,549*
Flavonoïdes totaux	0,705*	-0,753**
Tannins totaux	0,759**	-0,420

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (unilatéral).

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (unilatéral).

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

1-9- Analyse en composantes principales et classification hiérarchique ascendante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation

L'analyse en composantes principales et celle de la classification hiérarchique ascendante des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation spontanée ont permis de réduire les vingt variables mesurées à quatre composantes principales virtuelles (Dim 1, Dim2, Dim 3, Dim 4) dont Dim 1 et Dim 2 permet d'expliquer 79,17 ; 91,36 ; 83,53 et 80,71 % de la variation totale respectivement à 0 h ; 24 h ; 48 h et 72 h de conservation. Pour la classification hiérarchique ascendante l'intensité de la corrélation de la variable à l'axe est fonction de la couleur. Ainsi, par exemple, plus la couleur bleue est foncée, plus le coefficient de corrélation est élevé.

1-9-1-En début de conservation (0 h)

En début de conservation (0 h), ce sont les phénols totaux, tanins totaux, extrait sec, humidité, valeur énergétique, acide ascorbique, acide tartrique, acide citrique, acide tannique, acide acétique et l'acide lactique sont corrélés à l'axe Dim1 tandis que les flavonoïdes totaux, DPPH, cendres, glucides totaux, cobalamine sont corrélés à l'axe Dim 2 (Figure 40) avec des coefficients de corrélation compris entre 0,68 et 0,97. Ainsi, en début de conservation, les échantillons ont été regroupés en 3 lots : les échantillons de Tiassalé et Akoupé sont similaires, ceux Buyo et Yakassé-Attobrou sont aussi similaires et le dernier groupe est constitué de l'échantillon de Taabo (Figure 45).

RESULTATS ET DISCUSSION

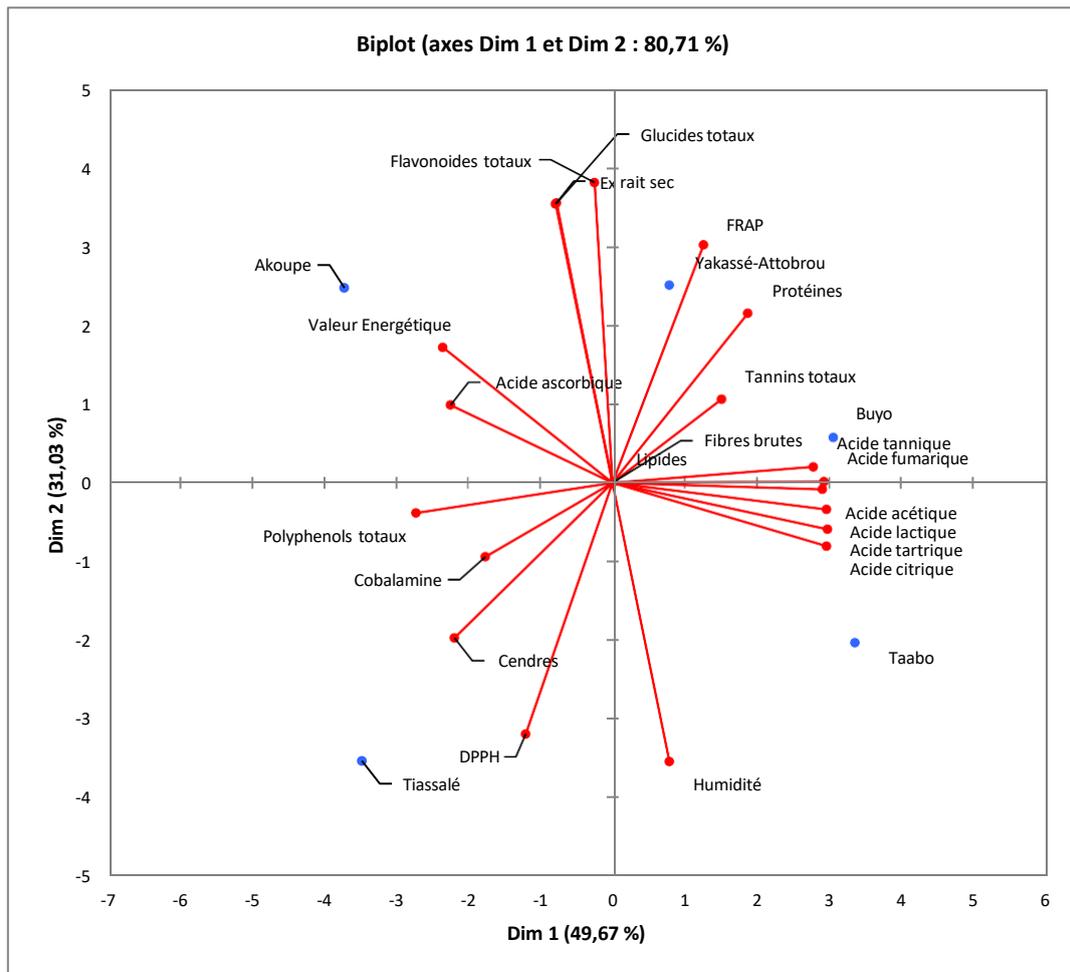


Figure 44 : Projection des variables initiales (paramètres biochimiques et phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 0h de conservation

RESULTATS ET DISCUSSION

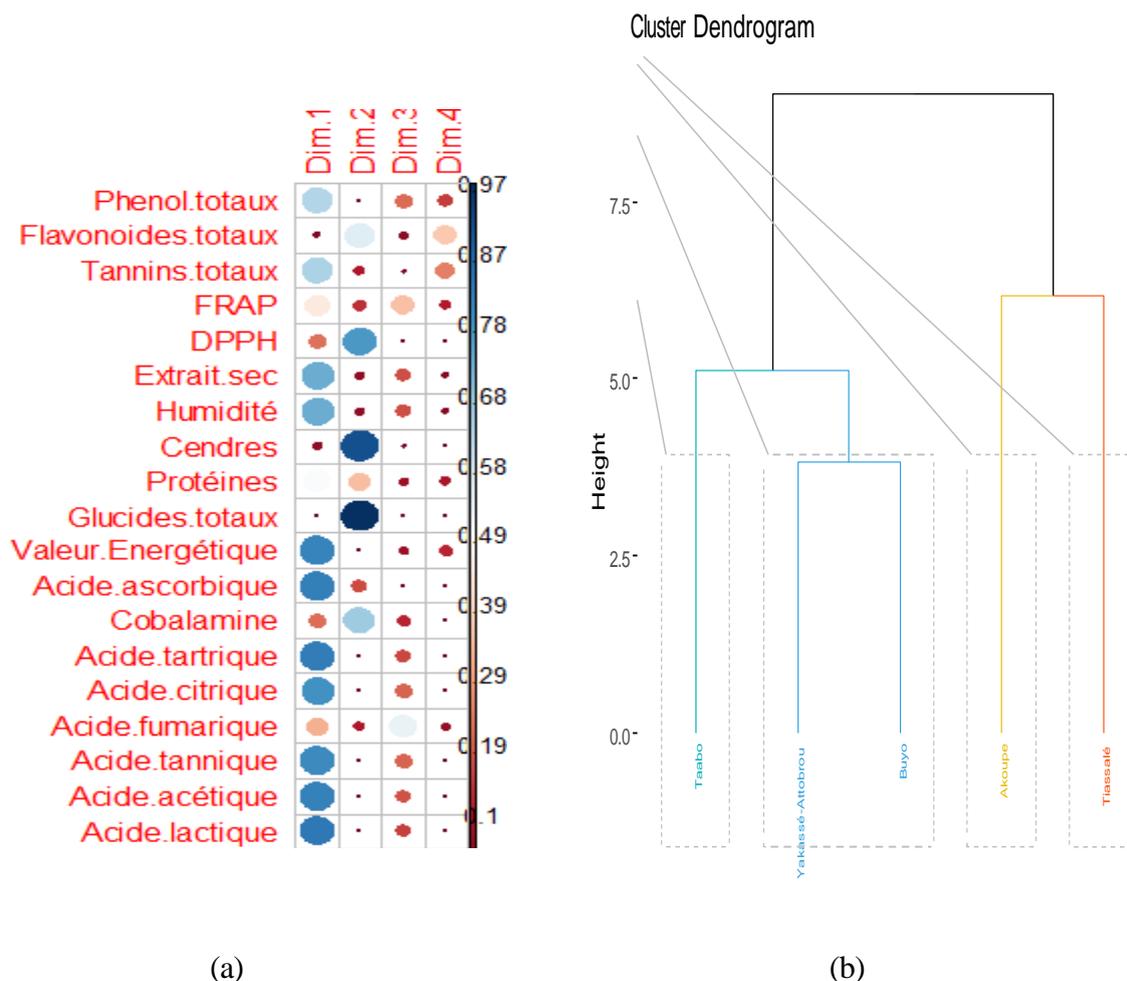


Figure 45 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendrogramme des échantillons de jus de cacao (b) en début de conservation

Dim: axe

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

1-9-2-A 24 h de conservation

A 24 h de conservation, l'axe Dim 1 est fortement corrélé aux protéines, glucides totaux, acide tartrique, acide citrique, acide fumarique, acide tannique, acide acétique, acide lactique et moyennement corrélé aux phénols totaux, acide ascorbique. Par contre l'axe Dim 2 est fortement corrélé au DPPH et moyennement aux tanins totaux, flavonoïdes totaux, cendres, humidité (Figure 46). Les coefficients de corrélation sont compris entre 0,59 et 0,99. Ainsi, les échantillons ont pu être classés en 4 groupes à savoir le groupe composé des échantillons de Buyo et Yakassé-Attobrou, les 3 autres groupes comprenant respectivement les échantillons de Akoupe, Taabo et Tiassalé (Figure 47).

RESULTATS ET DISCUSSION

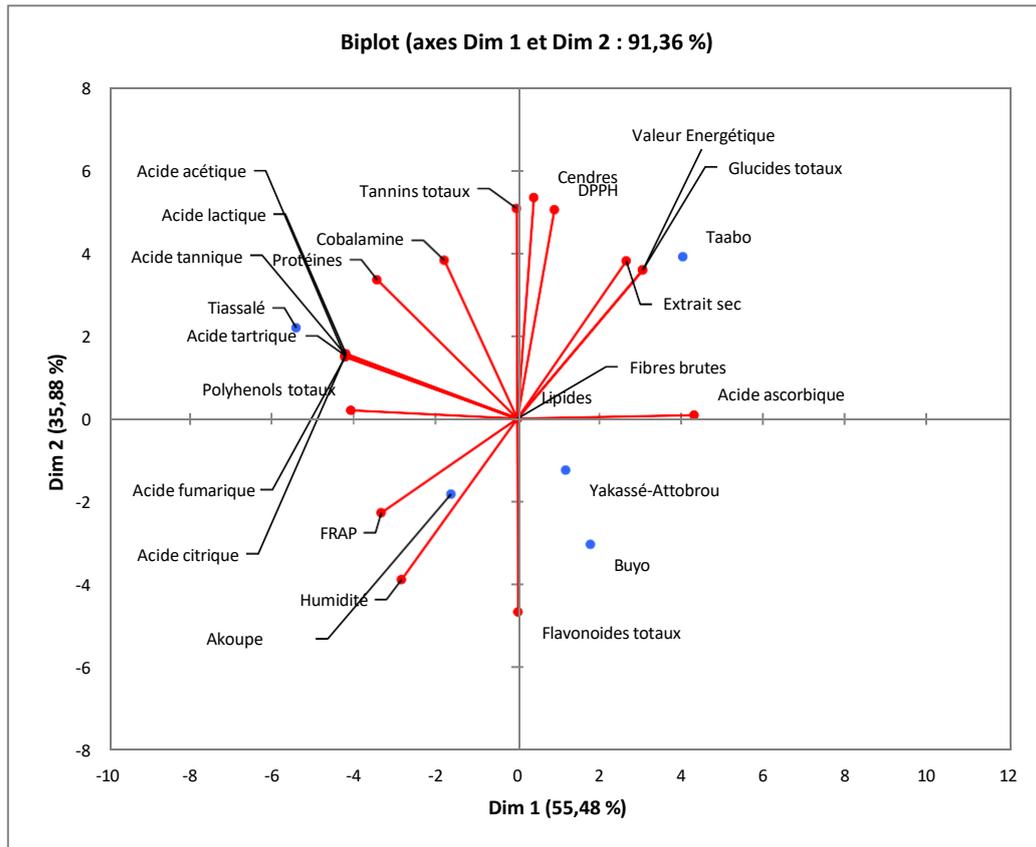


Figure 46 : Projection des variables initiales (paramètres biochimiques et phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 24 h de conservation

RESULTATS ET DISCUSSION

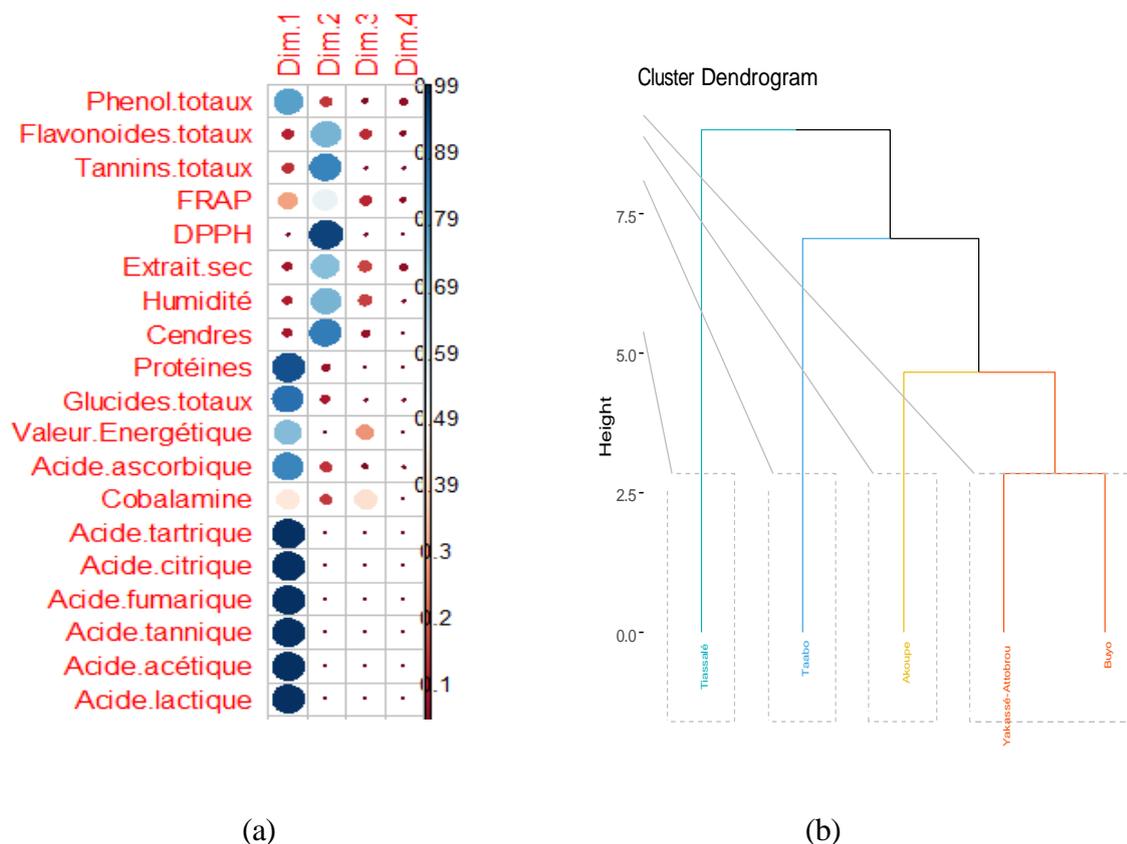


Figure 47 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendrogramme des échantillons de jus de cacao (b) à 24 h de conservation

Dim: axe

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

1-9-3-A 48h de conservation

Au bout de 48 h de conservation, les variables contribuant fortement à l'axe Dim1 étaient l'extrait sec, l'humidité, protéines, valeur énergétique, acide ascorbique, acide tartrique, acide citrique, acide tannique, acide acétique, acide lactique. Par ailleurs, les phénols totaux sont moyennement corrélés à l'axe Dim 1. Les variables, tanins totaux et cendres sont fortement corrélés à l'axe Dim 2 (Figure 48). Pour ces variables, les coefficients de corrélation étaient entre 0,59 et 0,97. Par ailleurs, le dendrogramme a montré que les échantillons de Akoupe et Yakassé étaient similaires, mais différents des autres échantillons qui eux-mêmes étaient différents les uns des autres (Figure 49).

RESULTATS ET DISCUSSION

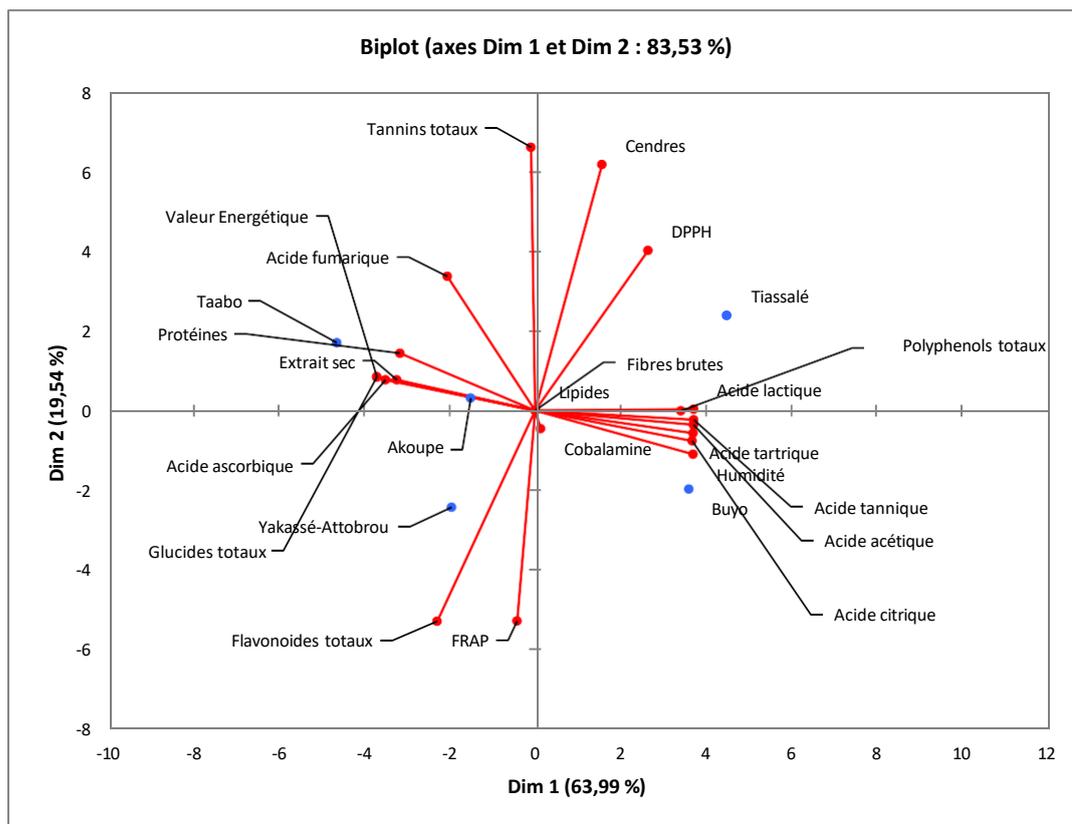


Figure 48 : Projection des variables initiales (paramètres biochimiques et phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 48 h de conservation

RESULTATS ET DISCUSSION

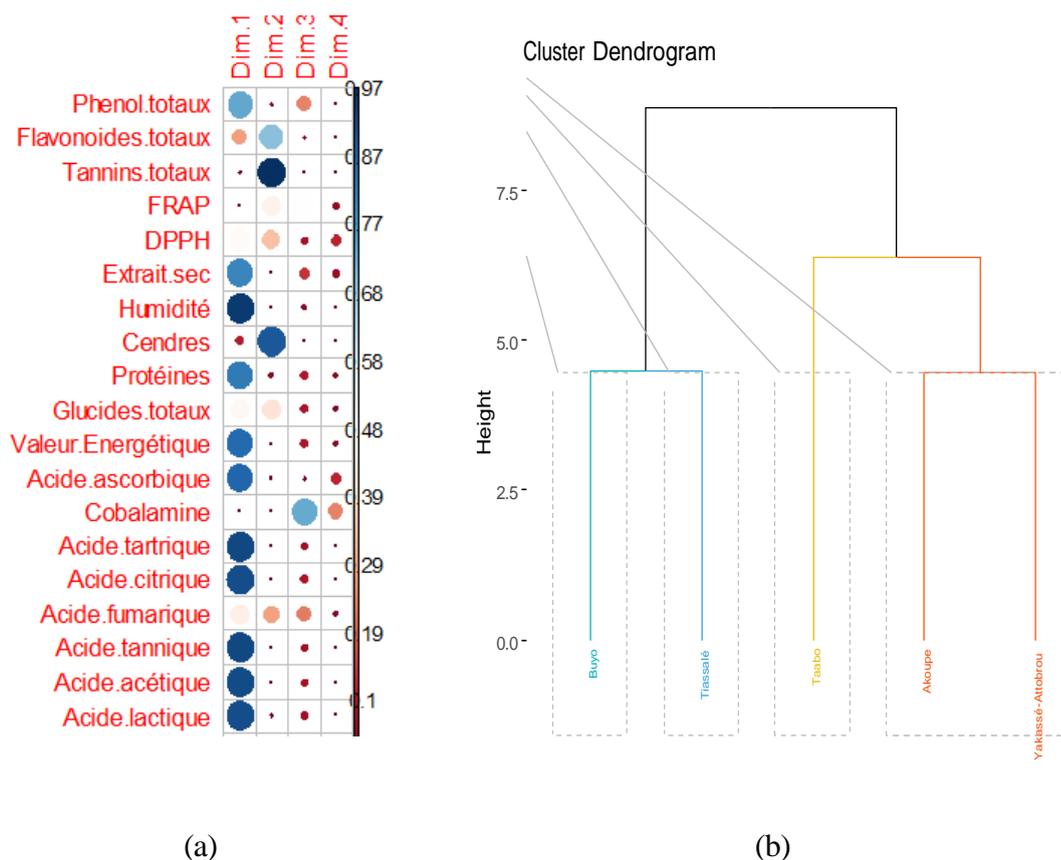


Figure 49 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendrogramme des échantillons de jus de cacao (b) au bout de 48 h de conservation

Dim: axe

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

1-9-4-En fin de conservation (72 h)

En fin de conservation (72 h), les variables contribuant fortement à l'axe Dim1 étaient les phénols totaux, acide tartrique, acide citrique, acide fumarique, acide tannique, acide acétique, acide lactique tandis que l'axe Dim 2 était fortement corrélé aux flavonoïdes totaux (Figure 50). Les coefficients de corrélation variaient entre 0,55 et 0,91. La CHA a montré que les échantillons de Taabo et Yakassé-Attobrou étaient identiques. Les échantillons de Buyo, Tiassalé et Akoupe étaient différents les uns des autres (Figure 51).

RESULTATS ET DISCUSSION

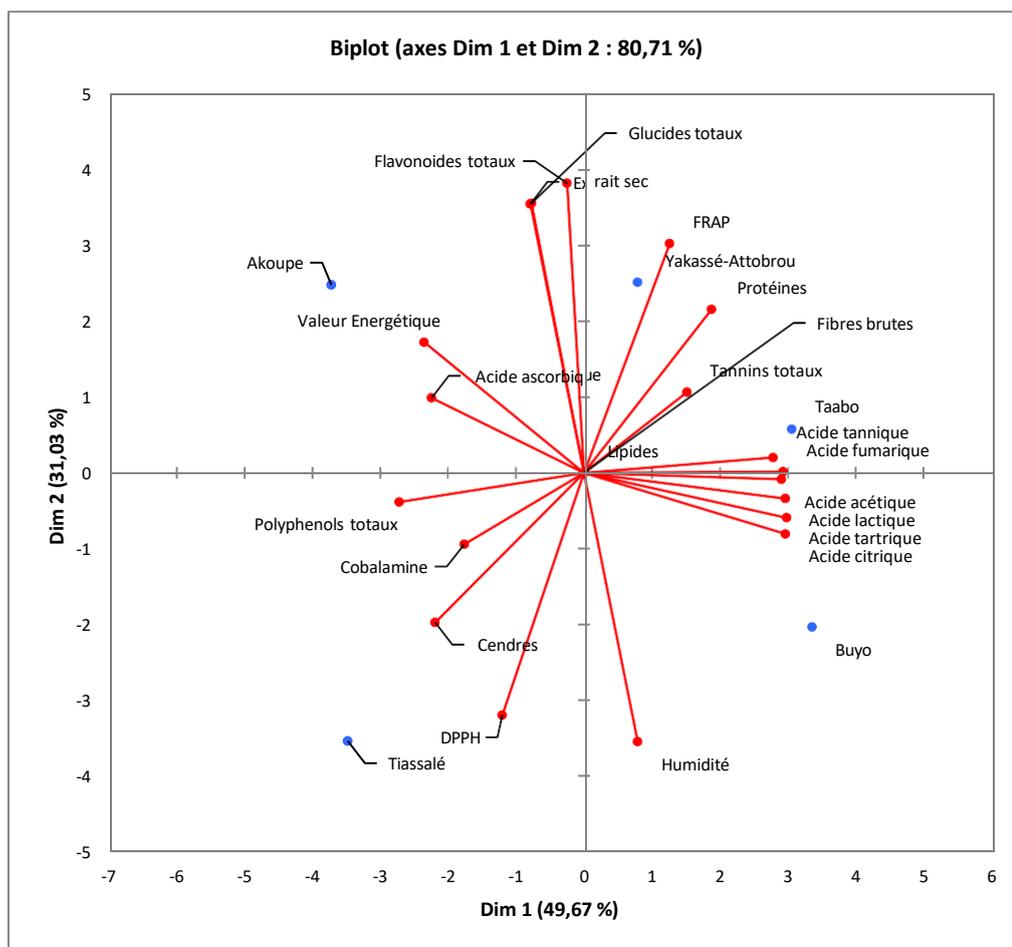
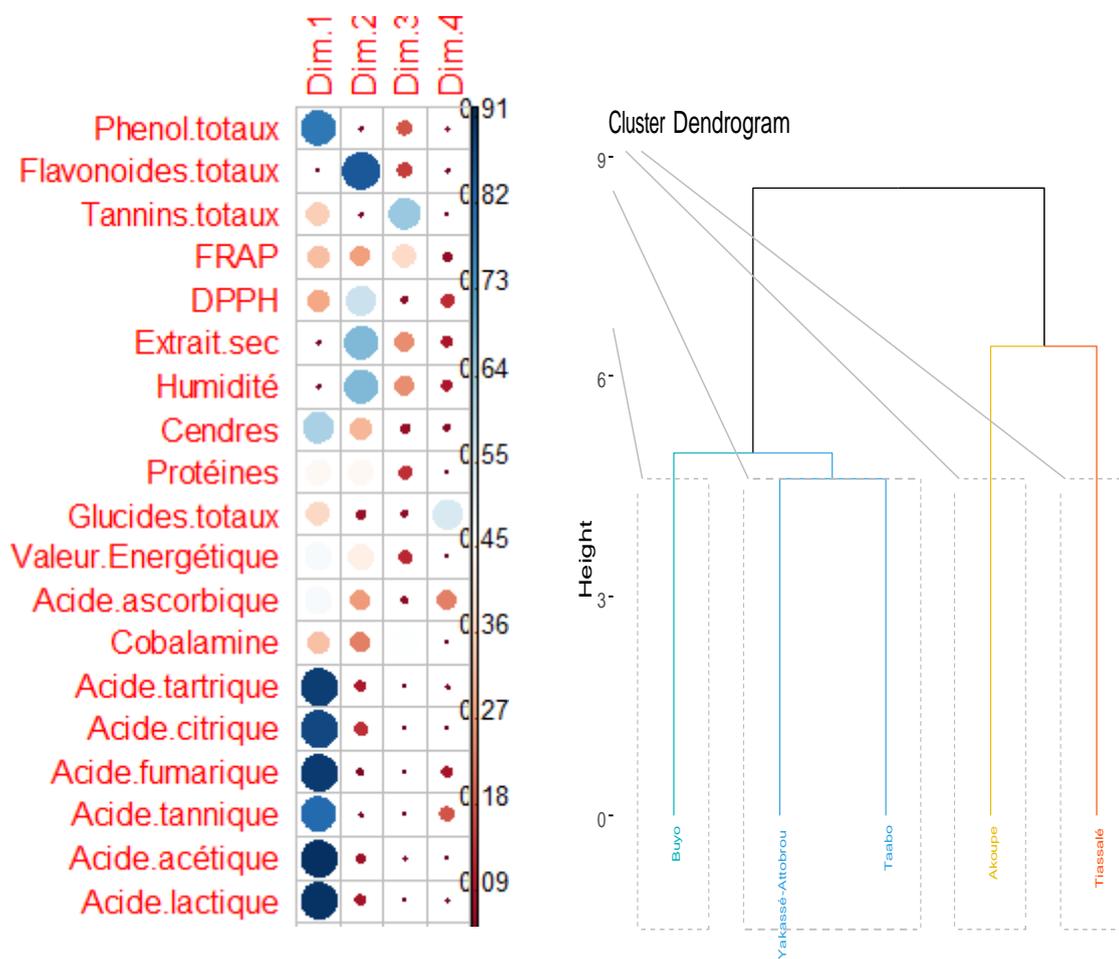


Figure 50 : Projection des variables initiales (paramètres biochimiques et phytochimiques) dans le plan formé par les axes factoriels Dim1 et Dim2 à 72h de conservation

RESULTATS ET DISCUSSION



(a)

(b)

Figure 51 : Contribution des variables (a) dans la représentation des dimensions et dendrogramme des échantillons de jus de cacao (b) en fin de conservation (72 h)

Dim: axe

DPPH :2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

RESULTATS ET DISCUSSION

2-Discussion

Le jus de mucilage de cacao, sous-produit du cacao généré lors du processus du traitement des fèves, est issu de la dégradation de la pulpe mucilagineuse enrobant les fèves par l'action pectinolytique des levures présentes dans l'environnement (Barel, 2013). Ainsi, souvent considéré comme un déchet, le jus de mucilage de cacao pourrait posséder des propriétés nutritionnelles remarquables. Une enquête a été réalisée en vue de déterminer le niveau de connaissance du jus de mucilage de cacao par les populations, sa durée maximale de conservation et les bienfaits qui lui sont attribués. Il ressort de cette enquête que le jus de mucilage de cacao est très bien connu des populations (100 %) surtout rurales avec un niveau de consommation élevée (98,8 %). Ce niveau de consommation important pourrait-être liée aux propriétés attribuées par les consommateurs (laxative, fortifiante, anti-diarrhéique). Dans leur étude sur la consommation de la bière traditionnelle de sorgho produite en Côte d'Ivoire, Aka *et al.* (2017) ont souligné que 53,4 % des personnes enquêtées ont affirmé l'avoir consommé pour ses vertus thérapeutiques. Ainsi dans notre étude 39,70 % des personnes interviewées ont attribué des propriétés laxatives au jus de mucilage de cacao et 20,44 % des propriétés fortifiantes. En outre la majorité des consommateurs préfère consommer le jus de mucilage de cacao le soir (37 %) à une fréquence de plus de 3 fois par jours (32,60 %) pour une quantité de moyenne de 3 litres (52,80 %) par jour. La durée maximale de conservation à la température ambiante du jus de mucilage de cacao était de 3 jours. En effet, les personnes interrogées affirment que le jus n'est plus agréable à la consommation au-delà de 3 jours à cause de l'alcool présent. Cette présence d'alcool associée à l'acidité du jus est due à une fermentation alcoolique spontanée déclenchée par les levures présentes sur le matériel de traitement des fèves et dans l'environnement (Koffi *et al.*, 2013). Ainsi, l'analyse nutritionnelle et fonctionnelle du jus de mucilage de cacao au cours de la conservation a été réalisée durant 3 jours.

L'évaluation des paramètres biochimiques et fonctionnels des jus de mucilage de cacao a montré de façon générale une variation de ces paramètres. Les variations des teneurs en cendres, en protéines, en glucides totaux pourraient être le fait de l'activité métabolique des différents microorganismes présents naturellement dans le jus. En effet, selon Barel (2103), les levures présentes dans le jus de mucilage métabolisent les sucres contenus dans le jus pour de l'éthanol entraînant ainsi des variations de la concentration en sucres. Aussi, les variations des teneurs en glucides totaux et protéines pourraient être liées aux activités des enzymes telles les amylases ou glucosidases qui dégradent l'amidon contenu dans le jus ou des protéases qui elles vont dégrader les protéines. Les valeurs des taux d'humidité de cette étude sont plus élevées

RESULTATS ET DISCUSSION

que celles rapportés par Baensch *et al.* (2000) et Anvoh (2013). Par contre les teneurs en protéines et en acide ascorbique sont plus importantes dans les échantillons de ces auteurs que de celles de l'étude que nous avons effectué. Par ailleurs la présence de vitamines telles que l'acide ascorbique et la cobalamine dans les jus de cette étude pourrait lui conférer la propriété fortifiante que lui attribuent les consommateurs. Aussi, la teneur en cendres dans le jus de mucilage de cacao pourrait suggérer la présence de minéraux ce qui fait de lui un aliment d'une grande importance nutritionnelle. En effet, les minéraux font partir de la grande famille des micronutriments. Certes, ils ne fournissent pas de calories, mais ils jouent un rôle important dans les processus métaboliques du corps humain. La consommation accrue d'aliments qui en contiennent peut améliorer la régulation minérale et réduire les risques de maladies cardiovasculaires et certains risques de cancers (Ismail *et al.*, 2011). Dans le monde il est estimé à deux (2) milliards le nombre de personnes souffrant de malnutrition liée aux micronutriments (Johns *et al.*, 2006). Les femmes enceintes et celles qui allaitent, ainsi que les jeunes enfants sont les premières victimes des carences, car leurs besoins en vitamines et en minéraux sont plus importants. Ils souffrent donc davantage des conséquences préjudiciables de ces carences (Black *et al.*, 2003). Par ailleurs, les concentrations élevées en Acide citrique et Acide tartrique déterminées dans nos jus de mucilage de cacao sont conformes à ceux trouvés par Schwan, (1998) ; Ardhana & Fleet, (2003). En effet, ces auteurs ont indiqué que l'acide citrique se trouvait à des teneurs élevées dans le jus de mucilage de cacao.

Aussi, les vertus thérapeutiques du jus de mucilage de cacao pourraient-elles être liées à la présence de composés phénoliques au niveau des fèves et du mucilage. En effet, le cacao est très riche en polyphénols (Lei *et al.*, 2003). De plus, Bloch (2014) a souligné que le cacao ivoirien était le 3^e au rang des cacaos les plus riches en composés phénoliques. Par ailleurs, Martin et Andrantsitohaina & Martin, (2002) et Hanhineva (2010) ont rapporté que les polyphénols sont en effet, capables d'abaisser la pression artérielle chez le rat, d'empêcher l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire et de stabiliser les cellules immunitaires.

Ces composés ont été décrits comme étant des antioxydants, des anti-agrégants plaquettaires, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques, des antitumoraux neuroprotecteurs, antiviral, chimio-préventive et plus de preuves indiquent que les polyphénols ont une influence sur le métabolisme lipidique et glucidique (Hanhineva, 2010).

RESULTATS ET DISCUSSION

Par ailleurs, les fluctuations observées au niveau des teneurs en composés phénoliques et en activités antioxydantes aussi bien évaluée par la méthode de DPPH que par la méthode de FRAP pourraient être dues à la variété de cacao, aux techniques culturales, à l'espace et aux facteurs environnementaux telle la pluviométrie, la température. En effet, Niemenak *et al.* (2004) ont souligné que la teneur en polyphénols du cacao au cours de la fermentation pouvait augmenter de 25 % pour certaines variétés ou diminuer de 11 à 25 % pour d'autres variétés. Aussi, l'épicatéchine qui représente le flavonoïde plus important quantitativement est à l'origine de nombreuses propriétés biologiques des aliments qui les contiennent. C'est un composé actif qui a des propriétés anti-cancéreuses. Des études ont démontré l'inhibition du développement et de la progression du cancer de la prostate dans un modèle de souris transgénique, augmentant ainsi leur survie. L'épicatéchine améliore la relaxation des vaisseaux sanguins de manière comparable à ce que fait un médicament comme l'aspirine. Sa consommation est potentiellement cardioprotectrice (Mounjouenpou, 2008). Par ailleurs, les tanins contiennent 6 % de polyhydroxyphénol. C'est un composé organique qui inhibe le développement des bactéries buccales (Mounjouenpou, 2008).

Dans cette étude, les jus de mucilage étaient issus de plusieurs variétés confondues d'où l'expression "tout venant" dans le jargon de la cacao culture. En outre, l'analyse générale des jus de mucilage de cacao des 5 zones échantillons au cours de la conservation a montré que les jus pouvaient présenter à la fois des caractéristiques identiques et différentes au cours de la conservation.

Le caractère laxatif du jus de mucilage de cacao attribué par les consommateurs pourrait être dû aux polyphénols. En effet, Les polyphénols ont été rapportés comme des composés améliorant la digestion (Gary, 2013 ; Tarko *et al.*, 2013). Dès lors la propriété laxative du jus de mucilage de cacao serait plus dûe au fait des composés phénoliques.

Aussi, les variations des teneurs des paramètres biochimiques, nutritionnels et fonctionnels seraient largement liées à l'action des micro-organismes particulièrement fermentaires naturellement présents dans le jus. En effet, Koffi *et al.* (2013) ont rapporté la présence de levures et moisissures, de bactéries acétiques et lactiques, de *Bacillus* impliquées dans le processus de fermentation des fèves de cacao en Côte d'Ivoire. Ainsi, les fluctuations observées au niveau des acides organiques, des composés phénoliques pourraient être causées par ces microorganismes. En effet, les levures produiraient de l'alcool par transformation des sucres présents dans le jus, tout comme les bactéries acétiques et lactiques qui produiraient principalement de l'acide acétique et l'acide lactique respectivement. Par ailleurs, Macheix *et*

RESULTATS ET DISCUSSION

al. (2005) ont souligné que les levures étaient capables d'utiliser les composés pour leur croissance.

Ainsi, ces levures vont concentrer l'essentiel de la suite de notre recherche qui constituera la deuxième partie de notre étude. Cette partie sera consacrée aux propriétés biotechnologiques des levures présentes dans le jus de mucilage de cacao.

Conclusion partielle

L'étude de l'état de connaissance sur le jus de mucilage de cacao a révélé que :

- **Le jus de mucilage de cacao est bien connu des populations** selon la totalité des personnes interviewées (100%) pour l'ensemble des localités ;
- **Le jus de mucilage de cacao peut se conserver sur une durée maximale de 3 jours**
Les proportions du temps de conservation de 3 jours étaient de 51%, 50%, 52%, 48% et 51% respectivement pour les localités de Akoupé, Tiassalé, Yakassé-Attobrou, Taabo et Buyo.
- **Le jus de mucilage de cacao possède des vertus bienfaitrices particulièrement laxative, fortifiante.** L'effet le plus ressenti est laxatif. Les taux sont 42%, 39%, 41%, 37% et 34% respectivement pour les localités de Akoupé, Tiassalé, Yakassé-Attobrou, Taabo et Buyo ;
- **Une évolution irrégulière de tous les paramètres analysés est observée et ce quel que soit le jus ;**
- **les jus de mucilage de cacao avaient des teneurs importantes en composés phénoliques ainsi que des activités antioxydantes.**

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE II : ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOTECHNOLOGIQUES DES LEVURES DU JUS DE MUCILAGE DE CACAO EN FERMENTATION

1-Résultats

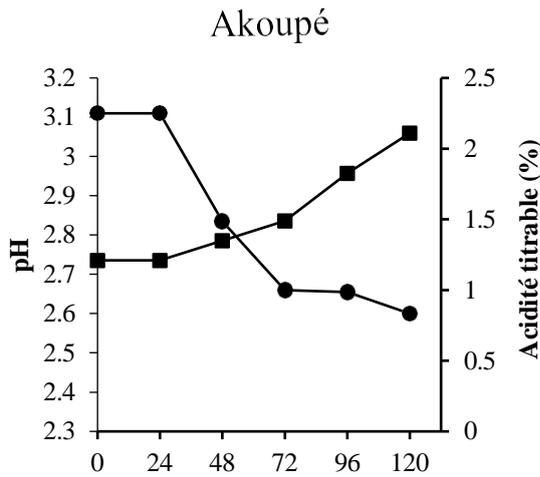
A la suite de la précédente partie, les propriétés biotechnologiques des levures résistantes à l'éthanol et/ou productrice de pectinase ont été isolées du jus de mucilage en fermentation et identifiées.

1-1- Évolution des paramètres chimiques et microbiologiques (levures) du jus de mucilage au cours de la fermentation spontanée du jus de mucilage de cacao

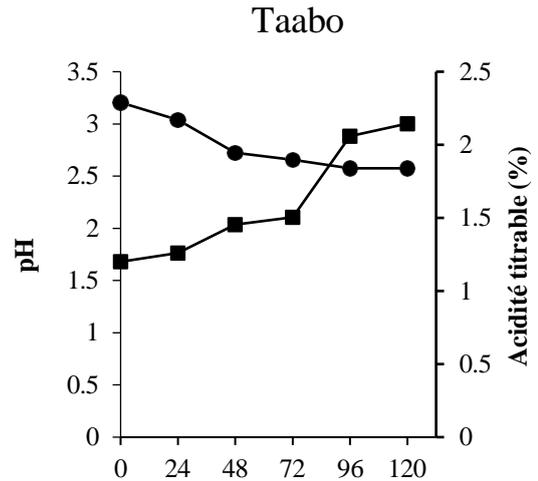
1-1-1-Évolution du pH et de l'acidité titrable (AT)

Les variations du pH et de l'acidité titrable au cours de la fermentation du jus de mucilage de cacao sont indiquées dans la figure 48. Ces deux paramètres ont été liés. En effet, l'augmentation des valeurs de pH était liée à la diminution de celles de l'acidité titrable et vice versa. Les valeurs de pH et d'acidité titrable ont permis de classer les échantillons en 2 groupes selon les phases observées au cours de la fermentation. Le premier groupe était composé des échantillons Akoupé, Yakassé-Attobrou et Tiassalé. Ces échantillons ont été caractérisés par une phase unique décroissante des valeurs de pH et une phase unique croissante des valeurs de l'acidité titrable tout au long de la fermentation. Ces valeurs sont passées de $3,11\pm 0,00$ à $2,6\pm 0,00$; de $3,20\pm 0,00$ à $2,57\pm 0,00$ et de $3,01\pm 0,00$ à $2,21\pm 0,00$ respectivement pour les échantillons Akoupé, Yakassé-Attobrou et Tiassalé. A l'opposé, les valeurs d'acidité titrable ont augmenté au cours de la fermentation. Ces valeurs étaient comprises entre $1,21\pm 0,01$ et $2,11\pm 0,01\%$; $1,2\pm 0,0$ et $2,14\pm 0,02\%$ et $0,9\pm 0,0$ et $1,3\pm 0,0\%$ respectivement pour les échantillons Akoupé, Yakassé-Attobrou et Tiassalé. Le deuxième groupe comprenait les échantillons Tiassalé et Buyo. L'évolution des valeurs de pH et d'acidité titrable était marquée par 2 phases. Une première phase caractérisée par une augmentation du pH et une baisse de l'acidité titrable et une deuxième phase marquée par une diminution des valeurs de pH et une augmentation de celles de l'acidité titrable. Les valeurs de pH ont augmenté de $3,93\pm 0,0$ à $3,99\pm 0,0$ et de $3,64\pm 0,0$ à $4,27\pm 0,0$ tandis que celles de l'acidité titrable ont diminué de $1,51\pm 0,01$ à $0,83\pm 0,02\%$ et de $1,39\pm 0,24$ à $1,03\pm 0,06\%$ respectivement pour les échantillons Tiassalé et Buyo en fin de fermentation. Par ailleurs les écart-types n'apparaissent pas sur les graphiques car leurs valeurs sont très faibles.

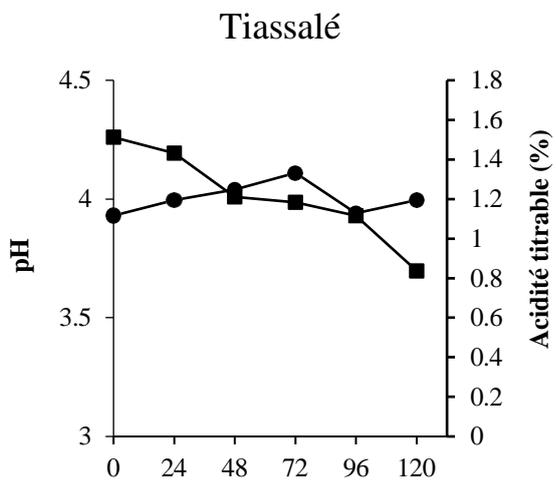
RESULTATS ET DISCUSSION



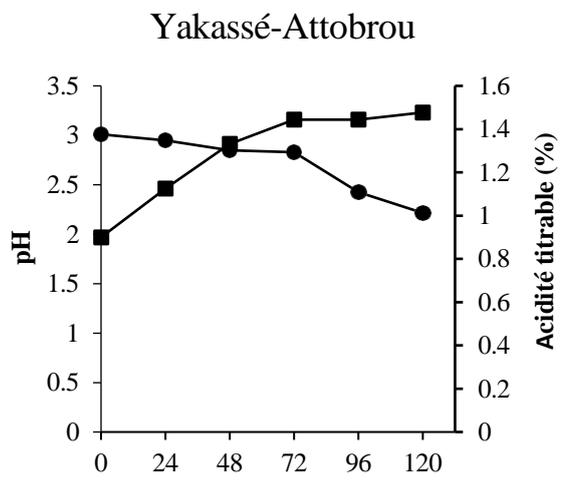
Durée de fermentation (heures)



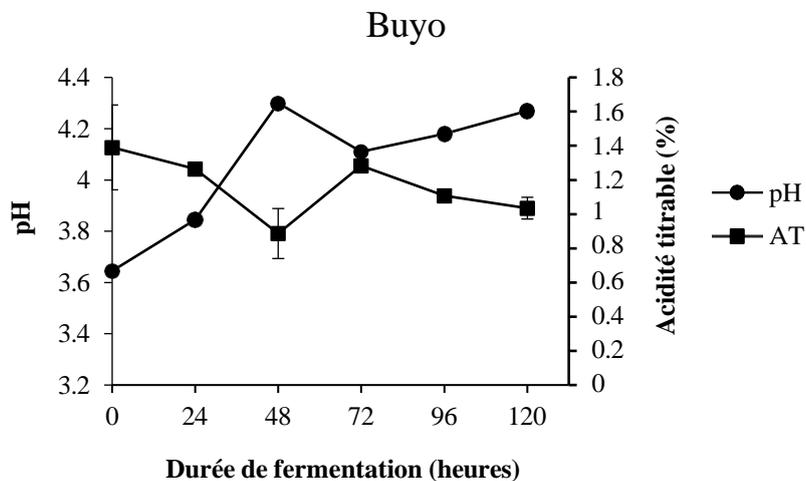
Durée de fermentation (heures)



Durée de fermentation (heures)



Durée de fermentation (heures)



Durée de fermentation (heures)

Figure 52 : Évolution du pH et de l'acidité titrable au cours de la fermentation des jus de mucilage de cacao

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1-1-2- Évolution de la charge levurienne, de l'ESR et du taux d'éthanol au cours de fermentation spontanée du jus de mucilage de cacao

L'évolution des valeurs de la charge microbienne, de l'ESR et du taux l'éthanol observés pendant la fermentation sont présentés dans la figure 49. Tous les échantillons ont présenté des similitudes et des différences. Les similitudes dans l'évolution de ces paramètres ont été observées au niveau des ESR et de l'éthanol et la différence a été enregistrée au niveau de la charge microbienne. Pour tous les échantillons, les valeurs de l'ESR ont diminué alors que les teneurs en éthanol ont augmenté. Ainsi, les valeurs de l'ESR ont diminué de $12,6\pm 0,1$ à $7,6\pm 0$; de $12,6\pm 0$ à $7,8\pm 0$; de $12,4\pm 0$ à 7 ± 0 ; de $13,2\pm 0,14$ à $1,6\pm 0$ et de $13,1\pm 0,14$ à 2 ± 0 respectivement pour les échantillons Akoupé, Yakassé-Attobrou, Tiassalé, Taabo et Buyo. Les teneurs en éthanol pendant la fermentation ont augmenté de 3,46 à 9,83 % dans les échantillons Akoupe, de 1,67 % à 8,74 % dans les échantillons Yakasse-Attobrou, de 1,24% à 7,21% dans les échantillons Tiassalé, de 1,6 % à 5,03 % dans les échantillons Taabo et de 0,84 % à 5,14 % dans les échantillons Buyo.

En fin de fermentation, les teneurs en éthanol les plus élevées ont été enregistrées dans les échantillons d'Akoupé, de Yakassé-Attobrou et de Tiassalé avec respectivement 9,83% ; 8,74 % et 7,21 %. La différence entre les échantillons a été observée au niveau de la charge microbienne pendant la fermentation. Les échantillons Taabo et Buyo ont été caractérisés par une croissance microbienne continue pendant la fermentation complète. La charge microbienne était comprise entre $8,99\pm 0,04$ et $19,44\pm 0,2$ log (UFC/mL) dans les échantillons de Buyo et entre $7,39\pm 0,11$ et $19,48\pm 0,01$ log (UFC/mL) dans les échantillons de Taabo. En revanche, dans les échantillons d'Akoupé, de Yakassé-Attobrou et de Tiassalé, la croissance microbienne a présenté trois phases. Premièrement, une phase exponentielle pendant les 48 heures de fermentation où les charges microbiennes ont augmenté de $11,25\pm 0,4$ à $14,21\pm 0,19$ log (UFC/mL) ; de $11,37\pm 0,06$ à $14,20\pm 0,04$ log (UFC/mL) et de $10,73\pm 0,09$ à $16,96\pm 0,06$ log (UFC/mL) pour les échantillons d'Akoupé, de Yakassé-Attobrou et de Tiassalé respectivement. La deuxième phase était une phase décroissante avec une diminution des charges microbiennes entre 48 et 72 heures de fermentation.

Lors de cette phase, les charges microbiennes ont diminué de $14,21\pm 0,19$ à $10,38\pm 0,04$ log (UFC/mL) ; de $14,20\pm 0,04$ à $10,22\pm 0,02$ log (UFC/mL) et de $16,96\pm 0,06$ à $11,27\pm 0,02$ log (UFC/mL) dans les échantillons d'Akoupé, de Yakassé-Attobrou et de Tiassalé. La dernière phase, qui s'étend de 72 heures à la fin de la fermentation (120 heures), est une phase stationnaire caractérisée par une très faible variation des valeurs des charges microbiennes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Ainsi, les charges microbiennes étaient de $10,38 \pm 0,04$ et $10,15 \pm 0,05$ log (UFC/mL) ; $10,22 \pm 0,02$ et $9,55 \pm 0,1$ log (UFC/mL) ; $11,27 \pm 0,02$ et $11,19 \pm 0,1$ log (UFC/mL) dans les échantillons d'Akoupé, de Yakassé-Attobrou et de Tiassalé respectivement. Sur la base de la teneur en éthanol, les échantillons ont pu être classés en deux groupes. Le premier groupe était représenté par les échantillons de Taabo et Buyo avec des teneurs en éthanol en dessous de 7 %. Le second groupe était caractérisé par des teneurs en éthanol supérieures à 7 % et était constitué des échantillons Akoupé, Yakassé-Attobrou et Tiassalé.

RESULTATS ET DISCUSSION

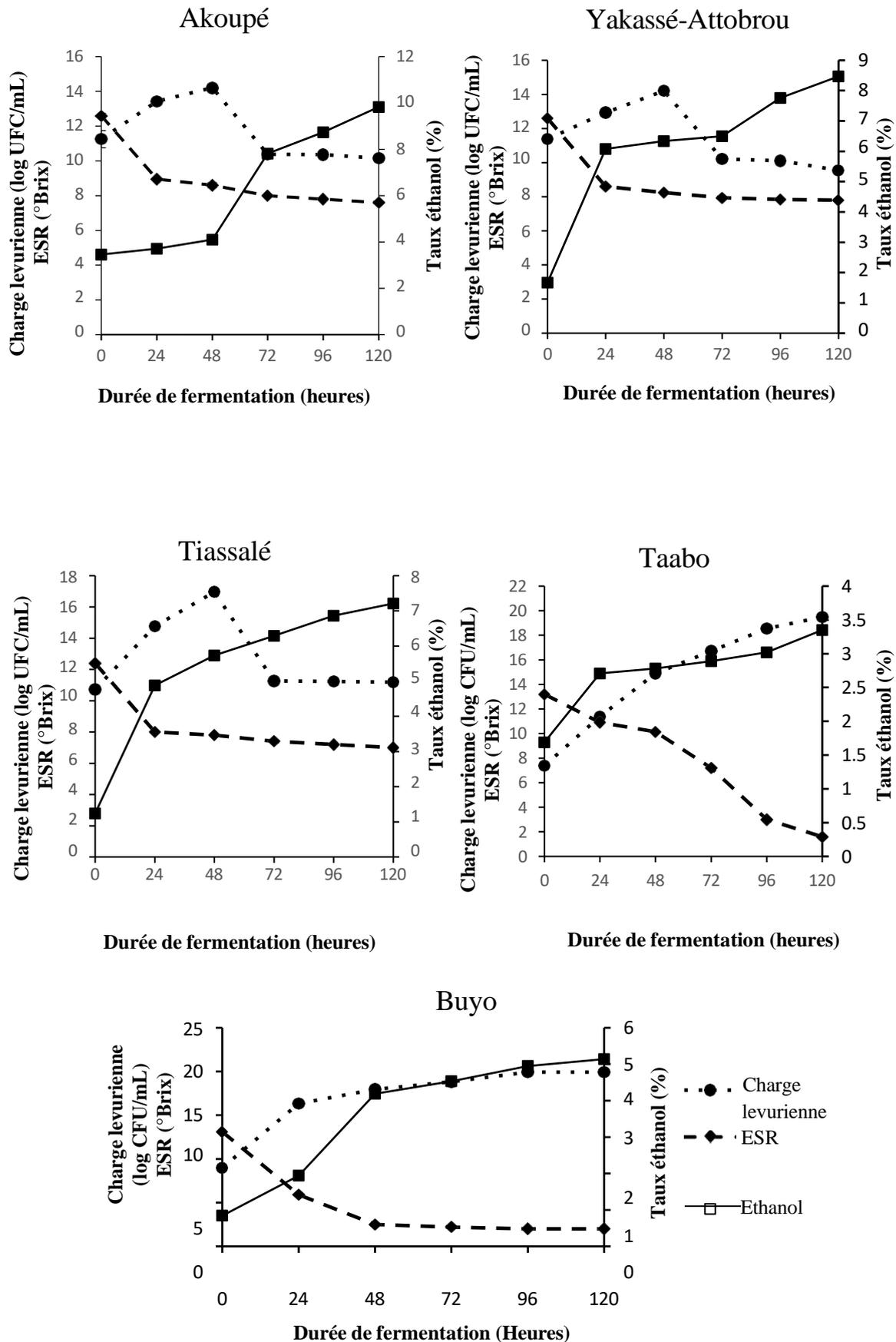


Figure 53 : Courbes de croissance (cercle), évolution de l'éthanol (carré) et de ESR (losange) au cours de la fermentation du jus de mucilage de cacao des différentes localités

RESULTATS ET DISCUSSION

1-2- Identification moléculaire des isolats des levures résistants à l'éthanol

Les isolats de levures issus des échantillons de jus de mucilage de cacao en fin de fermentation dont les taux en éthanol étaient égaux ou supérieurs à 7 % ont fait l'objet d'identification moléculaire. Ainsi, donc ce sont les isolats émanant des échantillons de Akoupé, Yakassé-Attobrou et Tiassalé qui ont fait l'objet d'identification moléculaire à raison de 8 isolats en fin de fermentation par échantillon.

Les résultats de l'identification moléculaire des levures et les numéros d'accession (OP136085-OP136108) des séquences nucléotidiques déposées dans la base de données de NCBI (National Center of Biotechnology Information) sont indiqués dans le tableau XXI et les séquences nucléotidiques sont présentées en annexe II. Le séquençage par la méthode moléculaire a permis l'identification de 5 espèces pour l'ensemble des isolats identifiées. Ces espèces étaient *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kurdiavzevii*. Les espèces *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* ont été identifiées dans les échantillons de Yakassé-Attobrou avec une proportion de 12,5 % pour *Rhodotorula mucilaginosa*, 12,5 % pour *Saccharomyces cerevisiae* et 75 % pour *Yarrowia lipolytica*. Les isolats de Akoupé comprenaient 50 % de *Rhodotorula mucilaginosa* et 50 % de *Debaromyces hansenii*. L'échantillon de Tiassalé comprenait 50 % de *Yarrowia lipolytica*, 12,5 % de *Rhodotorula mucilaginosa* et 37,5 % de *Pichia kurdiavzevii*. A l'exception des isolats provenant de Akoupé, l'espèce *Yarrowia lipolytica* a été la plus détectée dans les échantillons de Yakassé-Attobrou et Tiassalé avec respectivement 75 et 50% (Tableau XXII).

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XXI : Identification des isolats de levures des jus de mucilage de cacao

Isolat	Espèces	Numéro d'accession
YA1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	OP136085
YA2	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136086
YA3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136087
YA4	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136088
YA5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	OP136089
YA6	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136090
YA7	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136091
YA8	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136092
AK1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	OP136093
AK2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	OP136094
AK3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	OP136095
AK4	<i>Debaryomyces hansenii</i>	OP136096
AK5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	OP136097
AK6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	OP136098
AK7	<i>Debaryomyces hansenii</i>	OP136099
AK8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	OP136100
TIAS1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136101
TIAS2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	OP136102
TIAS3	<i>Pichia kudriavzevii</i>	OP136103
TIAS4	<i>Pichia kudriavzevii</i>	OP136104
TIAS5	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136105
TIAS6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	OP136106
TIAS7	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136107
TIAS8	<i>Yarrowia lipolytica</i>	OP136108

YA : Yakassé-Attobrou ; AK : Akoupé ; TIAS : Tiassalé

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XVIII : Distribution des espèces de levures identifiées

Echantillon	Espèces	Nombre d'isolats	Taux (%)
YA	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	12,5
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	12,5
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	6	75
AK	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	50
	<i>Debaromyces hansenii</i>	4	50
TIAS	<i>Yarrowia lipolytica</i>	4	50
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	12,5
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	3	37,5

YA : Yakassé-Attobrou ; AK : Akoupé ; TIAS : Tiassalé

RESULTATS ET DISCUSSION

1-3-Screening des isolats de levures producteurs de pectinases

La révélation sur gélose pectine des isolats de levures productrices de pectine a été traduite par l'apparition d'un halo blanc autour du spot de la colonie (Figure 54). Ainsi, sur les 240 isolats de départ seulement six (06) isolats se sont révélés producteurs de pectinase avec des diamètres du halo compris entre 10 et 20 mm (Figure 51). Le diamètre le plus élevé a été obtenu avec l'isolat TIAS J0-6 et le plus petit avec l'isolat TIAS J4-8.

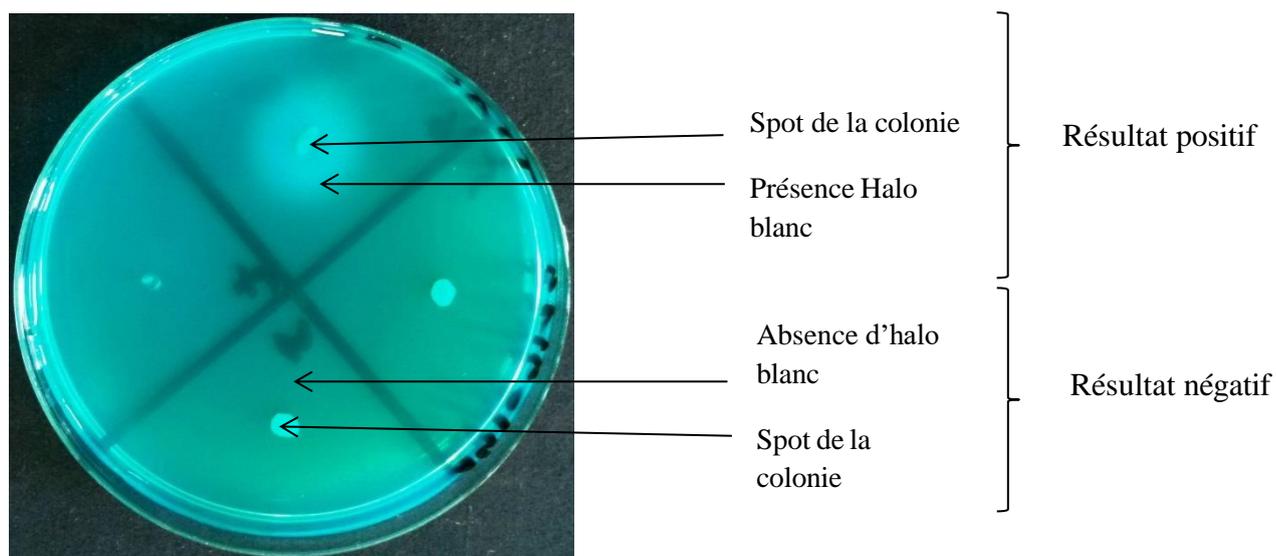


Figure 54 : Révélation sur gélose pectine de production de pectinase par l'isolat TIAS J0-6

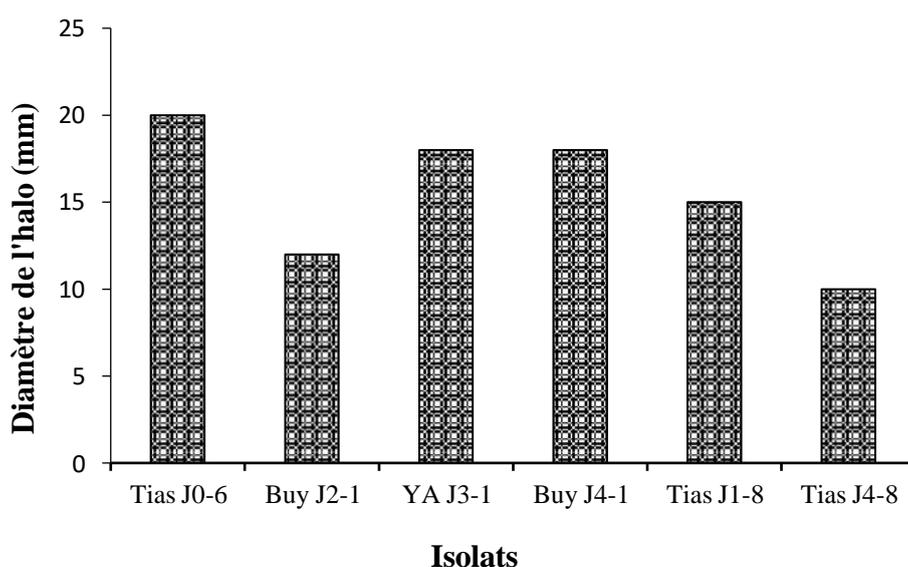


Figure 55 : Diamètre des halos des isolats

RESULTATS ET DISCUSSION

1-4- Détermination des conditions optimales de production de la pectinase par 6 isolats sélectionnés

1-4-1-Détermination du temps optimal de production de la pectinase

L'étude du temps d'incubation sur la production de pectinase par les six isolats sélectionnés a révélé que l'activité pectinolytique augmentent avec le temps de d'incubation. L'activité pectinolytique maximale a été enregistrée à 12 h d'incubation pour les tous isolats sélectionnés, à l'exception de l'isolat Buy J4-1 qui a présenté une activité pectinase maximale à 16 h d'incubation (Figure 56). Les activités pectinases maximales à 12 h d'incubation étaient de $0,209\pm 0,01$; $0,237\pm 0,002$; $0,272\pm 0,02$; $0,327\pm 0,02$; $0,322\pm 0,02$ UI/mL respectivement pour les isolats Tias J4-8 ; Tias J1-8 ; Tias J0-6 ; YA J3-1 ; Buy J2-1. En revanche, l'isolat Buy J4-1, a présenté une activité pectinolytique maximale à 16 h d'incubation avec de $0,221\pm 0,07$ UI/mL. Sur la base du temps d'incubation, les isolats Tias J0-6, YA J3-1 et Buy J2-1 ont présenté l'activité pectinase maximale par rapport aux autres isolats. De plus, l'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre ces isolats. L'activité pectinase maximale dans cette étude a été observée à 12 h d'incubation.

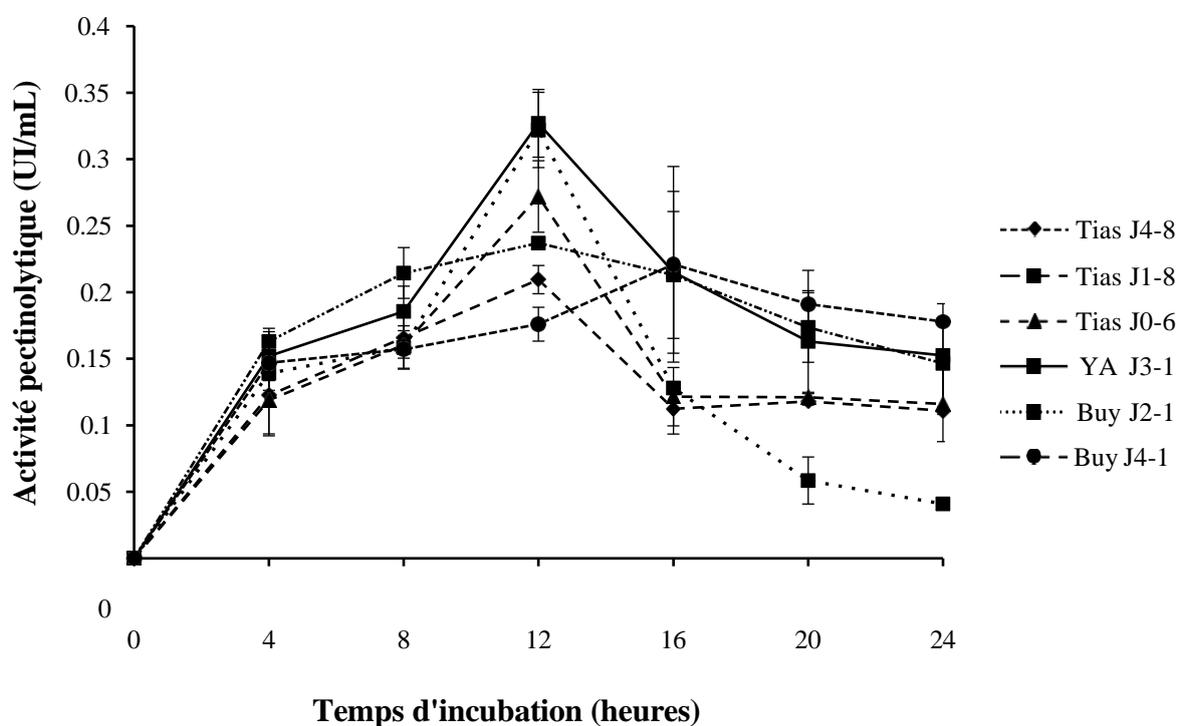


Figure 56 : Effet du temps d'incubation sur la production de pectinases par 6 isolats sélectionnés

RESULTATS ET DISCUSSION

1-4-2-Effet du pH sur la production de la pectinase

A partir de l'extrait brut, la production de pectinase par les six isolats sélectionnés a été testée en ajustant le pH du milieu liquide de pectine entre pH 5,0 et 8,0. La figure 57 illustre l'effet du pH sur la production de pectinase. Les activités pectinolytiques les plus élevées ($0,074\pm 0,005$ et $0,06\pm 0,00$ UI/mL) à pH 5,5 ont été observées avec les isolats Tias J0-6 et YA J3-1. A pH 6 l'activité pectinase maximale ($0,11\pm 0,00$ UI/mL) a été observée avec l'isolat Buy J2-1. Au pH neutre (7), l'isolat Buy J2-1 a présenté l'activité pectinase la plus élevée ($0,08\pm 0,02$ UI/mL). Les isolats Buy J1-4 et Tias J4-8 ont eu des activités pectinolytiques maximales ($0,054\pm 0,01$ et $0,076\pm 0,001$ UI/mL respectivement) à pH 8. L'isolat Tias J1-8 a eu une activité pectinase optimale ($0,045\pm 0,01$ UI/mL). En outre, l'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les isolats pour un même pH.

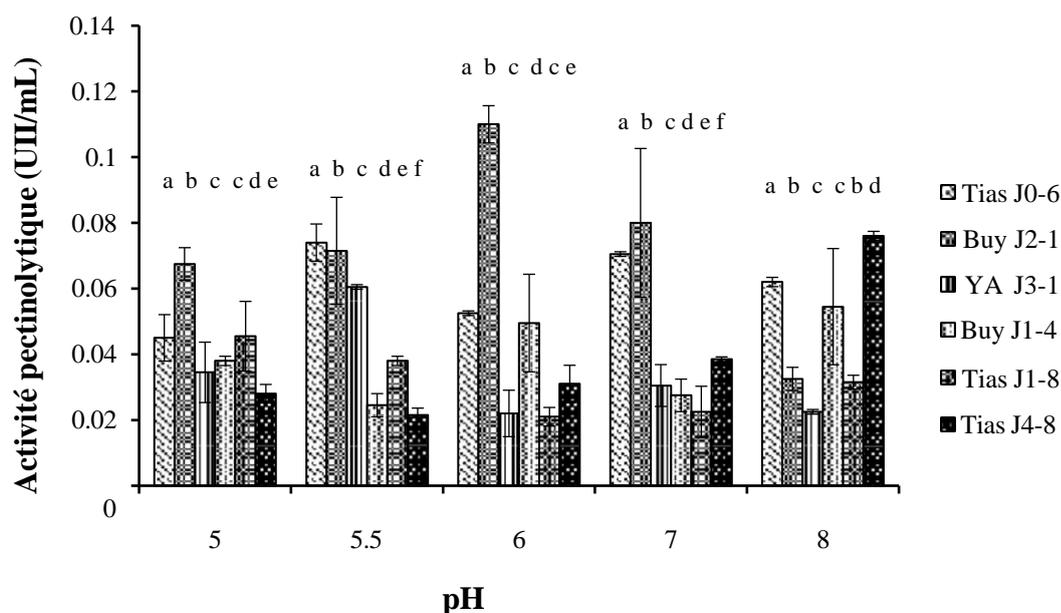


Figure 57 : Effet du pH du milieu sur la production de pectinase par 6 isolats sélectionnés

1-4-3-Effet de la température d'incubation sur la production de la pectinase

La température optimale de production de la pectinase de chaque isolat sélectionné a été mesurée en déterminant son activité à différentes températures. De manière générale, l'effet de la température d'incubation a également montré que la production de pectinase diminue avec l'augmentation de la température d'incubation. Comme le montre la figure 58, sur les cinq températures d'incubation testées (30, 40, 50, 60 et 70 °C), les activités maximales de pectinase

RESULTATS ET DISCUSSION

ont été observées à 30 et 40 °C d'incubation. L'activité de l'enzyme a nettement diminué à des températures supérieures à 40 °C. Parmi les six isolats sélectionnés, seul l'isolat Tias J0-6 présentait une activité pectinase maximale ($0,151 \pm 0,003$ UI/mL) à 40 °C. L'activité pectinase maximale des autres isolats a été obtenue à 30 °C. À cette température (30 °C), les activités enzymatiques étaient comprises entre $0,171 \pm 0,001$ et $0,124 \pm 0,002$ UI/mL. Par ailleurs, l'analyse de variance a révélé que la température d'incubation a un effet sur l'activité pectinolytique des isolats sélectionnés. Par conséquent, il apparaît des différences significatives au seuil de 5 %. Parmi les isolats sélectionnés, l'activité pectinase la plus élevée a été obtenue avec l'isolat YA J3-1 ($0,171 \pm 0,001$ UI/mL) suivi des isolats Buy J4-1 ($0,143 \pm 0,001$ UI/mL) et Tias J4-8 ($0,143 \pm 0,004$ UI/mL). Ainsi, donc ces isolats de levures productrices de pectinase ont l'objet d'identification moléculaire ce qui conduit au paragraphe suivant.

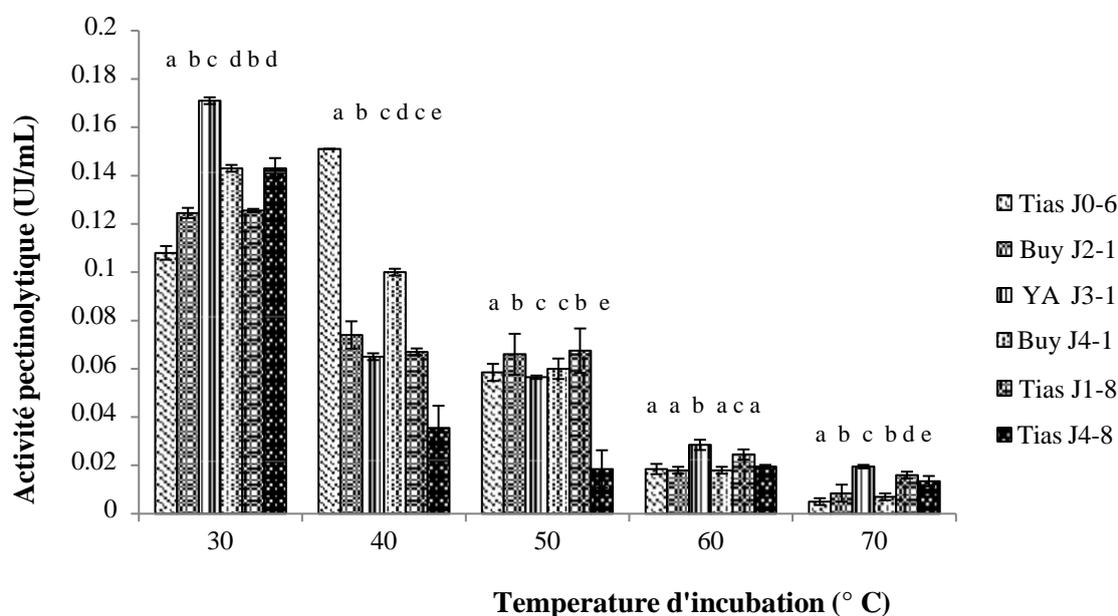


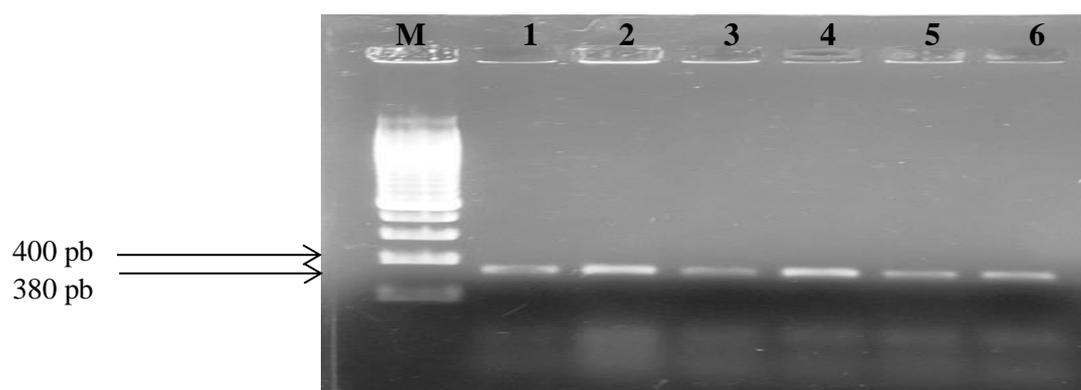
Figure 58 : Effet de la température d'incubation sur la production de pectinase par 6 isolats sélectionnés

1-5- Identification moléculaire des isolats de levures producteurs de pectinase sélectionnés

1-5-1- Amplification de la région 5.8S rDNA-ITS

L'amplification de la région 5.8S-ITS de l'ADNr après révélation par électrophorèse sur gel d'agarose a été positive pour les 6 isolats de levures productrices de pectinase sélectionnés. Les amplicons générés par les 6 isolats ont tous la même taille autour de 380 pb (Figure 59).

RESULTATS ET DISCUSSION



M : marqueur (200 pb); 1-Tias J0-6; 2-Buy J2-1. 3-YA J3-1 ; 4-Buy J4-1 ; 5-Tias J1-8; 6-Tias J4-8

Figure 59 : Produits d'amplification par les amorces ITS 1 et ITS 4 de la région 5.8S-ITS de l'ADNr des 6 isolats de levures productrices de pectinase sélectionnés

1-5-2- Caractérisation moléculaire des 6 isolats de levures productrices de pectinase sélectionnés

Le séquençage des isolats de levures sélectionnés suivi du Blast a montré que tous les isolats appartenaient à une seule et même espèce à savoir *Yarrowia lipolytica* quel que soit le site d'échantillonnage. Les séquences partielles de l'ADN de toutes les 6 souches de ont été déposées dans la base de données NCBI dont les numéros d'accession de ON202630-ON202635 sont indiqués dans le tableau XXIII. Seuls les échantillons émanant de Buyo, Tiassalé et Yakassé-Attobrou contenaient des espèces les plus productrices de pectinase. Aussi ces espèces ont été isolées durant les 4 premiers jours de la fermentation spontanée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XVIII : Identification des 6 isolats de levure sélectionnées

Group	Nucleotide sequence	Specie	Accession no
BUY J2-1	AGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGGCGCTCCCATTTGTAACCC TCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCGGCAGTACACCGCCACG AGGGGCGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCACTCATTTCCCTCCCT ATCAACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTT CACCTTTTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCACCAGTA TTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCA AACTCGACTCTTTGATAAGGCAATACATGGAGAACGGTTAG CCAGACGGGGTTGTACCCTCTATGACGTAATTCCAAGCAACT TGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAAATTACAATCCCGA GGTTTCAAATTTGAGCTTTT	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ON202630
BUY J4-1	ACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTACC TTTCTTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCACCAGTATTTA GCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAAC AACTCGACTCTTTGATAAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCA GACGGGTTGTACCCTCTATGACGTAATTCCAAGCAACTTGG GTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAAATTACAATCCCGAGGG TTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACT	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ON202631
TIAS J0-6	GGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGGCGCTCCCA TTTGTAAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCGGCAGTAC ACCGCCACGAGGGGCGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCACTCAT TTCTTCCCTATCAACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCA AAGTCTTTTACCTTTCTTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCT CTCACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAG CTGATTCCCAAACAACCTCGACTCTTTGATAAGGCAATACATGGA GAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTACCCTCTATGACGTAATT CCAAGCAACTTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAAATT ACAATCCCGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCG	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ON202632
TIAS J1-8	GGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGGCGCTCCCA TTTGTAAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCGGCAGTAC ACCGCCACGAGGGGCGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCACTCAT TTCTTCCCTATCAACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCA AAGTCTTTTACCTTTCTTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCT CTCACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAG CTGATTCCCAAACAACCTCGACTCTTTGATAAGGCAATACATGGA GAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTACCCTCTATGACGTAATT CCAAGCAACTTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAAATT ACAATCCCGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCG CCGT	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ON202633
TIAS J4-8	TCGTGGTGGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGG CGTCCCATTTGTAACCCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCG GCAGTACACCGCCACGAGGGGCGGCTGAAACCTCGGCCACTCT CCACTCATTTCTTCCCTATCAACAATTTACATACTATTTCACT CTCTTTTCAAAGTTCTTTTACCTTTCTTTCACAGTACTTGTTCGCT ATCGGTCTTTCACAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCC ACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTTGATAAGGCAA TACATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTACCCTCTATGAC GTAATTCCAAGCAACTTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATC TTCAAATTACAATCCCGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCT CACTCGCGT	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ON202634
YA J3-1	TCGTGGTGGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGG CGTCCCATTTGTAACCCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCG GCAGTACACCGCCACGAGGGGCGGCTGAAACCTCGGCCACTCT CCACTCATTTCTTCCCTATCAACAATTTACATACTATTTCACT CTTTTCAAAGTTCTTTTACCTTTCTTTCACAGTACTTGTTCGCTA TCGGTCTTTCACAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCC TTTGGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTTGATAAGGCAATA CATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTACCCTCTATGACGT ACTATTCCAAGCAACTTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTT AAATTACAATCCCGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCA	<i>Yarrowia lipolytica</i>	ON202635

RESULTATS ET DISCUSSION

1-6- Purification et caractérisation partielles des pectinases des espèces *Yarrowia lipolytica*

Dans cette partie de l'étude, les souches de *Yarrowia lipolytica* (Tias J0-6 ; Buy J2-1 et YA J3-1) ont été sélectionnées pour la purification et la caractérisation sur la base de leur activité enzymatique maximale par aux paramètres physico-chimiques (pH, température, temps d'incubation) émanant des extraits bruts respectifs.

1-6-1- Chromatographie par échange d'anions avec le gel DEAE Sepharose Fast Flow

Pour la purification partielle des extraits bruts pectinolytiques des souches de *Yarrowia lipolytica* sélectionnées, seule la représentation graphique de la souche *Yarrowia lipolytica* TIAS J0-6 a été illustrée à figure 60. Les protéines sont éluées dans les échantillons compris entre les tubes 85 et 89. L'activité maximale du pic de la chromatographie a été enregistrée dans le tube 87, ce qui correspond à une activité totale de 0,209 UI/mL.

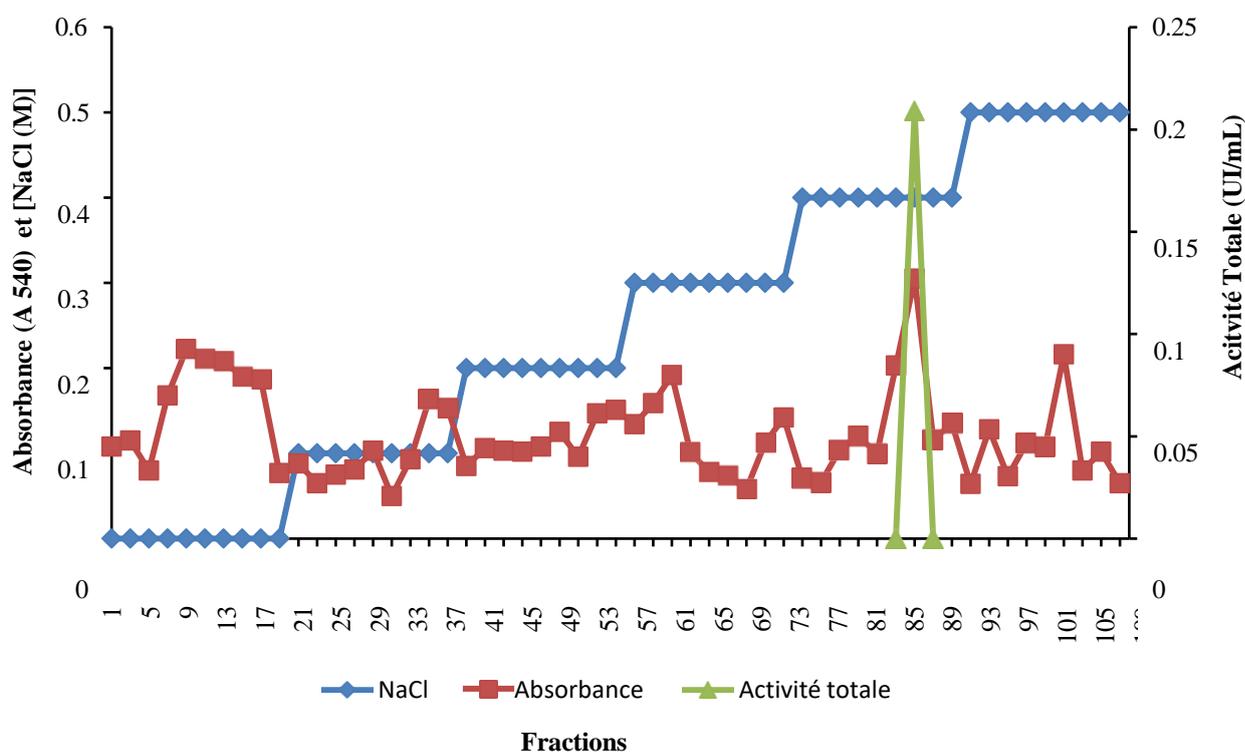


Figure 60 : Représentation graphique de la souche *Yarrowia lipolytica* TIAS J0-6

1-6-2- Paramètres de la purification partielle des pectinases

Les paramètres des purifications partielles des pectinases sur le gel DEAE-Sepharose fast Flow sont présentés dans les tableaux XXIV, XXV, XXVI. La pectinase produite par la souche de *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6 a été purifiée 1,13 fois pour un rendement de 28,86%.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les pectinases produites par les souches de *Yarrowia lipolytica* Buy J2-1 et de YA J3-1 ont été purifiées 1,04 et 1,02 avec des rendements respectifs de 35 et de 58,77%.

Tableau XXIV : Bilan partiel de la purification de l'enzyme produite par *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6

Purification	Protéine totale (mg)	Activité totale (UI)	Activité Spécifique (UI/mg)	Taux de Purification	Rendement (%)
Extrait brut	3,625	0,638	0,176	1	100
Chromatographie échangeuse d'ion	0,915	0,183	0,2	1,13	28,68

Tableau XXV : Bilan partiel de la purification de l'enzyme produite par *Yarrowia lipolytica* Buy J2-1

Purification	Protéine totale (mg)	Activité totale (UI)	Activité Spécifique (UI/mg)	Taux de Purification	Rendement (%)
Extrait brut	3,859	0,667	0,172	1	100
Chromatographie échangeuse d'ion	2,226	0,392	0,176	1,02	58,77

Tableau XXVI : Bilan partiel de la purification de l'enzyme produite par *Yarrowia lipolytica* YA J3-1

Purification	Protéine totale (mg)	Activité totale (UI)	Ativité Spécifique (UI/mg)	Taux de Purification	Rendement (%)
Extrait brut	6,82	0,6	0,087	1	100
Chromatographie échangeuse d'ion	2,382	0,210	0,088	1,04	35

RESULTATS ET DISCUSSION

1-6-3- Caractéristiques physico-chimiques des pectinases partiellement purifiées

1-6-3-1-Effet du pH sur l'activité enzymatique

L'effet du pH sur l'activité enzymatique des extraits enzymatiques partiellement purifiés est présenté à la figure 61. L'activité enzymatique maximale est atteinte à pH 7 quelle que soit la souche de *Yarrowia lipolytica*. L'activité enzymatique la plus importante a été obtenue avec l'extrait de la souche de *Yarrowia lipolytica* Buy J2-1 avec 0.29 ± 0.002 UI/mL suivi de celle de la souche *Yarrowia lipolytica* YA J3-1 avec $0,200 \pm 0,006$ UI/mL et enfin de *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6 avec 0.168 ± 0.0016 UI/mL.

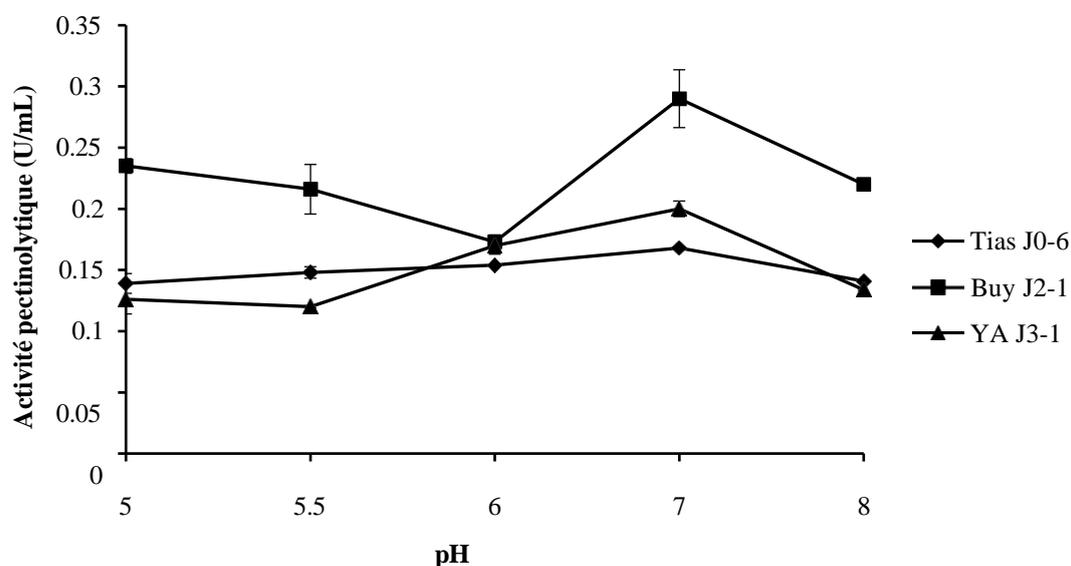


Figure 61 : Effet du pH sur l'activité enzymatique

1-6-3-2-Effet de la température sur l'activité enzymatique

La figure 58 montre l'évolution de l'activité enzymatique des extraits partiellement purifiés en fonction de la température. Le test de l'effet de la température sur l'activité enzymatique a permis de révéler que les enzymes produites par les souches de *Yarrowia lipolytica* Buy J2-1 et Tias J0-6 sont thermorésistantes avec des activités maximales de $0,36 \pm 0,01$ UI/mL et $0,122 \pm 0,008$ UI/mL respectivement à 60 et 50 °C. La pectinase partiellement purifiée produite par la souche *Yarrowia lipolytica* YA J3-1 a présenté une activité maximale de $0,177 \pm 0,005$ UI/mL à 30 °C.

RESULTATS ET DISCUSSION

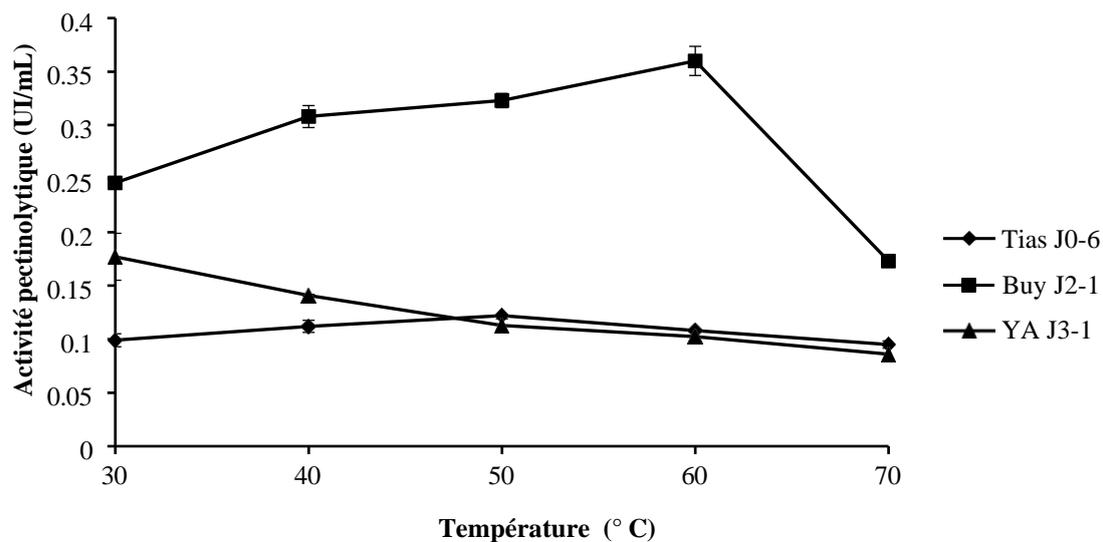


Figure 62 : Effet de la température sur l'activité enzymatique

1-6-4- Constantes cinétiques des pectinases partiellement purifiées

Les constantes cinétiques K_m (constante de Michaelis) et V_{max} (constante maximale) déterminées par la méthode graphique en coordonnées inverses de Lineweaver et Burk (1934) est présenté à la figure 59. Les valeurs de K_m et V_m sont 5 mg/mL et 0,0316 mg/mL/min ; 2,74 mg/mL et 0,032 mg/mL/min ; 2,53 mg/mL et 0,053 mg/mL/min respectivement pour les souches *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6, YA J3-1 et Buy J2-1.

RESULTATS ET DISCUSSION

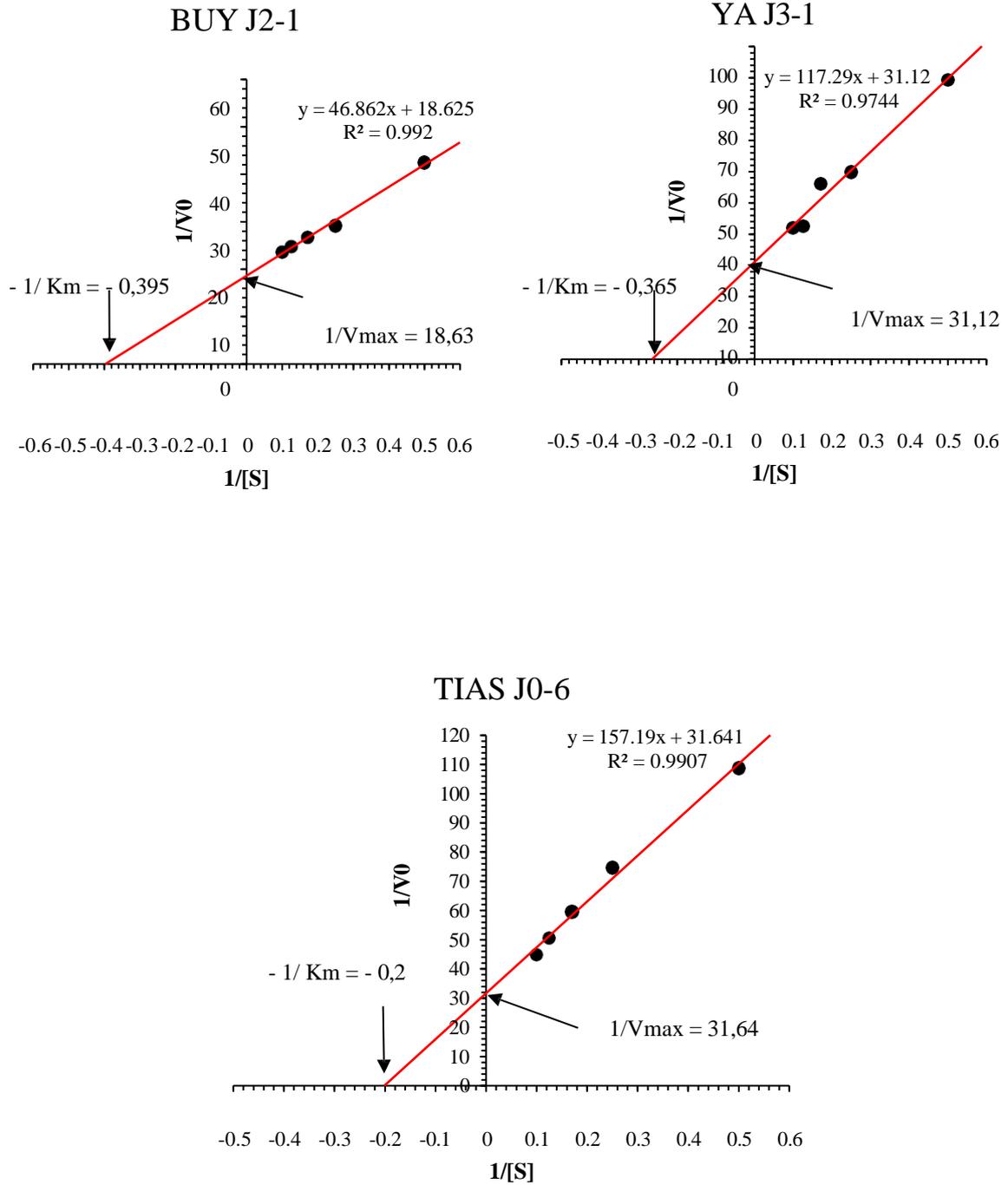


Figure 63 : Détermination graphique des constantes cinétiques K_m et V_{max}

RESULTATS ET DISCUSSION

2-Discussion

Longtemps considéré comme un déchet, le jus de cacao pourrait avoir un intérêt biotechnologique. En effet, lors du traitement post-récolte des fèves de cacao, le jus de cacao est soumis à une fermentation spontanée au cours de laquelle des changements physico-chimiques et microbiologiques ont été observés (Sandra *et al.*, 2007 ; Elena *et al.*, 2007 ; Camu *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2007). Aussi, a-t-elle indiqué que le pH est corrélé négativement à l'acidité titrable. Cela se traduit par le fait que la diminution des valeurs du pH est liée à l'augmentation des valeurs de l'acidité et vice-versa. Cette observation serait due aux activités métaboliques des microorganismes impliqués dans la fermentation. Pendant la fermentation, les métabolites sous forme d'acides organiques sont produits et contribuent à l'acidification du jus (Herrero *et al.*, 1999 ; N'guessan *et al.*, 2008). Ainsi, les acides organiques sont le support de l'acidité. Cette acidité est la conséquence d'un pH faible et d'une acidité titrable élevée du jus. L'évolution de la charge en levures, des ESR et du taux d'éthanol pendant la fermentation spontanée du jus de cacao a montré que les échantillons d'Akoupé, de Yakassé-Attobrou et de Tiassalé étaient caractérisés par une diminution de la charge en levures à partir de 48 h. Cette diminution de la charge en levures serait causée par l'éthanol. En effet, la fermentation impose une variété de stress à la cellule de levure parmi lesquelles la concentration en éthanol reste le stress le plus important (Stanley *et al.*, 2010). Dans cette étude, l'augmentation du taux d'éthanol est corrélée à la diminution de la charge en levures. En effet, l'éthanol cible principalement les membranes, augmentant leur fluidité et leur perméabilité, affectant ainsi le système de transport de composés essentiels tels que les acides aminés et le glucose. Son accumulation compromet un large éventail de fonctions cellulaires, entraînant une réduction du taux métabolique, de la croissance et de la viabilité des cellules, et favorisant finalement une fermentation lente (Alexandre *et al.*, 2001 ; Gibson *et al.*, 2007, N'guessan *et al.*, 2016). Cependant, la présence de levures à la fin de la fermentation spontanée pourrait signifier une tolérance ou une résistance à l'éthanol. Le phénomène de la tolérance à l'éthanol est relativement difficile à étudier car il n'existe pas de modèle universel pour le quantifier. Certains auteurs se basent sur des valeurs de croissance cellulaire (Thomas & Rose, 1979 ; Beavan *et al.*, 1982), de taux de production spécifique d'éthanol (Thomas & Rose, 1979) ou de viabilité cellulaire (Dombek & Ingram, 1986 ; Birch & Walker, 2000) pour comparer leurs résultats aux résultats de référence des auteurs précédemment mentionnés. Il est également possible d'étudier le flux de protons à travers la membrane plasmique (Jiménez & van Uden, 1985). En somme, l'étude de la tolérance à

RESULTATS ET DISCUSSION

l'éthanol dépend du paramètre auquel on se réfère. Dans cette étude, la tolérance à l'éthanol a été définie comme la capacité de la levure à maintenir sa viabilité à des concentrations d'éthanol relativement élevées.

Ainsi, l'identification des isolats de levures provenant des échantillons d'Akoupé, de Yakassé-Attobrou et de Tiassalé où les taux d'éthanol étaient compris entre 7,21 % et 9,83 % a permis de révéler la présence de 5 espèces pour tous les isolats : *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kurdiavzevii*. Globalement, *Yarrowia lipolytica* était l'espèce majoritaire (41,16 %) suivie de l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* (25 %), de l'espèce *Debaromyces hansenii* (16,66 %), de l'espèce *Pichia kurdiavzevii* (12,5 %) et de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (4,16 %). Contrairement à plusieurs études qui ont montré la grande capacité de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* à résister à l'éthanol, dans cette étude ce sont les espèces non-*Saccharomyces* qui sont majoritaires dans les jus de cacao en fermentation spontanée dans tous les échantillons. Ceci démontre la capacité des espèces non-*Saccharomyces* à tolérer l'éthanol. Ainsi, certains auteurs ont rapporté la résistance à l'éthanol d'espèces non-*Saccharomyces*. Le fait que les non-*Saccharomyces* aient présenté une plus grande tolérance à l'éthanol que certaines souches de *S. cerevisiae* n'est pas surprenant, car de plus en plus d'études rapportent des isolats de vin d'espèces non-*Saccharomyces*, qui présentent des tolérances à l'éthanol similaires à celles de *S. cerevisiae* (Pina *et al.*, 2004 ; Nisiotou *et al.*, 2007). Selon Biryukova *et al.* (2009), *Yarrowia lipolytica* était capable de résister à 15 % (v/v) d'éthanol après un pré-traitement des cellules à 1 % (v/v) d'éthanol. Par ailleurs, Coulibaly *et al.* (2017) ont trouvé que l'espèce *Candida tropicalis* était capable de maintenir un taux de survie de 80 % à 7,5 % d'éthanol. De même, *Hanseniaspora guilliermondii* isolé du moût de raisin utilisé pour la production de vin de Porto dans la région du Douro au Portugal, a montré une tolérance à l'éthanol très similaire à celle de *Saccharomyces cerevisiae* à 25 % (v/v) d'éthanol (Pina *et al.*, 2004). Selon Rosa *et al.* (2017), *Candida californica* IT2-010, *Hanseniaspora vineae* IT2, *Pichia cecembensis* IT0-042 isolés du moût de raisin Isabella ont montré la croissance à 7,5 % d'éthanol et *Torulaspota delbrueckii* IT1-039 a montré une croissance importante à 10 % d'éthanol. Les souches RG1 de *Issatchenkia orientalis* isolées de la bière traditionnelle rwandaise de sorgho ikigage ont montré une bonne tolérance à 10 % d'éthanol. De même, parmi plusieurs souches non-*Saccharomyces*, seule la souche RG1 de *I. orientalis* a été capable de survivre dans de l'éthanol à 15 % (Lyumugabe *et al.*, 2010). Selon Okuma *et al.* (1986) et Isono *et al.* (2012), *Issatchenkia orientalis* est très bien connue comme première levure à haute tolérance à l'éthanol. En outre, Mendes-Ferreira *et al.*

RESULTATS ET DISCUSSION

(2018) ont signalé que les souches de *Metschnikowia pulcherrima* de la région viticole du Douro étaient capables de se développer en présence de la concentration maximale testée (12 % v/v d'éthanol). Ces auteurs ont affirmé que c'est la première fois que cette haute tolérance à l'éthanol a été rapportée dans des souches de *Metschnikowia pulcherrima*. Le mécanisme qui a permis aux souches non-*Saccharomyces* de résister à l'éthanol pourrait être un ajustement de la composition des lipides membranaires, en particulier la synthèse d'acides gras non saturés, de graisses neutres et de phospholipides (You *et al.*, 2003 ; Shobayashi *et al.*, 2005 ; Coulibaly *et al.*, 2018). Par ailleurs, La tolérance relativement élevée de l'alcool par les levures non-*Saccharomyces* serait liée à la nature de la niche écologique d'où elles ont été isolées. En effet, le jus de cacao contient des sucres et des nutriments favorables à la croissance des microorganismes et à la fermentation alcoolique. Les microorganismes présents dans un environnement alcoolisé pourraient être susceptibles de développer une adaptation physiologique. Nos résultats sont en accord avec ceux de Tra Bi (2017) qui a rapporté que la résistance à l'éthanol des souches de *Saccharomyces cerevisiae* était influencée par la teneur en éthanol des boissons traditionnelles d'où elles ont été isolées à savoir le vin de palmier à huile, le vin de palmier raphia et la bière de sorgho.

Récemment reconnues pour leur influence significative sur les propriétés organoleptiques et sensorielles du vin (Jolly *et al.*, 2014 ; Padilla *et al.*, 2016 ; Varela & Borneman, 2017), de la bière traditionnelle de sorgho (Coulibaly *et al.*, 2016), les souches non-*Saccharomyces* de cette étude ont montré une bonne résistance à l'éthanol. D'autre part, la répartition des espèces de levures résistantes à l'éthanol dépendait de la zone géographique. En effet, les échantillons d'Akoupé et de Yakassé-Attobrou dans le Sud-Est étaient caractérisés par la prédominance de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaromyces hansenii* tandis que les échantillons de Tiassalé dans le Sud étaient caractérisés par celle de *Yarrowia lipolytica* et *Pichia kudriavzevii*.

Une des propriétés biotechnologiques des souches de levures isolées des jus de mucilage de cacao en fermentation spontanée évaluée était la production de pectinase. En effet, cette enzyme a été étudiée car le jus de mucilage résulte de la dégradation pectinolytique de la pulpe mucilagineuse qui enrobe les fèves par l'action de microorganismes. Ainsi, le screening deux cent quarante (240) isolats, a permis la sélection de seulement six isolats sur la base de leur capacité à hydrolyser la pectine avec un diamètre de zone claire supérieur ou égal à 10 mm. Sur la base du criblage, les six isolats se sont avérés être productrices potentielles d'enzyme pectinolytique. Ainsi, les pectinases de ces six isolats ont été caractérisées. Les diamètres de la

RESULTATS ET DISCUSSION

zone claire dans notre étude étaient plus élevés que ceux trouvés par Banu *et al.* (2010) ; Thangaratham & Manimegalai (2014) et Dange & Harke (2018) qui ont trouvé dans l'ensemble 3 à 4,3 mm de zone claire respectivement pour *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus oryzae* et *Aspergillus oryzae*. D'autre part, Poondla *et al.* (2015) ont signalé qu'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* isolée et identifiée à partir de déchets de fruits présentait une zone de clairance de 16 mm. Nos résultats sont conformes à ceux de Banu *et al.* (2010) ; Thangaratham & Manimegalai (2014) ; Dange & Harke (2018) et Poondla *et al.* (2015) Par ailleurs, l'identification moléculaire des isolats de levures productrices de pectinase a révélé que toutes les souches appartenaient à l'espèce *Yarrowia lipolytica*.

La détermination des conditions optimales de production des pectinases a permis de caractériser celles-ci. Sur la base du temps d'incubation, évalué uniquement sur les extraits bruts des souches *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6; YA J3-1; Buy J2-1 ont présenté l'activité pectinolytique maximale par rapport aux autres souches. L'activité pectinolytique maximale dans cette étude a été observée à 12 h d'incubation. Nos résultats sont en accord avec ceux de Bouatenin *et al.*, (2019). En effet, ces auteurs ont rapporté que les activités pectinolytiques maximales de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Rhizopus oryzae* isolées et identifiées à partir de ferments traditionnels de manioc utilisés pour la production d'attieke en Côte d'Ivoire ont été observées entre 12 h. Toutefois notre résultat était inférieur à celui trouvé par Kashyap *et al.* (2000) qui ont rapporté que l'activité pectinase maximale de *Bacillus sp.* DT7 a été observée après 24 h d'incubation. Okonji *et al.* (2019) ont montré que l'activité pectinolytique maximale de *Aspergillus fumigatus* était atteinte après 144 h d'incubation. De même, *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 52712) a présenté une activité pectinolytique maximale à 6 jours de fermentation en utilisant un ratio de 80:20 % d'épis de maïs et de pelures d'orange comme substrat (Dzogbefia *et al.*, 2017). L'activité pectinolytique maximale de *Saccharomyces cerevisiae* isolé et identifié à partir de déchets de fruits a été obtenue à 48 h d'incubation (Poondla *et al.*, 2015). Ainsi, la période d'incubation nécessaire pour obtenir les activités pectinolytiques maximales semble dépendre des microorganismes. En plus, du temps d'incubation, l'activité pectinolytique reste fortement influencer par le pH et la température du milieu dans lequel l'enzyme travaille. Ainsi, l'effet du pH et de la température a été évalué aussi bien à partir des extraits enzymatiques brutes qu'avec les extraits partiellement purifiés. Les activités maximales ont été observées entre le pH 5,5 et 8, et les activités les plus importantes ont été observées à pH 5,5 et 6 avec les extraits bruts et à pH 7 avec les extraits partiellement purifiés. Nos résultats sont conformes à ceux de quelques auteurs. Le pH nécessaire à une

RESULTATS ET DISCUSSION

activité pectinolytique maximale d'autres souches microbiennes était identique à celui de nos souches de *Yarrowia lipolytica*. En effet, Piccoli-valle *et al.* (2001) ont rapporté que la pectine lyase de *Penicillium griseoroseum* avait une activité maximale à un pH neutre (7). Kashyap *et al.* (2000) ont montré que la production maximale de pectinase (15,72 UI/ml) de *Bacillus sp.* DT7 a été observée autour du pH neutre (7,2). L'activité maximale de la pectine lyase de *Saccharomyces cerevisiae* isolée et identifiée à partir de déchets de fruits a été atteinte à pH 6 (Poondla *et al.*, 2015). Cependant, le pH optimal de l'activité pectinolytique dépendait des microorganismes. En effet, il a été rapporté que les enzymes pectinolytiques de *Saccharomyces cerevisiae* (ATTC 52712) et de *Saccharomyces bayanus* sont actives dans une large gamme de pH allant de 3 à 5,5 (Ameko, 1998 ; Gognies *et al.*, 1999). La pectinase de *Aspergillus fumigatus* a un pH optimal à 5,0 (Okonji *et al.*, 2019). Kashyap *et al.* (2000) et Manashi *et al.* (2014) ont signalé que la pectinase produite par *Bacillus subtilis* présentait une activité optimale à pH 5,0. *Penicillium viridicatum* a montré une production maximale de polygalacturonase et de pectine lyase à un pH de 4,5 et 5 respectivement (Silva *et al.*, 2002). Piccoli-valle *et al.* (2001) ont observé que *P. griseoroseum* présentait une forte activité polygalacturonase et pectine estérase à des pH acides de 4,5 et 5. Certains auteurs ont rapporté que *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b et *Kluyveromyces marxianus* CECT1043 avaient une activité pectinase maximale à pH 4,5 (Birgisson *et al.*, 2003 ; Eschstruth *et al.*, 2011). Ghannam (2009) et Lamrini (2012) ont signalé que les activités pectinases optimales ont été enregistrées à pH 10 pour la souche d'actinomycète isolée du compost de poulet et les souches de *Bacillus subtilis* respectivement. Ainsi, la production des pectinases serait optimale à pH 5,5 et 6 et l'activité des extraits purifiés serait maximale à pH 7.

L'influence de la température sur l'activité pectinolytique de nos souches de *Yarrowia lipolytica* a été évaluée à partir des extraits enzymatiques brutes et des extraits partiellement purifiés. Les activités maximales ont été obtenues à une température modérée de 30 °C avec les extraits enzymatiques bruts. Nos résultats sont conformes à ceux de Blanco *et al.* (1994), Moyo *et al.* (2003) et Kumar *et al.* (2012). En effet, ces auteurs ont rapporté que les activités de la polygalacturonase et de la pectine lyase de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus foetidus* et *Kluyveromyces wickerhamii* étaient maximales à 30 °C. Par ailleurs, les activités maximales des extraits purifiés de notre étude ont été observées à 50 et 60 °C. Ce résultat est intéressant dans la mesure où les pectinases partiellement purifiés de cette étude sont actives à des températures relativement élevées. Nos résultats sont en accord avec ceux de Banu *et al.* (2010) et Okonji *et al.* (2019). En effet ces auteurs ont rapporté que

RESULTATS ET DISCUSSION

les activités pectinolytiques maximales de *Penicillium chrysogenum* et *Aspergillus fumigatus* ont été atteintes à 50 °C et 60 °C respectivement. La température optimale pour les activités pectinases de ces espèces de levures : *Candida norvegensis*, *Cryptococcus macerans*-S3A, *Kluyveromyces wickerhamii* IFO 1675 ont été observées à 50 °C (Yoshitake *et al.*, 1994 ; Birgisson *et al.*, 2003). D'autre part, la température optimale pour l'activité pectinolytique de *Kluyveromyces fragilis* CBS1555 a été enregistrée entre 50 et 60 °C (Sanchez *et al.*, 1984). Comme dans le cas du pH, la température optimale pourrait dépendre des micro-organismes. Ainsi, cette différence observée entre les espèces de *Yarrowia lipolytica* de cette étude pourrait être attribuée à des variations intraspécifiques entre ses espèces. Ainsi, la température optimale de production des pectinases était de 30 °C et l'activité maximale des extraits partiellement purifiés a été observée 50 et 60 °C.

Les caractéristiques des pectinases partiellement purifiés pourraient dépendre du microorganisme et de la nature de la pectinase. Cette condition dépendant de la souche et de la nature de la pectinase se confirme avec les résultats de Yadav *et al.* (2012). En effet, ces auteurs ont rapporté une purification partielle de 1,9 fois avec un rendement de 16 % pour l'exopolygalacturonase de *Rhizopus oryzae*. La pectinase de *Aspergillus fumigatus* a été purifiée avec un taux de purification de 1,74 fois et un rendement de 27,36 % (Okonji *et al.*, 2019). Dans nos résultats, toutes les espèces étudiées ont été identifiées en tant que *Yarrowia lipolytica*, avec de taux de purification compris entre 1,02 et 1,13 et des rendements de 28,68 à 58,77 %.

Les valeurs de constantes de Michaelis des souches de *Yarrowia lipolytica* obtenue étaient comprise entre 2,74 et 2,53 mg/mL puis entre 0,0316, 0,032 et 0,053 mg/mL/min respectivement pour K_m et V_m . De faibles valeurs de K_m indiquent que l'enzyme n'a besoin que d'une petite quantité de substrat pour être saturée ; par conséquent, la vitesse maximale V_m est atteinte à une concentration de substrat relativement faible. Cependant, une valeur K_m élevée indique que l'enzyme a besoin de concentrations élevées de substrat pour atteindre la vitesse maximale de réaction (Anosike, 2001). Ainsi, parmi ces trois souches de *Yarrowia lipolytica*, la souche Buy J2-1 ($K_m = 2,53$ mg/mL) avait une affinité plus élevée pour la pectine tandis que celle Tias J0-6 avait une affinité plus faible pour le substrat. Cela voudrait dire que les paramètres cinétiques des pectinases varient une fois de plus selon le microorganisme. Plusieurs valeurs de K_m dans la gamme de 1-9 mg/mL ont été rapportées pour les polygalacturonases (Saad *et al.*, 2007 ; Merin *et al.*, 2015). Il a été démontré que l'exopolygalacturonase de *Penicillium frequentans* avait une valeur de K_m de 1,6 mg/mL (Favey *et al.*, 1992). La valeur K_m de 2,4 mg/ml a été rapportée pour une endo-polygalacturonase d'*Aspergillus niger*

RESULTATS ET DISCUSSION

(Parenicova *et al.*, 1998). Une exo-polygalacturonase de *Aspergillus tubingensis* avait une valeur K_m de 3,2 mg/mL (Kester *et al.*, 1996). Les valeurs K_m de la plupart des polygalacturonases microbiennes sont comprises entre 0,1 et 5,0 (Polizeli *et al.*, 1991 ; Zhang *et al.*, 1999 ; Niture *et al.*, 2001 ; Singh & Rao, 2002 ; Thakur *et al.*, 2010 ; Yadav *et al.*, 2012 ; Martins *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2014). Même si la spécificité de l'enzyme n'a pas été déterminée, les valeurs de K_m trouvées sont bien comprises entre 0,1 et 5,0. Une exo-polygalacturonase du champignon *Penicillium frequentans* avait une valeur K_m très faible de 0,059 (Barense *et al.*, 2001) tandis que la polygalacturonase du champignon pathogène *Ustilago maydis* a révélé une valeur K_m comparativement très élevée de 57,84 (Castruita-Dominguez *et al.*, 2014).

Les enzymes identifiées sont des pectinases. Les conditions optimales de production des pectinases étaient de obtenues aux valeurs de comprises entre pH 5,5-6, à la température de 30 °C pendant 12 h d'incubation. Les activités maximales des extraits enzymatiques partiellement purifiés des 3 souches de *Yarrowia lipolytica* sélectionnées étaient observées à pH 7 et à la température située entre 50 et 60 °C. Les valeurs de K_m des pectinases purifiées étaient 5, 2,74 et 2,53 mg/mL respectivement pour les souches Tias J0-6; YA J3-1; Buy J2-1. Les valeurs de V_{max} des souches Tias J0-6; YA J3-1 et Buy J2-1 étaient de 0,0316; 0,032 et 0,053 mg/mL/min.

RESULTATS ET DISCUSSION

Conclusion partielle

Ce travail rapporte une analyse détaillée sur l'identité de la communauté de levures résistantes à l'éthanol présente à la fin de la fermentation spontanée du jus de cacao provenant de 3 régions cacaoyères de Côte d'Ivoire. La collection de souches isolées dans ce travail constitue une source potentielle de souches précieuses non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces cerevisiae* pour des applications biotechnologiques. Elle a montré que le jus de cacao pourrait être un réservoir de micro-organismes. Cette étude représente la première caractérisation de levures indigènes résistantes à l'éthanol à partir de jus de cacao fermenté. Les principaux résultats se présentent comme suit :

- Les espèces de levures résistantes à l'éthanol identifiées dans cette étude étaient *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kurdiavzevii*;
- La distribution de ces espèces a été influencée par la zone géographique de l'étude ;
- L'étude des isolats producteurs de pectinases a révélé qu'ils appartenaient tous à l'espèce *Yarrowia lipolytica*;
- Les conditions optimales de production des pectinases étaient obtenues à pH 5,5 -6, à la température de 30 °C pendant 12 h incubation.
- Les activités maximales des extraits enzymatiques partiellement purifiés des 3 souches de *Yarrowia lipolytica* sélectionnées étaient observées à pH 7 et à la température située entre 50 et 60 °C. Les valeurs de *Km* des pectinases purifiées étaient 5, 2,74 et 2,53 mg/mL respectivement pour les souches Tias J0-6; YA J3-1; Buy J2-1. Les valeurs de *Vmax* des souches Tias J0-6; YA J3-1 et Buy J2-1 étaient de 0,0316; 0,032 et 0,053 mg/mL/min.

Les souches de *Yarrowia lipolytica* résistantes à l'éthanol et/ou productrices de pectinase pourraient être appropriées pour des applications biotechnologiques. Les souches productrices de pectinase pourraient être utilisées pour la clarification des jus de fruits et celles résistantes à l'éthanol, dans la production de bioéthanol. Ces applications biotechnologiques consisteront la suite de l'étude.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES : ESSAI DE PRODUCTION DE BIOÉTHANOL PAR LES SOUCHES DE LEVURES RÉSISTANTES À L'ÉTHANOL, CLARIFICATION DE JUS D'ORANGE (*Citrus sinensis* L.) ET D'ANANAS (*Ananas comosus*) PAR LES SOUCHES DE LEVURES PRODUCTRICES DE PECTINASE

1-Production de bioéthanol par fermentation du moût sucré de sorgho par les souches de levures résistantes à l'éthanol : *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*

1-1-Évolution des différents paramètres physico-chimiques au cours de la fermentation alcoolique

1-1-1- Évolution du pH et de l'acidité titrable

Les valeurs de pH et de l'acidité titrable des moûts au cours de la fermentation évoluent inversement (Figure 64). La courbe de l'évolution du pH présente une allure décroissante pour toutes les souches testées aussi bien en monoculture qu'en culture mixte. Ainsi, la baisse la plus importante des valeurs de pH a été observée avec la culture mixte avec des valeurs passant de $3,39 \pm 0,00$ en début de fermentation (0 h) à $3,2 \pm 0,0$ en fin de fermentation (120 h). Aussi, inversement à l'allure de la courbe de l'évolution du pH, celle de l'évolution de l'acidité titrable est caractérisée par une allure croissante pour l'ensemble des souches en monocultures et en culture mixte. Ainsi, la culture mixte s'est avérée être celle qui acidifie plus le moût en fermentation avec des valeurs d'acidité titrable passant de $0,41 \pm 0,01$ % en début de fermentation (0 h) à $0,59 \pm 0,01$ % en fin de fermentation (120 h).

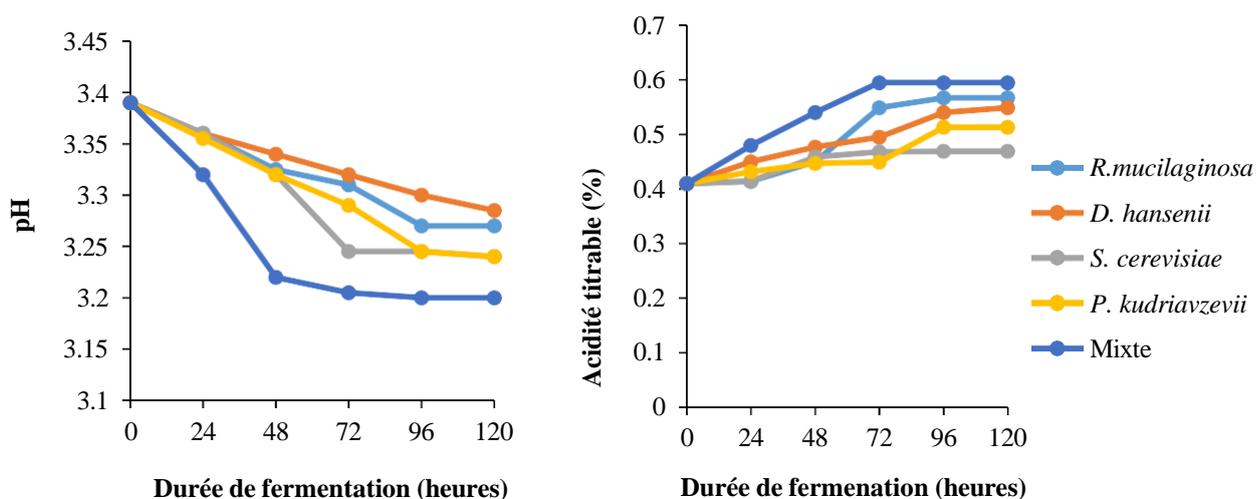


Figure 64 : Évolution du pH et de l'acidité titrable des moûts en fermentation avec les différentes espèces de levures

RESULTATS ET DISCUSSION

1-1-2- Vitesse de consommation des sucres des espèces de levures au cours de la fermentation

La vitesse de consommation des sucres au cours de la fermentation alcoolique par les espèces de levures de cette étude est présentée à la figure 65. Elle augmente durant les 24 premières heures, quelle que soit la souche de levure. La vitesse de consommation la plus importante pendant ces 24 h a été observée avec *S. cerevisiae* ($0,104 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$) alors que celles des autres espèces sont presque identiques. À partir de 24 h, une baisse de la vitesse de consommation des sucres est observée pour la culture mixte et les espèces *S. cerevisiae* et *R. mucilaginosa* passant respectivement de $0,083$ à $0,033 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$ pour la culture mixte et l'espèce *R. mucilaginosa* au bout de 96 h et de $0,104$ à $0,033 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$ pour l'espèce *S. cerevisiae* après 96 h de fermentation. À partir de 96 h jusqu'à la fin de la fermentation (120 h), la vitesse de consommation est restée constante avec $0,033 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$. Par ailleurs, l'espèce *P. kudriavzevii* a présenté une baisse de la vitesse de consommation de sucres de 24 h à 72 h passant de $0,081$ à $0,034 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$ avant connaître une légère augmentation de la vitesse de consommation au bout de 96 h pour atteindre la valeur de $0,036 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$. Aussi, la vitesse de consommation des sucres de l'espèce *D. hansenii* a diminué de 24 à 48 h avant d'augmenter légèrement de 48 à 96 h avec une vitesse passant de $0,031$ à $0,039 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$. Toutefois en fin de fermentation (120 h), toutes les espèces ont présenté la même vitesse de consommation des sucres qui est de $0,033 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$.

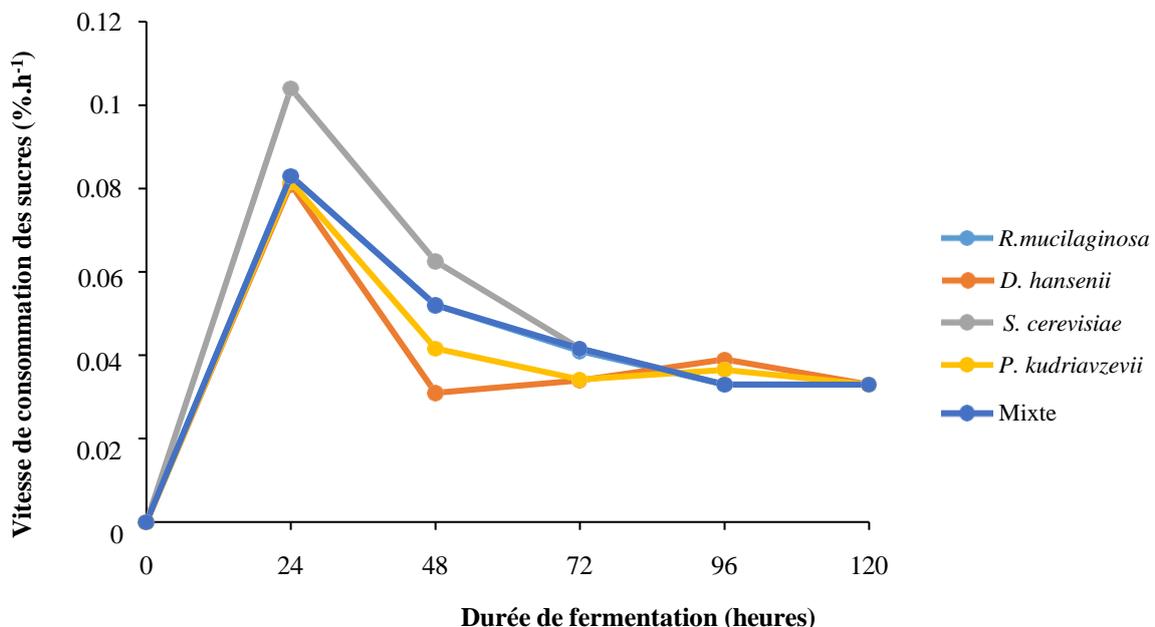


Figure 65: Vitesse de consommation des sucres au cours de la fermentation alcoolique avec les différentes espèces de levures

RESULTATS ET DISCUSSION

1-2-Évolution la cinétique fermentaire des souches de levure au cours de la fermentation alcoolique des moûts

I-2-1-Évolution du volume CO₂ (g/L) dégagé au cours de la fermentation des moûts

Les performances de croissance des souches de levures ont été évaluées à travers le dégagement de CO₂ au cours de la fermentation (Figure 66). De façon générale, une augmentation continue du volume de CO₂ dégagé a été enregistrée pour toutes les espèces de levures testées ainsi que la culture mixte. Durant les premières 72 h de fermentation, le plus important volume de CO₂ dégagé a été observée au niveau du moût fermenté par l'espèce *P. kudriavzevii* passant ainsi de 0 à 0,089 g/L. A partir de 72 h jusqu'à la fin de la fermentation, une augmentation plus rapide du volume de CO₂ dégagé a été obtenue dans les moûts ensemencés avec l'espèce *S. cerevisiae* et la culture mixte. En fin de fermentation, les valeurs de volumes de CO₂ dégagé étaient de 0,156 g/L pour la culture mixte, 0,148 g/L pour l'espèce *S. cerevisiae* et 0,143 /L pour l'espèce *P. kudriavzevii*.

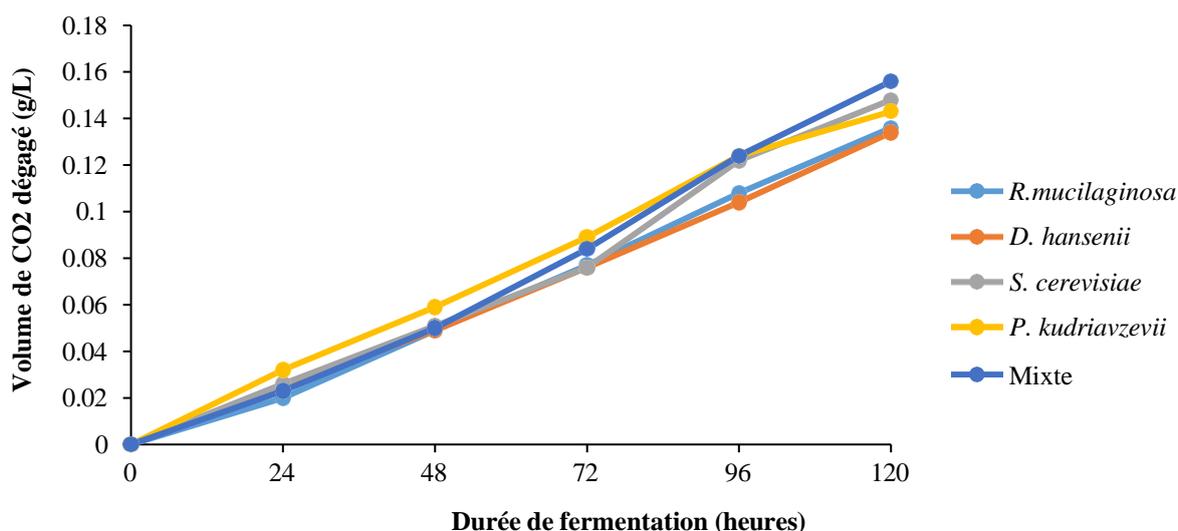


Figure 66 : Dégagement de CO₂ au cours de la fermentation des moûts avec les différentes

1-2-2-Évolution de la croissance levurienne au cours de la fermentation des moûts

La croissance levurienne a été déterminée par mesure de la densité optique (D.O) au cours de la fermentation. Même si cette méthode n'est pas assez précise elle donne tout de même une indication sur la croissance des espèces testées. Ainsi, quelle que soit l'espèce testée, une augmentation continue des valeurs de D.O. a été enregistrée (Figure 67). Pour toutes les espèces testées, deux phases de croissance ont été observées, ainsi une phase de croissance rapide

RESULTATS ET DISCUSSION

pendant les premières 48 heures avec des valeurs de D.O. passant de 0,5 pour toutes les espèces et la culture mixte en début de fermentation à 1,451; 1,487; 1,310; 1,470; 1,398 et 1,474 respectivement pour les espèces *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* et la culture mixte. La seconde phase de la croissance levurienne qui s'étend de 48 h jusqu'en fin de fermentation était caractérisée par une croissance moins rapide. Les valeurs de DO ont évolué de 1,451 à 1,578 pour l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* ; de 1,487 à 1,626 pour l'espèce *Debaromyces hansenii*; de 1,310 à 1,634 pour l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*; de 1,398 à 1,575 pour l'espèce *Pichia kudriavzevii* et de 1,474 à 1,644 pour la culture mixte. Ainsi, cette augmentation de DO est corrélée à la baisse des valeurs d'atténuation et à l'augmentation de celles du volume de CO₂ dégagé.

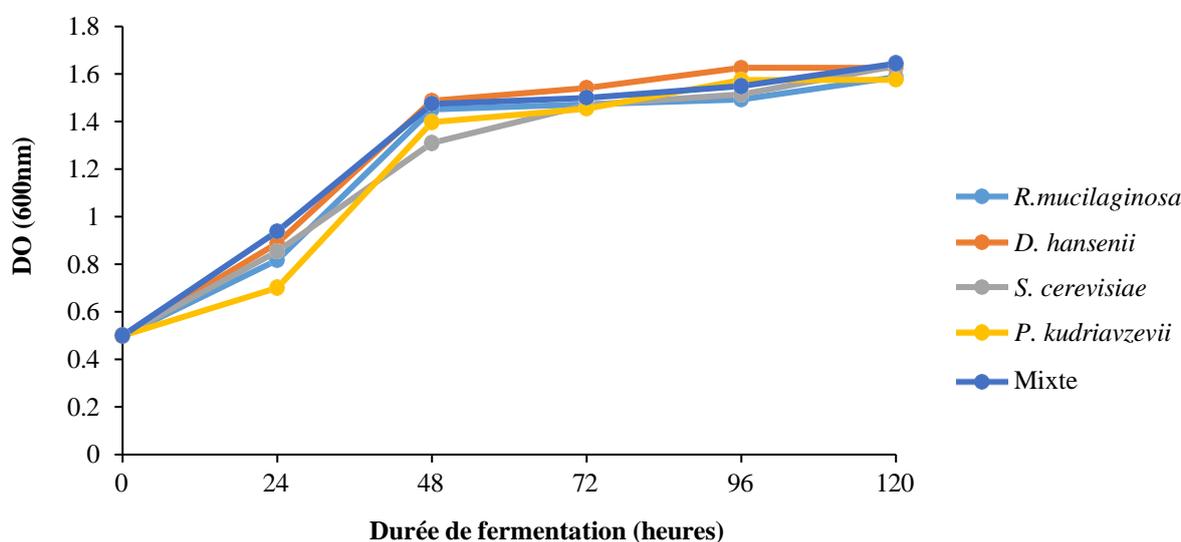


Figure 67 : Évolution de la densité optique des moûts ensemencés par les souches de levures au cours de la fermentation

1-3- Degré alcoolique des distillats provenant des différentes fermentations

La figure 68 nous présente les degrés alcooliques des distillats. Le degré alcoolique des distillats était compris entre $7,01 \pm 0,007$ et $7,38 \pm 0,063$ % (v/v). Le degré alcoolique le plus élevé a été obtenu dans le distillat provenant de l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* avec $7,38 \pm 0,063$ % (v/v) tandis que le degré le plus faible a été observé au niveau du distillat émanant de la culture mixte avec $7,01 \pm 0,007$ % (v/v). L'analyse statistique a montré une différence significative (**P<0,05) entre le degré alcoolique du distillat produit par l'espèce *Rhodotorula*

mucilaginosa et le reste des échantillons. Aucune différence significative (*P>0,05)

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

n'a été observée entre les autres échantillons. Par ailleurs les flacons contenant le bioéthanol produit sont présentés à la figure 68.

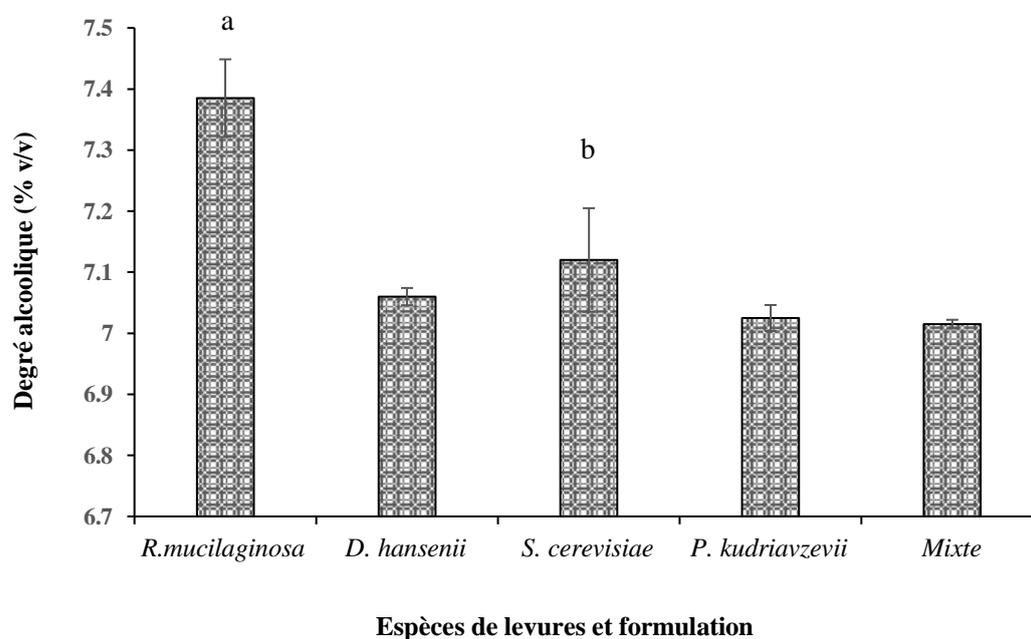


Figure 68 : Degré alcoolique des différents distillats



Figure 69 : Flacons de bioéthanol produit les différentes espèces de levures après distillation

RESULTATS ET DISCUSSION

1-4-Clarification des jus d'orange et d'ananas par les pectinases produites par les espèces de *Yarrowia lipolytica*

Les extraits enzymatiques partiellement purifiés de pectinase produites par les espèces de *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6 ; YA J3-1 et Buy J2-1 ont été utilisées pour les tests de clarification et extraction de composés phénoliques. Ces espèces ont été utilisées au regard de leur activité pectinolytique importante.

1-4-1- Activités enzymatiques des extraits bruts et partiellement purifiés des espèces de *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6 ; YA J3-1 et Buy J2-1

Les activités enzymatiques des extraits bruts et partiellement purifiés des espèces de *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6 ; YA J3-1 et Buy J2-1 sont présentées à la figure 70 . De façon générale, les activités des extraits enzymatiques partiellement purifiés sont plus importantes que celles des extraits bruts. Elles sont de $0,183 \pm 0,001$; $0,209 \pm 0,003$ et $0,392 \pm 0,005$ UI/mL tandis que celles des extraits bruts sont de $0,138 \pm 0,007$; $0,177 \pm 0,001$ et $0,235 \pm 0,01$ UI/mL respectivement pour les espèces de *Yarrowia lipolytica* Tias J0-6 ; YA J3-1 et Buy J2-1. De plus, les analyses statistiques ont montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les activités aussi bien pour les extraits bruts que pour les extraits partiellement purifiés.

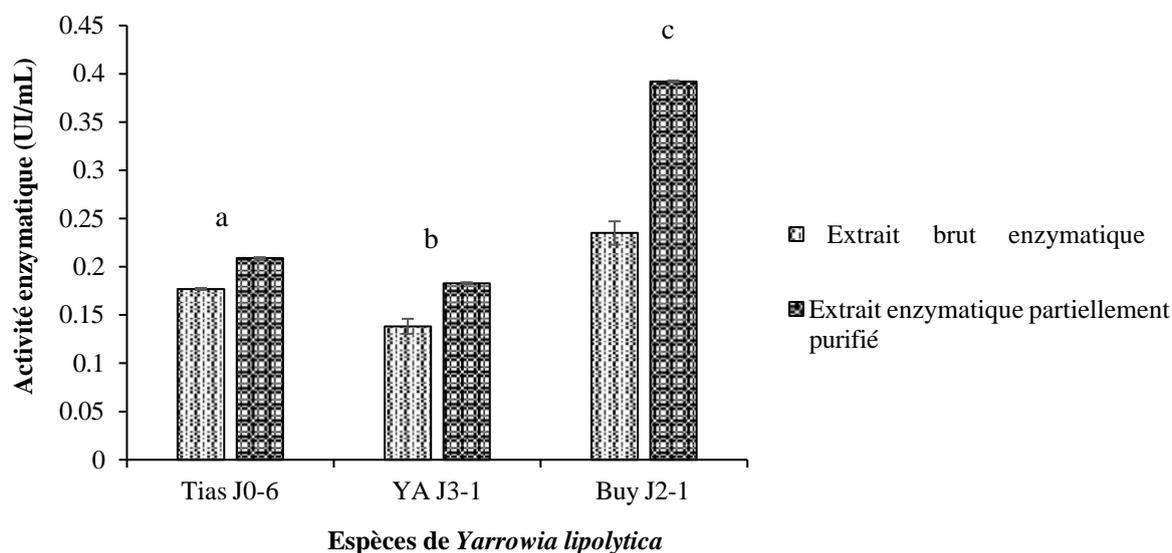


Figure 70 : Activité totale des extraits brut et partiellement purifié

RESULTATS ET DISCUSSION

1-4-2- Paramètres physico-chimiques et phytochimiques des jus clarifiés

1-4-2-1- Paramètres physico-chimiques des jus d'orange et ananas clarifiés

Les paramètres physico-chimiques des jus d'orange et d'ananas clarifiés à partir des extraits enzymatiques partiellement purifiés émanant des espèces de *Yarrowia lipolytica* ont été consignés dans les tableaux XXVII et XXVIII. La clarification est caractérisée par la baisse des valeurs des paramètres couleur, brunissement, pH, viscosité, densité et de l'augmentation de celles de la clarté et de l'acidité par rapport au jus non traité (jus témoin). Ainsi, quel que soit le jus de fruits (orange et ananas) traité et quel que soit l'extrait utilisé (Tias J0-6 ; YA J3-1 ; Buy J2-1). Ainsi en ce qui concerne la couleur, les valeurs baissent de $11,90 \pm 0,00$ % pour le jus témoin d'orange (jus non traité) à $11,65 \pm 0,07$ % ; $11,55 \pm 0,21$ % et $11,25 \pm 0,35$ % pour le jus d'orange clarifié puis de $0,8 \pm 0,00$ % pour le jus témoin d'ananas (jus non traité) à $0,6 \pm 0,00$ % ; $0,5 \pm 0,00$ % et $0,5 \pm 0,00$ % pour les jus d'ananas traité. Pour le paramètre brunissement, les valeurs diminuent de $9,90 \pm 0,00$ % pour le jus d'orange témoin à $3,25 \pm 0,07$ % ; $8,95 \pm 0,07$ % et $6,7 \pm 0,14$ % pour les jus traités. Pour les jus d'ananas, ces valeurs baissent de 6 ± 0 pour le jus d'ananas témoin à 5 ± 0 ; 4 ± 0 et 4 ± 0 pour les jus d'ananas traités. Pour le pH, les valeurs passent de $4,04 \pm 0,00$ pour le jus témoin d'orange à $4,03 \pm 0,00$; $4,02 \pm 0,00$ et $3,96 \pm 0,00$ pour les jus d'orange traités. Pour le jus d'ananas, ces valeurs baissent de $5,01 \pm 0,00$ pour le jus témoin à $4,59 \pm 0,00$; $4,49 \pm 0,00$ et $4,58 \pm 0,00$ pour les jus d'ananas traités. S'agissant de la viscosité les valeurs baissent de $0,17 \pm 0,00$ mPa.s pour le jus témoin d'orange à $0,15 \pm 0,00$ mPa.s ; $0,15 \pm 0,00$ mPa.s et $0,16 \pm 0,00$ mPa.s pour les jus d'orange traités. Pour le jus d'ananas, la valeur de la viscosité diminue de $0,31 \pm 0,00$ mPa.s à $0,30 \pm 0,00$ mPa.s, $0,30 \pm 0,00$ et $0,29 \pm 0,01$ mPa.s pour les jus d'ananas traités.

Par ailleurs, les valeurs de la clarté ont augmenté passant de $27,50 \pm 0,00$ % pour le jus témoin d'orange à $29,20 \pm 0,00$ % ; $28,40 \pm 0,00$ % et $28,80 \pm 0,00$ % pour les jus traités. Ces valeurs de la viscosité ont aussi augmenté pour le jus d'ananas passant de $0,31 \pm 0,00$ % pour le jus témoin à $0,30 \pm 0,00$ % , $0,30 \pm 0,00$ % et $0,29 \pm 0,01$ % pour les jus traités.

Aussi, aucun des extraits enzymatiques partiellement purifiés ne s'est distingué des autres. Par ailleurs, les analyses statistiques ont montré à la fois des différences significatives ($p < 0,05$) et des différences non significatives ($p > 0,05$) entre les jus traités et le jus non traité.

En ce qui concerne le jus d'orange, nous observons des différences non significatives ($p > 0,05$) entre les jus traités et le jus non traité pour les paramètres suivant : la couleur et la densité

Pour ce qui est du jus d'ananas, nous observons des différences non significatives ($p > 0,05$) entre les jus traités et le jus non traité au niveau de la viscosité et de la densité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XVIII : Paramètres physico-chimiques des jus d'orange clarifiés

	Clarté (%)	Couleur (%)	Brunissement (%)	pH	Acidité (%)	Viscosité (mPa.s)	Densité	ESR (°Brix)
Jus non traité	27,50±0,00 ^a	11,90±0,00 ^a	9,90±0,00 ^a	4,04±0,00 ^a	1,030±0,014 ^a	0,17±0,00 ^a	1,008±0 ^a	4,95±0,07 ^a
Tias J0-6	29,20±0,00 ^b	11,65±0,07 ^a	3,25±0,07 ^b	4,03±0,00 ^a	1,076±0,019 ^a	0,15±0,00 ^b	1,006±0 ^a	5,80±0,00 ^b
YA J3-1	28,40±0,00 ^b	11,55±0,21 ^a	8,95±0,07 ^c	4,02±0,00 ^b	1,071±0,012 ^a	0,15±0,00 ^c	0,962±0 ^a	5,50±0,14 ^{bc}
Buy J2-1	28,80±0,00 ^b	11,25±0,35 ^a	6,7±0,14 ^d	3,96±0,00 ^c	1,080±00 ^a	0,16±0,001 ^a	0,997±0 ^a	6,10±0,00 ^b

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± écart-types de trois mesures. Dans la même colonne, les valeurs moyennes portant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différentes (P>0,05).

Tableau XIXII : Paramètres physico-chimiques des jus d'ananas clarifiés

	Clarté (%)	Couleur (%)	Brunissement (%)	pH	Acidité (%)	Viscosité (mPa.s)	Densité	ESR (°Brix)
Jus non traité	2,75±0,00 ^a	0,80±0,00 ^a	0,60±0,00 ^a	5,01±0,00 ^a	0,25±0,02 ^b	0,31±0,00 ^a	1,008±0 ^a	10,75±0,07 ^b
Tias J0-6	3,90±0,14 ^b	0,60±0,00 ^b	0,50±0,00 ^b	4,59±0,00 ^b	0,39±0,00 ^a	0,30±0,00 ^a	1,006±0 ^a	10,95±0,07 ^{ab}
YA J3-1	3,65±0,07 ^b	0,50±0,00 ^b	0,40±0,00 ^b	4,49±0,00 ^c	0,45±0,00 ^a	0,30±00 ^a	1,005±0 ^a	10,90±0,00 ^{ab}
Buy J2-1	3,55±0,07 ^b	0,50±0,00 ^b	0,40±0,00 ^b	4,58±0,00 ^b	0,35±0,04 ^{ab}	0,29±0,01 ^a	1,005±0 ^a	11,00±0,00 ^a

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± écart-types de trois mesures. Dans la même colonne, les valeurs moyennes portant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différentes (P>0,05).

ESR : Extrait sec refractométrique

Tias J0-6
YA J3-1
Buy J2-1

} souches de *Yarrowia lipolytica*

RESULTATS ET DISCUSSION

1-4-2-2-Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante des jus clarifiés

Le tableau XXIX présente les teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante des jus clarifiés aussi bien pour les jus d'orange que pour les jus d'ananas.

De façon générale, une augmentation des concentrations des composés phénoliques a été observée au niveau des deux jus traités par rapport aux jus témoins. Ainsi pour le jus d'orange les valeurs les plus importantes des composés phénoliques sont $172,71 \pm 1,49$ $\mu\text{g/mL}$ EAG, $316,23 \pm 55,47$ $\mu\text{g/mL}$ EQ et $66,49 \pm 0,33$ g/L pour les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux et les tanins totaux respectivement. Cependant, les valeurs les plus faibles étaient $283,92 \pm 17,40$ $\mu\text{g/mL}$ EAG, $59,23 \pm 0,53$ $\mu\text{g/mL}$ EQ et $170,19 \pm 0,13$ g/L. Pour les jus d'ananas, seuls les tanins totaux ont obtenu les concentrations les plus élevées dans les jus clarifiés par rapport aux jus non clarifiés. La concentration la plus importante de $53,26 \pm 0,00$ g/L a été obtenu avec le jus clarifié par la pectinase émanant de la souche Buy J2-1 alors que la plus faible concentration de $31,93 \pm 0,05$ g/L a été observée dans le jus clarifié par la pectinase de la souche Tias J0-6.

Ainsi, l'ANOVA a permis de révéler l'effet de la clarification enzymatique sur les teneurs en composés phénolique. Par conséquent, il apparaît des différences significatives ($p < 0,05$) entre les jus traités et les jus témoins.

Les activités antioxydantes des jus de fruits clarifiés ont été évaluées à partir de deux méthodes : DPPH et FRAP. La méthode DPPH a montré que les taux d'activité antiradicalaire (DPPH) étaient les plus élevés dans le jus d'orange et le jus d'ananas clarifiés par la pectinase de Tias (J0-6) $42,39 \pm 0,82\%$ et la pectinase de Buy (J2-1) $60,43 \pm 0,54\%$ que les contrôles ($35,31 \pm 0,24\%$ et $60,43 \pm 0,54\%$) respectivement (Tableau XXIX). De plus, il y avait une différence significative ($P < 0,05$) entre les jus des échantillons et les contrôles. Pour la méthode FRAP, l'activité antioxydante était la plus importante dans le jus d'orange clarifié par la pectinase de YA J3-1 avec $211,16 \pm 7$ $\mu\text{g/mL}$ d'acide ascorbique tandis que dans le jus d'ananas clarifié, la valeur la plus élevée ($192,42 \pm 3,98$ $\mu\text{g/mL}$ d'acide ascorbique) a été obtenue dans le jus clarifié par la pectinase de Tias (J0-6) bien que cette valeur soit inférieure à celle du contrôle ($224,02 \pm 11,74$ $\mu\text{g/mL}$ d'acide ascorbique). De plus, l'analyse statistique a montré qu'il existe une différence significative ($P < 0,05$) entre les échantillons et les contrôles (Jus non traités).

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau XX: Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante des jus clarifiés

	Jus d'orange					Jus d'ananas				
	Polyphénols totaux (µg/mL EAG)	Flavonoïdes totaux (µg/mL EQ)	Tanins totaux (g/L)	FRAP µg/mL de vit C	DPPH (%)	Polyphénols totaux (µg/mL EAG)	Flavonoïdes totaux (µg/mL EQ)	Tanins totaux (g/L)	FRAP µg/mL de vit C	DPPH (%)
Jus non traité	267,38±5,98 ^a	58,36±0,41 ^b	110,85±0,68 ^a	186,45±2,4 ^a	35,31±0,2 ^b	407,67±7,61 ^a	130,19±3,53 ^a	23,46±0,02 ^a	224,02±11,24 ^a	50,96±0,5 ^c
Tias J0-6	297,96±8,42 ^a	59,23±0,53 ^b	172,71±1,49 ^b	113,34±0,06 ^b	42,39±0,82 ^a	381,22±13,59 ^a	124,90±5,3 ^a	31,93±0,05 ^b	192,42±3,98 ^b	55,31±1,28 ^b
YA J3-1	316,23±55,47 ^a	66,49±0,33 ^a	171,45±0,27 ^{bc}	211,16±7,00 ^c	31,4±0,12 ^c	398,84±4,78 ^a	127,3±1,08 ^a	34,39±0,04 ^c	189,07±1,85 ^b	51,77±0,35 ^c
Buy J2-1	283,92±17,40 ^a	65,95±0,03 ^a	170,19±0,13 ^c	140,04±3,64 ^d	32,82±1,01 ^{bc}	391,61±34,81 ^a	126,82±2,85 ^a	53,26±0,00 ^d	166,6±0,96 ^c	60,43±0,54 ^a

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± écart-types de trois mesures. Dans la même colonne, les valeurs moyennes portant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différentes (P>0,05).

Tias J0-6
YA J3-1
Buy J } souches de *Yarrowia lipolytica*

RESULTATS ET DISCUSSION

1-5- Corrélation entre composés phénoliques et activité antioxydante des jus de fruits clarifiés

Une matrice de corrélation dont les coefficients sont présentés dans le tableau XXX, a été créée pour explorer les relations possibles entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes. Les coefficients de corrélation les plus élevés et positifs ont été trouvés entre les tanins totaux et l'activité antiradicalaire ($r = 0,717$, $P < 0,05$) et entre les flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante évaluée par la méthode FRAP ($r = 0,754$, $P < 0,05$) concernant les jus d'orange clarifiés. Cependant, un coefficient de corrélation négatif ($r = -0,995$, $P < 0,05$) a été trouvé entre les flavonoïdes totaux et l'activité antiradicalaire. Dans les jus d'ananas clarifiés, les activités antioxydantes (activité antiradicalaire et pouvoir réducteur ferrique) étaient fortement corrélées uniquement aux tanins totaux. Un coefficient de corrélation positif a été observé entre les tannins totaux et l'activité antiradicalaire ($r = 0,855$, $P < 0,05$) tandis qu'un coefficient de corrélation négatif avait été obtenu entre les tannins totaux et le pouvoir réducteur ferrique ($r = -0,987$, $P < 0,05$)

Tableau XXX : Matrice de corrélation de Pearson entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes

		Phénols totaux	Tanins totaux	Flavonoïdes totaux
Jus d'orange	DPPH	-0.071	0.717*	-0.995*
	FRAP	0.430	-0.216	0.754*
Jus d'ananas	DPPH	-0.131	0.855*	-0.169
	FRAP	-0.118	-0.987*	-0.282

* La corrélation est significative au seuil de 5% ;

DPPH : 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl ;

FRAP : Pouvoir réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+})

RESULTATS ET DISCUSSION

2-Discussion

La troisième et dernière partie de notre étude a été dédiée à l'application biotechnologique des souches de levures résistantes à l'éthanol (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*) et celles productrices de pectinase (*Yarrowia lipolytica*). Dans la première section de cette discussion nous aborderons la question de la production de bioéthanol par les souches résistantes à l'éthanol (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*). Les désastres environnementaux (pollution environnementale, réchauffement climatique...) provoqués par l'utilisation d'énergies fossiles a engendré l'avènement de nouvelles sources plus respectueuses de l'environnement et moins énergivores (Hoekman, 2009 ; Demirbas, 2010 ; Kiran *et al.*, 2014). Ainsi, le biotéthanol reste l'une des plus anciennes ressources à caractère écologique à être utilisée. Même si sa production et son utilisation sont assez inexistantes en Afrique, ce n'est pas le cas dans les autres parties du globe. Déjà, les premières utilisations du bioéthanol avaient été initiées au Brésil en 1925. Au début du XX^e siècle, le bioéthanol était largement utilisé dans les pays d'Europe et aux États-Unis. L'intérêt croissant pour le bioéthanol et son adoption comme solution alternative par plusieurs pays a été observée au début des années 80 (Azhar *et al.*, 2017).

Longuement réputée pour ses performances fermentaires et grande résistance à l'éthanol, l'espèce *S. cerevisiae* a été beaucoup utilisée pour la production le bioéthanol (Choi *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Mussato *et al.*, 2012 ; Scordia *et al.*, 2012 ; Kumari *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2014 ; Mossi *et al.*, 2018). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté l'utilisation d'espèces de levures Non-*Saccharomyces* dans la production de bioéthanol telles que *Debaryomyces hansenii* (Calahorra *et al.*, 2009 ; Kurian *et al.*, 2010) ; *Rhodotorula mucilaginosa* (Bura *et al.*, 2012) ; *Pichia kudriavzevii* (Ndubuisi *et al.*, 2018 ; Akita *et al.*, 2021 ; Pongcharoen *et al.*, 2022).

Même s'il n'existe pas de méthodes universelles pour déterminer la résistance des micro-organismes à l'éthanol, des études se sont appuyées sur les valeurs relatives de la croissance cellulaire, la vitesse spécifique de production de l'éthanol, la viabilité cellulaire et le flux de protons à travers la membrane plasmique (Thomas & Rose, 1979 ; Beavan *et al.*, 1982 ; Dombek & Ingram, 1986 ; Birch & Walker, 2000 ; Jiménez & van Uden, 1985). Dans notre étude, la capacité des souches de levures à la fois *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae*) et Non-*Saccharomyces* (*Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia*

RESULTATS ET DISCUSSION

kudriavzevii) à produire de l'éthanol a été considérée. De façon générale, toutes les souches ont montré des performances fermentaires remarquables à travers une augmentation continue du volume de CO₂ ainsi que celle des valeurs de densité optique et une cinétique de consommation des sucres presque identique. Cette similarité observée au niveau des différentes souches se traduit également à travers le taux d'alcool produit qui est compris entre 7,01±0,007 et 7,38±0,063 %. Par ailleurs, la résistance à l'éthanol a été évaluée à travers la capacité des espèces de levures à produire de l'éthanol. Ainsi, le taux d'alcool de 7% v/v déterminé dans notre étude était similaire à celui trouvé par Yan *et al.* (2015) qui était de 7,34 % (v/v) mais largement en-dessous des valeurs trouvées par Singh *et al.* (2013) qui était de 15,3% (v/v), par Ishola *et al.* (2015) 37,1 % (v/v), par Moon *et al.* (2012) 86,1 % (v/v). Cette différence de taux d'alcool pourrait dépendre de plusieurs facteurs à savoir la niche écologique d'où a été isolée la souche de levure, la nature de la levure (*Saccharomyces* et Non-*Saccharomyces*), les conditions de fermentation (Température, vitesse d'agitation, durée de fermentation, pH du milieu de fermentation), matières premières (sorgho, maïs, blé, manioc...) (Azhar *et al.*, 2017). En effet, les conditions de fermentation étaient les suivantes : température de 25 °C, vitesse d'agitation de 120 rpm, durée de 120h, et la matière première était le moût sucré de sorgho. Par ailleurs, les espèces de levures Non-*Saccharomyces* ont montré une capacité à produire de l'éthanol au même titre que les espèces *Saccharomyces* et même plus. En effet, le taux d'alcool le plus important a été obtenu avec l'espèce Non-*Saccharomyces*, *Rhodotorula mucilaginosa*. Par exemple, selon Mussato *et al.* (2012), les souches *Pichia stipitis* (NRRL-Y-7124), et *Kluyveromyces fragilis* (Kf1) ont été signalées comme de bons producteurs d'éthanol à partir de différents types de sucres au même titre que l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (RL-11).

La seconde session de notre discussion a été consacrée à des essais de clarification de jus d'orange et d'ananas. Le jus de mucilage provenant de la décomposition des matériaux pectiques recouvrant les fèves de cacao, est très apprécié des populations paysannes (Carr, 1982). Toutefois après quelques jours de fermentation, il devient difficilement consommable à cause de sa teneur relativement élevée en éthanol et donc abandonné dans les champs sous forme de déchet (Anvoh, 2013). Ainsi, le jus de mucilage contient une teneur importante en pectine (Baensch, 2000 ; Barel, 2009 ; Anvoh, 2013). Les pectinases principalement utilisées pour la clarification des jus en industrie agroalimentaire sont de sources microbiennes (Kashap *et al.*, 2001 ; Duvetter *et al.*, 2005 ; Jayani *et al.*, 2005). L'utilisation d'enzymes d'origine microbienne présente plusieurs avantages à savoir un faible coût de production, la teneur en enzymes est plus prévisible et contrôlable, la disponibilité des matières premières pour la

RESULTATS ET DISCUSSION

production, et la production de masse sans autorisation éthique, réduction du taux de filtration, fournir une grande gamme de produits aux consommateurs (Vaillant & Dornier, 2001). Ainsi, Rai *et al.* (2006) ; Dedehou *et al.* (2015) ; Sharma *et al.* (2015) ; Utami *et al.* (2016) et Meryandini *et al.* (2017) ont souligné que les indicateurs les plus pertinents des jus clarifiés étaient la clarté, la couleur, le brunissement, le pH et la viscosité. Ainsi de façon générale, et quel que soit le jus et l'extrait enzymatique, une baisse du pH est observée par rapport au jus non clarifié (contrôle). Cette même observation a été faite par Adingra (2017) et Meryandini *et al.* (2017) respectivement dans les jus de pomme de cajou et de pomme. En effet, la diminution du pH est due à l'augmentation de la teneur en acide galacturonique dans le jus qui est le résultat de l'hydrolyse de la pectine par la pectinase ce qui rend le jus plus acide (Acar *et al.*, 1999). Cette diminution du pH est corrélée par une augmentation de l'acidité. La clarté est le résultat de la dépectinisation par addition de pectinases. La clarté de nos échantillons est supérieure à celles des jus non clarifiés. Cette augmentation de la clarté est accompagnée par une baisse de la couleur et celle du brunissement. La diminution d'intensité de couleur pourrait s'expliquer par la destruction des caroténoïdes responsables de la couleur. Ce même constat a été fait par Adingra (2017) et Meryandini *et al.*, (2017). Toutefois, les taux de clarté de notre étude restent inférieurs à ceux enregistrés par ces auteurs. La viscosité étant la résistance d'un fluide à l'écoulement, un liquide plus clair est moins visqueux. Ainsi, les valeurs de la viscosité de nos jus clarifiés sont inférieures à celles des jus non-clarifiés. Cette baisse de la viscosité est le résultat de la depectinisation obtenu par l'action des pectinases. Nos résultats sont conformes à ceux de Utami *et al.*, (2016) ; Adingra (2017) ; Meryandini *et al.*, (2017). En effet, ces auteurs ont observé une baisse de la viscosité de leurs échantillons ayant subis une clarification enzymatique par rapport au jus non clarifié. Ainsi, donc un jus clarifié est caractérisé par une augmentation de la clarté et une baisse de la couleur, de brunissement et de la viscosité. Par ailleurs, la variation des teneurs des composés phénoliques des jus d'orange et d'ananas serait le fait du traitement enzymatique. La pectinase pourrait influencer la teneur en composés phénoliques des jus de fruits clarifiés en particulier les tanins et donc leurs activités antioxydantes. En effet, les activités pectinolytiques pourraient affaiblir les cellules de la pulpe, libérant ainsi un jus inaccessible mais surtout des constituants liés aux parties solides, tels que les tanins. Ceci pourrait confirmer la teneur élevée en tanins totaux trouvée dans nos échantillons. Nos résultats sont en accord avec ceux de Wojdyło *et al.* (2011). En effet, pour ces auteurs, la pectinase a amélioré l'extraction des polyphénols. Ils ont montré que la teneur en

RESULTATS ET DISCUSSION

polyphénols des marcs traités avec la pectinase était plus élevée que le contrôle (marc non traité).

Conclusion partielle

Les applications biotechnologiques des espèces de levures résistantes à l'éthanol (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kurdiavzevii*) et celles productrices de pectinase (*Yarrowia lipolytica*) réalisées à travers la production de bioéthanol et la clarification des jus de fruits a permis de confirmer les propriétés de ses souches.

Ainsi, pour la première application biotechnologique, les espèces de levures résistantes à l'éthanol se sont montrées capables de produire du bioéthanol par fermentation alcoolique du moût sucré de sorgho avec à taux compris entre 7,01 et 7,38 % (v/v). De toutes les souches testées, l'espèce Non-*Saccharomyces*, *Rhodotorula mucilaginosa* a été la plus performante avec une production de bioéthanol au taux de 7,38 % (v/v).

La seconde application biotechnologique a été dédiée à la clarification des jus de fruits par les extraits de pectinase des souches de *Yarrowia lipolytica*. Ainsi, les pectinases produites par les souches de *Yarrowia lipolytica* étaient capables de clarifier les jus d'orange et d'ananas. Les jus clarifiés étaient caractérisés par une augmentation de la clarté et une baisse de la couleur, du brunissement, de la viscosité et du pH. Par ailleurs les jus clarifiés étaient également caractérisés par une augmentation de la teneur en composés phénoliques dont les activités antioxydantes correspondantes étaient principalement dues aux tanins totaux et aux flavonoïdes totaux.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail est une contribution à la valorisation du jus de mucilage de cacao. Considéré comme un déchet, le jus de mucilage provenant de la décomposition des matériaux pectiques recouvrant les fèves de cacao par les levures pourrait contenir des souches possédant des propriétés biotechnologiques. Ce travail réalisé en 3 grandes étapes a permis dans une première phase de faire le point sur l'état de connaissance du jus de mucilage de cacao et la caractérisation de ses paramètres biochimiques. La seconde phase expérimentale a été consacrée à la sélection et l'identification des souches de levures résistantes à l'éthanol et/ou productrices de pectinases et à l'application biotechnologique de celles-ci.

Il ressort de l'étude de l'état de connaissance sur le jus de mucilage de cacao qu'il est très connu des populations. De plus, ces dernières affirment que le jus a une durée maximale de conservation de 3 jours et possède des vertus bienfaitrices à savoir laxative, fortifiante et anti-diarrhéique. Par ailleurs, l'évolution des paramètres biochimiques, nutritionnelles, et fonctionnelles des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation à la température ambiante était irrégulière pour tous les jus analysés.

Pour la sélection des isolats de levures résistants à l'éthanol, seuls les isolats issus des jus dont le taux d'éthanol était compris entre 7 et 10 % (v/v) étaient sélectionnés. Ce sont donc les isolats provenant des jus de Akoupé, Yakassé-Attobrou et Tiassalé avec des taux respectifs d'éthanol de 9,83 % ; 8,74 % et de 7,21 %. L'identification moléculaire des isolats résistants à l'éthanol a révélé la présence de 5 espèces : *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kurdiavzevii*. La distribution de ces espèces était dépendante de la zone géographique.

Le screening et l'identification des isolats producteurs de pectinase ont révélé que tous les isolats appartenaient à l'espèce *Yarrowia lipolytica*. Les conditions optimales de production des pectinases étaient les suivantes : pH 5,5-6 ; température 30 °C ; durée 12 h incubation. Les activités maximales des extraits enzymatiques partiellement purifiés des 3 souches *Yarrowia lipolytica* sélectionnées étaient observées à pH 7 et à la température de 50-60 °C. Les valeurs de K_m des pectinases purifiées étaient 5 ; 2,74 et 2,53 mg/mL respectivement pour les souches Tias J0-6 ; YA J3-1 et Buy J2-1. Quant aux les valeurs V_{max} des souches, Tias J0-6 ; YA J3-1 et Buy J2-1, elles étaient de 0,0316 ; 0,032 et 0,053 mg/mL/min.

En ce qui concerne les applications biotechnologiques, les espèces de levures résistantes à l'éthanol (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kurdiavzevii*) et celles productrices de pectinase (*Yarrowia lipolytica*) ont été

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

testées. Ainsi, les espèces *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kurdiavzevii* ont montré une capacité à produire du bioéthanol dont le taux est compris entre 7,01 et 7,38 % (v/v). L'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* a produit le taux le plus élevé d'alcool avec 7,38 % (v/v).

L'étude portant sur la clarification des jus de fruits par les extraits de pectinase des souches de *Yarrowia lipolytica*, a permis de révéler que les pectinases produites par les souches de *Yarrowia lipolytica* étaient capables de clarifier les jus d'orange et d'ananas. En effet, les jus clarifiés présentaient une augmentation de la clarté et une baisse de la couleur, du brunissement, de la viscosité et du pH. Aussi, les jus clarifiés étaient-ils également marqués par une augmentation de la teneur en composés phénoliques et dont les tanins totaux et les flavonoïdes totaux étaient les principaux composés responsables des activités antioxydantes.

Ces résultats permettent d'ouvrir de nombreuses perspectives de recherche. Ainsi, d'autres matières premières et d'autres conditions de fermentations pourront être testées pour la production de bioéthanol. Aussi, le bioéthanol produit pourra-t-il être utilisé pour des essais de production de biocarburant. D'autre part, une combinaison d'extraits enzymatiques de nos souches pourrait être utilisée afin d'optimiser la clarification. Des essais de clarification de jus plus denses pourront également être testés.

Ainsi, les industries, les coopératives agricoles œuvrant dans le domaine des biotechnologies sont invitées à se pencher sur le jus de mucilage de cacao qui regorge de beaucoup de potentialités.

Comme recommandation, nous invitons les acteurs de la chaîne de valeur cacao à s'investir dans les produits générés lors du processus de traitement des fèces de cacao notamment le jus de mucilage de cacao. Le jus de mucilage au regard de ses importantes valeurs nutritives, fonctionnelles et biotechnologiques pourrait être une source de revenu additionnelle pour les ménages de producteurs.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

1. Adabe E.K. & Ngo-Samnack E.L. (2000). Production et transformation du cacao, Centre technique de coopération agricole et rurale (CTA), Collection Pro-Agro, 42p.
2. Acar J., Alper N. & Esturk O. (1999). The Production of cloudy apple nectar using total liquefaction enzymes. *Fruit Process*, 8: 314-317.
3. Adingra K. M-D. (2017). Potentialités alimentaires et technologiques de l'épicarpe du fruit du papayer (*Carica papaya* cv. solo 8) : caractérisation biochimique et application de ses enzymes pectinolytiques. Thèse de Doctorat, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, 217p.
4. Afoakwa E.O. (2010). Chocolate science and technology. 1ST Edition, Wiley-Blackwell, Oxford, England, Vol 1, 275p.
5. Aka S., Dje K.M., Fokou G., Doumbia M., Ahoussi J.M-S. & Bonfoh B. (2017). Production et consommation du Tchapalo à Abidjan : Typologie des brasseuses et des consommateurs. *European Scientific Journal*, 13 : 148-163.
6. Akita H., Goshima T., Suzuki T., Itoiri Y., Kimura Z.I. & Matsushika A. (2021). Application of *Pichia kudriavzevii* NBRC1279 and NBRC1664 to simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. *Fermentation*, 7 (83), 1-14.
7. Albersheim P. (1966). Pectin lyase from fungi, in *Methods in enzymology*. (edited by E F Neufeld & Genburg) Academic press, New York, 8 : 628-635.
8. Alexandre H., Ansanay-Galeote V., Dequin S. & Blondin B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 498, 98–103.
9. Alkorta I., Gabirsu C., Lhama M.J & Serra J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 33 : 21-28.

RÉFÉRENCES

10. Alio M.A. (2021). Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multiressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique. Génie des procédés. Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 197 p.
11. Ameko E. (1998). Use of *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 52712) as a source of pectolytic enzymes to facilitate pineapple juice extraction, master diss, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, 65 p.
12. Anvoh K.Y.B. (2013). Caractérisation physico-chimique et microbiologique du jus de mucilage de la fève fraîche de cacao (*Theobroma cacao L.*) et sa transformation en produits dérivés : alcool, jus stabilisé, marmelade, pâte à tartiner, vinaigre. Thèse unique de Doctorat, Université Nangui Abrogoua, Faculté des Sciences et Technologie des Aliments, Abidjan, Côte d'Ivoire, 154 p.
13. Andriantsitohaina R. & Martin S. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 51: 304-315.
14. Anosike E.O. (2001). Basic Enzymology. University of Port Harcourt Press, 87 p.
15. AOAC. (1990). Official methods of analysis. AOAC, 15th Edition, Washington DC, 684 p.
16. Audigié C.I., Figarella J. & Zonszain F. (1980). *Manipulations d'analyse biochimique*. Doin Editeurs, Paris, France, 274p.
17. Arana-Sanchez A., Segura-Garcia L. E., Kirchmayr M., Orozco-Avila I., Lugo Cervantes E. & Gschaedler-Mathis A. (2015). Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31 : 359-369.

RÉFÉRENCES

18. Ayindé O.E., Ojo V., Adeyina A.A. & Adesoye A. (2010). Economics of using cocoa bean shell as feed supplements of rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(2): 195-197.
19. Ardhana M. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86 : 87–99.
20. Ardhana M.M. & Fleet G.H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 2732: 1–13.
21. Azhar M.S.H., Abdulla R., Jambo S.A., Marbawi H., Gansau J.A., Mohd Faik A.A. & Rodrigues K.F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *biochemistry biophysics reports*, 6 (10): 52-61.
22. Baensch W. (2000). Aliments et breuvages aromatiques à partir du cacao. gate Information Service, gtz, 18 p.
23. Bankoffi L., Ouattara G. H., Karou T. G., Guehi S. T., Nemlin J. G. & Diopoh J. K. (2014). Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *Agronomie Africaine*, 25(2): 159-170.
24. Banu A.R., Kalpana M.D., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V. & Palaniswamy M. (2010). Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3: 377-381.
25. Barel M. (1998). La première transformation du cacao. *Cahiers des Ingénieur Agronomes*, 448: 14–15.
26. Barel M. (2009). Les cacaos d'Amérique du Sud. *Chocolat et Confiserie Magazine*, 431: 73-75.
27. Barel M. (2013). De la cabosse à la tablette ; Éditions Quae, Versailles, France, 133 p.

RÉFÉRENCES

28. Barese R.I., Chellegatti M.A.S.C., Fonseca M.J.V. & Said S. (2001). Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 : 327–330.
29. Bazarte H., Sangronis E. & Unai E. (2008). Cocoa (*Theobroma cacao L.*) Hulls: a possible commerce source of pectins. *Sociedad Latino americana de Nutrition*, 58 (1): 64-70.
30. Beavan M.J., Charpentier C. & Rose A.H. (1982). Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Journal of General Microbiology*, 128 : 1447-1455.
31. Beckett S.T. (2009). Industrial chocolate manufacture and use. *Wiley-Blackwell, New York, Etats- Unis* 4ème édition: 192 p.
32. Behera B.C., Yadav H., Singh S.K., Mishra R.R., Sethi B.K., Dutta S.K. & Thatoi H.N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia sp.* isolated from mangrove soil of Mahanadi River delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 169 – 178.
33. Biehl B., Meyer B., Crone G., Pollmann L. & Said M. B. (1989). Chemical and physical changes in the pulp during ripening and postharvest storage of cocoa pods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 48 (2): 189-208.
34. Biely P., Benen J.A.E., Heinrichova K., Kester H.C.M. & Visser J. (1996). Inversion of configuration during hydrolysis of alpha-1,4-galacturonidic linkage by three *Aspergillus* polygalacturonases. *FEBS Letters*, 382: 249-255.
35. Birch R.M. & Walker G.M. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, 26: 678–687.

RÉFÉRENCES

36. Birgisson H., Delgado O., Garcia B., Arroyo L., Hatti-Kaul R. & Mattiasson B. (2003). Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases. *Extremophiles*, 7: 185–193.
37. Biryukova E.N., Arinbasarova Y.A. & Medentsev A.G. (2009). Adaptation of the yeast *Yarrowia lipolytica* to ethanol. *Microbiology*, 78: 2, 154–159.
38. Black R.E., Morris S.S. & Bryce J. (2003). Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*, 361 : 2226-2234.
39. Blanco P., Sieiro C., Diaz A. & Villa T.G. (1994). Production and partial characterization of an endo-polygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 974-977.
40. Blanco P., Thow G., Simpson C.G., Villa T.G. & Williamson B. (2002). Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*, 210 (2): 187-91.
41. Bloch S.A (2014). Les polyohénols du cacao. Edition Lavoisier, Paris, France, 5 p.
42. Borkar P.S., Bodade R.G., Rao S.R. & Khobragade C.N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 (2): 358–366.
43. Bonaparte A., Alikhani Z., Madramootoo C.A. & Raghavan V. (1998). Some quality characteristics of solar-dried cocoa beans in St Lucia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (4): 553-558.
44. Bouet C. (1977). Bettié et Akiékrou: Etude comparée de deux terroirs en zone forestière ivoirienne (No. 13). IRD Edition, Paris, France, 390 p.

RÉFÉRENCES

45. Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Paris, France, 364 p.
46. Bouatenin K.M.J.P., Djeni N.T., Kouame K. A., Coulibaly W. H. & Dje K.M. (2019). Excretion of β -glucosidase and pectinase by microorganisms isolated from cassava traditional ferments used for attieke production in Côte d'Ivoire. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20: 1-18.
47. Bura R., Vajzovic A. & Doty S.L. (2012). Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. *Journal Indian of Microbiology and Biotechnology*, 39: 1003–1011.
48. Brand-Williams W., Cuvelier M.E. & Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28 : 25-30.
49. Braudeau J. (1969). Le cacaoyer. Techniques agricoles et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 304 p.
50. Brudieux V. (2007). Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermo-cosmétique. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Limoges, France, 220 p.
51. Calahorra M., Sánchez N.S. & Antonio Peña, A. (2009). Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*, *FEMS Yeast Research*, 9 (8): 1293–1301.
52. Camu N., De Winter T., Verbrugghe K., Cleenwerck I., Vandamme P., Takrama J.S., Vancanneyt M. & De Vuyst L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1809–1824.

RÉFÉRENCES

53. Camu N., González A., Winter T.D., Schoor A.V., Bruyne K.D., Vandamme P., Takrama S.T., Addo K.S. & Vuyst D. L. (2007). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and Acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied Environmental Microbiology*, 86-98.
54. Carl L.K., Roberta R.H., Patricia I.O., César G.F. & Harold H.S. (2005). Dietary polyphenols and health: Proceedings of the 1st International Conference on Polyphenols and Health. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 298-303.
55. Carlier R. (2016). Le cacao « Mercedes », fève en or des planteurs ivoiriens. In *Le Monde Afrique*, 2p.
56. Carr J.G. (1982). Cocoa. In: Rose, A.H. Edition *Fermented Foods: Economic Microbiology*, Academic Press, 7 London, UK, 292 p.
57. Castruita-Dominguez J.P., Gonzalez-Hernandez S.E., Polaina J., Flores-Villavicencio L.L., Alvarez-Vargas A., Flores-Martinez A., Ponce Noyolan P. & Leal-Moralesn C.A. (2014). Analysis of a polygalacturonase gene of *Ustilaga maydis* and characterization of the encoded enzyme. *Journal Basic of Microbiology*, 54: 340–349.
58. Champagne P. (2008). Chapter 9 - Biomass, in T. M. Letcher (ed.), *Future Energy*, Elsevier, Oxford, 170 p.
59. Chan H.T. & Cavaletto C.G. (1986). Effects of deaeration and storage temperature on quality of aseptically packaged guava puree. *Journal of Food Science*, 51: 165-171.
60. Chen-Yen-Su. A. (2020). Analyse du potentiel qualitatif des cacaos de Madagascar. Thèse de l'Université de la Reunion, Antananarivo, Madagascar, 236p.

RÉFÉRENCES

61. Chen Y., Sun D., Zhou Y., Liu L., Han W., Zeng B., Wang Z. & Zang Z. (2014). Cloning, expression and characterization of a novel thermophilic polygalacturonase from *Caldicellulo siruptorbescii* DSM 6725. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 5717–5729.
62. Choi G.W., Um H.J., Kim Y., Kang H.W., Kim M., Chung B.W. & Kim Y.H. (2010). Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on Cassava starch. *Biomass-Bioenergy*, 34: 1223–1231.
63. Cocolin L., Visintin S., Alessandria V., Valente A. & Dolci P. (2016). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa beans fermentation in West Africa. *International journal of food microbiology*, 216: 69–78.
64. Combo A.M.M., Aguedo M., Goffin D., Wathelet B. & Paquot M. (2012). Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 588-596.
65. Combo A.M., Aguedo M. & Paquot M. (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnology Agronomy Society Environment*, 15 (1): 153-164.
66. Colonges K. (2021). Contribution à l'étude des déterminants génétiques et biochimiques des arômes des cacaos fins d'Equateur : Le Nacional, de la diversité aromatique de sa population d'origine jusqu'à sa domestication récente. Sciences agricoles. Université Montpellier, Montpellier, France, 225 p.
67. Coulibaly W.H., N'guessan K.F., Coulibaly I., Cot M., Rigou P. & Djè K.M. (2017). Influence of freeze-dried yeast starter cultures on volatile compounds of Tchapalo, a Traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. *Beverages*, 2 : 1-9.

RÉFÉRENCES

68. Coulibaly W.H., Cot M., N'guessan K.F., Coulibaly I., Rigou P. & Djè K.M. (2018). Ethanol effect on yeast strains isolated from tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. *International food research journal*, 25 (2): 612-619.
69. Cook L.R. (1982). Chocolate production and use. E.H. Meursing (Rev.). Harcourt Brace Javanovich, Inc. New York, 185-187 p.
70. Craack M., Mikkelsen M. B., Saerens S., Knudsen M., Blennow A., Lowor S. & Nielsen D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1): 103-116.
71. Craack M., Keul H., Eskildsen C.E., Petersen M.A., Saerens S., Blennow A., Skovmand-Larsen M., Swiegers J.H., Petersen G.B., Heimdal H., Nielsen D.S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63: 306–316.
72. Cruz C., Souza G. & Cortez L. (2014). Chapter 11 - Biofuels for transport, Future Energy, second edn, Elsevier Ltd., London, UK, 244 p.
73. Daniel H.-M., Vrancken G., Takrama J.F., Camu N., De Vos P. & De Vuyst L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9 : 774–783.
74. Dange V.U., & Harke S. (2018). Production and purification of Pectinase by fungal strain in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *International Journal of Life Sciences Research*, 6 : 83-95.
75. Davey R.T., Murphy R. L. & Graziano F. M. (2000). Immunologic and virologic effect of subcutaneous interleukine-2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized control trial. *Jama*, 284 : 183-189.

RÉFÉRENCES

76. Dedehou S.C.AE., Dossou J. & Soumanou M.M. (2015). Etude diagnostique des technologies de transformation de la pomme de cajou en jus au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9 (1) : 371-387.
77. Dejob M., (2013). Etudes structurales et fonctionnelles d' α -glucosidases bactériennes. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, 208 p.
78. Demirbas A. (2010). Use of algae as biofuel sources, *Energy Conversion and Management*, 51: 2738–2749.
79. De Melo Pereira G.V., Magalhães K.T., de Almeida E.G., da Silva Coelho I. & Schwan R.F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physicochemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2): 121-133.
80. De Vuyst L., Lefeber T., Papalexandratou Z. & Camu N. (2010). The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: novel applications*, 301-325.
81. Dixit S., Upadhyay K., Singh H., Pandey B., Chandrashekar K., & Verma C. (2013). Pectin Methylesterase of *Datura* species, Purification, and characterization from *Daturastramonium* and its application. *Plant Signaling & Behavior*, 8 (100) : 1- 8.
82. Djedjro C. A., Assidjo N. E. & Yao B. (2008). Effet des dispositifs de séchage à l'air libre sur la qualité des fèves de cacao bord champ. *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologie*, 11: 45-48.
83. Dombek K.M. & Ingram L.O. (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Applied of environmental microbiology*, 52: 975–981.

RÉFÉRENCES

84. Doyle M.P., Beuchat L.R. & Montville T.J. (2001). Cocoa and coffee. *Food Microbiology*, 720-733.
85. Duvetter T., Loey V.A., Smout C., Verlent I., Ly-Nguyen B. & Hendrickx M. (2005). *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase: study of the inactivation by temperature and pressure and the inhibition by pectin methylesterase inhibitor. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 385-390.
86. Dzogbefia V.P., Ametefe G.D. & Kwatia C.A.S. (2017). Optimal conditions for pectinase production by *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 52712) in solid state fermentation and its efficacy in orange juice extraction. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3 : 78-86.
87. Elena D.M. & Danilo E. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the catalenesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117 : 201-210.
88. Eschstruth A. & Divol B. (2011). Comparative characterization of endo-polygalacturonase (Pgu1) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91 : 623–634.
89. Escobar J.C., Lora E.S., Venturini O.J. Yáñez E.E., Castillo E.F. & Almazan O. (2009). Biofuels: Environment, technology, and food security, Renewable and Sustainable. *Energy Reviews*, 13(6): 1275–1287.
90. FAO. (2002). Food energy-methods of analysis and conversion Factors. FAO Ed.Rome, 97 p.
91. Favela-Torres E., Volke-Sepulveda T. & Viniestra-Gonzalez G. (2006). Production of hydrolyticdepolymerising pectinases. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2) : 221-227.

RÉFÉRENCES

92. Favey S., Bourson C., Bertheau Y., Kotoujansky A. & Boccara, M. (1992). Purification of the acidic pectate lyase and nucleotide sequence of the corresponding gene (*pelA*) of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Journal Genetic Microbiology*, 138: 499-508.
93. Forgarty W.M. & Kelly C.T. (1983). Pectic enzymes. *Microbiology Enzymes and Biotechnology*, 32: 371-377.
94. Gagnon M.C. (2009). Production et optimisation d'une pectinase en vue de son utilisation dans le procédé de fabrication du papier. Thèse de Doctorat : Biophysique et Biologie Cellulaires. Université du Québec à Trois-Rivières, Canada, 305 p.
95. Gainvors A., Nedjaoum N., Gognies S., Muzart M., Nedjma M. & Belarbi A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the *PGL1-l* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 183: 131-135.
96. Garcia-Armisen T., Papalexandratou Z., Hendryckx H., Camu N., Vrancken G., De Vuyst, L. & Cornelis P. (2010). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16S rRNA gene clone library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 2281–2292.
97. Gary W. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57 : 48– 57.
98. Ghannam M. (2009). Production des pectinases chez des micro-organismes : mise en évidence d'une activité pectate lyase thermostable chez une souche d'actinomycète isolée du compost de poulet. Université de Annaba-Badji Mokhtar, Alger, Algérie, 146p.

RÉFÉRENCES

99. Gibson B.R., Lawrence S.J., Leclaire J.P.R., Powell C.D. & Smart K.A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31: 535–569.
100. Gilet F. (200). Le cacao : des olmèques au XXIème siècle. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Nantes, Nantes, France, 120 p.
101. Gognies S., Gainvors A., Aigle M. & Belarbi A. (1999). A Cloning, sequence analysis and over-expression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGL1*). *Yeast*, 15: 11–22.
102. Gonzalez S.L. & Rosso N.D. (2011). Determination of pectin methylesterase activity of commercial pectinases and study of the inactivation kinetics through two potentiometric procedures. *Revista de Ciências Tecnológicas de Alimentos, Campinas*, 31: 412-417.
103. Guehi T.S., Dingkuhn M., Cros E., Fourny G., Ratomahenina R., Moulin G. & Clement A. (2007). Identification and lipase producing abilities of moulds isolated from Ivorian raw cocoa beans. *Research Journal of Applied Biological Sciences*, 3: 838-843.
104. Guehi S.T., Dabonne S., Ban-Koffi L., Kedjebo D.K. & Zahouli G.I.B. (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Journal of Food Science and Technology*, 2(3) : 163-171.
105. Hamdouche Y. (2015). Discrimination des procédés de transformation post-récolte du Cacao et du Café par analyse globale de l'écologie microbienne. Thèse de Doctorat, Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier, France, 319 p.
106. Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., & Poutanen H. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 1365-1402.

RÉFÉRENCES

107. Herrero M., Cuesta I., García L.A. & Díaz M. (1999). Changes in organic acids during malolactic fermentation at different temperatures in yeast fermented apple juice. *Journal of the Institute of Brewing*, 105: 191-195.
108. Hii C. L., Law C. L., Cloke M. & Suzannah S. (2009). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering*, 102(2) : 153-161.
109. Hoekman S.K. (2009). Biofuels in the US-challenges and opportunities. *Renewable energy*, 34: 14–22.
110. Holt R. (2002). Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after consumption of a flavanol-rich cocoa. *American Journal of clinical Nutrition*, 76: 798-804.
111. Hulgán T., Raffants S., Kheshti A., Blackwell B.R., Roberto F.P., Barkaing G., Ritz B. & Sterling R.T. (2005). CD4 Lymphocytes Percentage Predicts Diseases Progression in HIV-infected Patients in acting Highly active antiretroviral therapy with CD4 lymphocytes counts ≥ 350 Lymphocytes/mm³. *Journal of Infectious Diseases*, 192: 950-957.
112. ICCO: International cocoa organization. 2019. The world cocoa economy, status, challenges and prospects (http://unctad.org/meetings/en/Presentation/SUC_MEM2014_09042019_ICCO.pdf)
113. Enzymes market (2017). Types (carbohydrase, protease, lipase), applications (food & beverages, cleaning agents, bio-fuel, animal feed), & geography –. Global Trends & Forecasts.
114. Ishola M.M., Brandberg T. & Taherzadeh M.J. (2015). Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. *Biomass Bioenergy*, 77: 192–199.

RÉFÉRENCES

115. Ismail F., Anjum M.R., Mamon A.N. & Kazi T.G. (2011). Trace metal contents of vegetables and fruits of Hyderabad Retail Market. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 365-372.
116. Isono N., Hayakawa H., Usami A., Mishima T. & Hisamatsu M. (2012). A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113: 76-78.
117. Jaafar S., Abdelnajib N. & Moharned (2006). Sélection biochimique d'*Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* de tubercules de betterave sucrière atteints de pourriture molle. *Société de Pharmacie de Bordeaux*, 46: 53-60.
118. Johns T., Smith L.F. & Eyzaguirre P.B. (2006). Understanding the links between agriculture and health. *International Food Policy research institute*, 13: 1-30.
119. Israel, D.G. (1992). Determining sample size. University of Florida. fact sheet PEOD-6, 5. Johnston, R.W., Tompkin, R.B., 1992. meat and poultry products. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American public health association, Washington DC, USA, 835 p.
120. Jacquet M., Vincent J.C., Halm J. & Lotode R. (1980). Le séchage artificiel des fèves de cacao. *Cafe Cacao Thé*, 24: 43-56
121. Jayani R.S., Saxena S. & Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemical*, 40: 2931-2944.
122. Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. & Brulé G. (2007). *Science des aliments : Technologie des produits alimentaire*, Edition Tec & Doc, Lavoisier, volume 2, 456 p.
123. Jespersen L., Nielsen D.S., Hønholt S., & Jakobsen M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5 : 441–453.

RÉFÉRENCES

124. Jeyaram K., Singh W.M., Capece A. & Romano P. (2008). Molecular identification of yeast species associated with 'hamei', a traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology*, 124 : 115-125.
125. Jia J. & Wheals A. (2000). Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *CUIT Genetic*, 38(5) : 264-70.
126. Jiménez J. & Van Uden N. (1985). Use of extracellular acidification for the rapid testing of ethanol tolerance in yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1596–1598.
127. Jolly N.P., Varela C. & Pretorius I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14: 215–237.
128. Kars I., Mc Calman M., Wagemakers L. & Van Kan J.A. (2005). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: *Bcpme1* and *Bcpme2* are dispensable for virulence of strain B05-10. *Molecular Plant Pathology*, 6: 641–652.
129. Kashyap D.R., Chandra S., Kaul A., & Tewari R. (2000). Production, Purification and Characterization of Pectinase from a *Bacillus sp.* DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnoogy*, 16: 277-282.
130. Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., & Tewari R. (2001). Applications of Pectinases in commercial sector: a review. *Bioresources Technology*, 77 : 215–227.
131. Kedjebo K.D. (2016). Effet des traitements technologiques post-récolte sur la contamination du cacao (*Theobroma cacao* L.) par les moisissures mycotoxinogènes et l'ochratoxine A. Thèse de doctorat : Biochimie et technologies des aliments, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, 195 p. :

RÉFÉRENCES

132. Kennedy A.J. (1995). Cacao *Theobroma cacao* (Sterculiaceae). In: Longman (eds), London Evolution of Crops, 475 p.
133. Kester H.C.M., Kusters-Van Someren M. & Visser J. (1996). Primary structure and characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *European Journal of Biochemistry*, 240: 738-746.
134. Kim J.H., Ryu J., Huh I.Y., Hong S.K., Kang H.A. & Chang Y.K. (2014). Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37: 1871–1878.
135. Kiran B., Kumar R., & Deshmukh D. (2014). Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy Conversion and Management*, 88: 1228–1244.
136. Koffi B.L., Ouattara G.H., Karou T.G., Guehi S.T., Nemlin J.G. & Diopoh J.K. (2013). Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *Agronomie Africaine*, 25 (2): 159–170.
137. Kondo K., Hirano R., Matsumoto A., Igarashi O. & Itakura H. (1996). Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet*, 348: 51-56.
138. Kouakou B.J., Irie B.Z., Dick E., Nemlin G. & Bomisso L.E. (2013). Caractérisation des techniques de séchage du cacao dans les principales zones de détermination de leur influence sur la qualité des fèves commercialisées. *Journal of Applied Biosciences*, 64 (1): 4797-4812.
139. Kumar A. & Sharma R. (2012). Production of alkaline pectinase by bacteria (Cocci species) isolated from decomposing fruit materials. *Journal of Phytochemical*, 4 (1): 1-5.
140. Kumar Y.S., Vijayakumar P. & Reddy O.V.S. (2012). Pectinase production from mango peel using *Aspergillus foetidus* and its application in processing of mango juice. *Food Biotechnology*, 26: 107–123.

RÉFÉRENCES

141. Kumari R. & Pramanik K. (2013). Bioethanol production from *Ipomea Carnea* biomass using a potential hybrid yeast strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171: 1771–1785.
142. Kurian J.K., Ashok M.K., Banerjee A. & Kishore V.V.N. (2010). Bioconversion of hemicellulose hydrolysate of sweet sorghum bagasse to ethanol by using *Pichia stipitis* NCIM 3497 and *Debaryomyces hansenii* sp. *BioResources*, 5 (4): 2404-2416.
143. Lachenaud P., Mooleedhar V. & Couturier C. (1997). Les cacaoyers spontanés de Guyane. Nouvelles prospections. *Plantations, Recherche, Développement*, 4, (1): 25-32.
144. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 658- 685.
145. Lagunes-Gálvez S., Loiseau G., Paredes J. L., Barel M. & Guiraud J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1): 124-130.
146. Lai Q.P. (2010). Utilisation de levures non-*Saccharomyces* en œnologie : études des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. PhD, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France, 245 p.
147. Lainé K. (2001). Survey of farming practices on cocoa farms in Côte d’Ivoire. Rapport d'étude de terrain, 28 p.
148. Lamrini S. (2012). Études préliminaires des propriétés physico-chimiques de cellulases et pectinases chez des isolats microbiens. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc, 79 p.

RÉFÉRENCES

149. Lee K., Kim Y., Lee H. & Lee C. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 72-92.
150. Lefeber T., Gobert W., Vrancken G., Camu, N. & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28: 457–464.
151. Lemberg G., Körner R., Christensen T.M.I.E., Roepstorff P. & Mikkelsen J.D. (2000). Analysis of pectine structure. I Analysis of different de-esterification mechanisms by enzymatic fingerprinting using endo-pectnlyase and endo-polygalactuonase II from *A. niger*. *Cabohydrates Research*, 327: 293-307.
152. Levy Y., Capitant C. & Houhou S. (1999). Comparaison fo sub-contaneous and intravenous interleukine-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomized controlled trial» *Lancet*, 353: 1923-1959.
153. Lima L.J.R., Almeida M.H., Nout M.J.R. & Zwietering, M.H. (2011). *Theobroma cacao* L., the food of the gods: quality determinants of commercial cocoa beans, with reference to the impact of the fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (8): 731-761.
154. Lineweaver H. & Burk K. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal American Chemical of Society*, 56: 658-666.
155. Little A.D. (2004). Comité Biotechnologies de LEEM, 2 novembre 2004, 95 p.
156. Liuk L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H. & Zeng X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food chemistry*, 112: 35– 41.
157. Loor R. G., Risterucci A. M., Courtois B., Fouet O., Jeanneau M., Rosenquist

RÉFÉRENCES

E., Amores F., Vasco A., Medina M. & Lanaud C. (2009). Tracing the native ancestors of

RÉFÉRENCES

- the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics and Genomes*, 5 (3): 421-433.
158. Lopez A.S., & Dimick P.S. (1995). Cocoa fermentation. In: Reed, G., Nagodawithana, T.W. (Eds.), *Enzymes, Biomass, Food and Feed*, 2nd ed. Biotechnology, vol. 9. VCH, Weinheim, 577 p.
159. Lu J., Li X. & Yang R. (2013). Fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation of reed pretreated with liquid hot water for bio-ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresources Technology*, 144: 539–547.
160. Lyumugabe F., Kamaliza G., Bajyana E. & Thonart P. (2010). Microbiological and physico-chemical characteristic of Rwandese traditional beer “Ikigage”. *African Journal of Biotechnology*, 9: 4241-4246.
161. Macheix J.J., Fleuriet A. & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 185 p.
162. Made M.A. & Graham H.F. (2003). The microbiology ecology of cocoa bean fermentation in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 87-99.
163. Manashi J., Madhur N., & Ravindra, A. (2014). Characterization, Kinetic and Thermodynamic Studies of Marine Pectinase from *Bacillus subtilis*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45: 205-250.
164. Mao T.K., Van De Water J., Keen C.L., Schmitz H.H. & Gershwin M.E. (2003). Cocoa flavonols and procyanidins promote transforming growth factor- β_1 homeostasis in peripheral blood mononuclear cells. *Experimental Biology and Medicine*, 228: 93-99.

RÉFÉRENCES

165. Martins E.S., Leite R.S.R., Silva R. & Gomes E. (2013). Purification and properties of polygalacturonase produced by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on solid-state fermentation. *Enzyme Research*, 1-7.
166. Mathur S., Devaraj S. & Jialal I. (2002). Cocoa products decrease Low Density Lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammatory inhumans. *Journal of Nutrition*, 132: 3663–3667.
167. Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J. & Nacoulma O.G. (2005). Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honeys as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571-577.
168. Mehri-Kamoun R. (2001). Effet de la pectolyase Y-23 et de la cellulase RS sur le rendement en protoplasts viables de *Prunus cerasus* L. “Montmorency”. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 5 (2): 99-104.
169. Mendes-Ferreira A., Barbosa C., Lage P., Esteves M., Chambel L. & Mendes-Faia, A. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from Douro wine region. *Fermentation*, 4 (8) : 1-19.
170. Merín M.G., Martín M.C., Rantsiou K., Cocolin L. & Morata de Ambrosini V.I. 2015. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. *Brazilian journal of microbiology*, 46, 3: 815-823.
171. Meryandini A., Cokok A.M. & Fahrurrozi B. (2017). Pectinase production and clarification treatments of apple (*Malus domestica*) juice. *Annales Bogorienses*, 21: 63-68.
172. Micheli F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6 (9): 414-419.
173. Miller G.L. (1959). Use of dinitro salicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.

RÉFÉRENCES

174. Moon S.K. Kim S.W. & Choi G.W. (2012). Simultaneous saccharification and continuous fermentation of sludge-containing mash for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321, *Journal of Biotechnology*, 157: 584–589.
175. Mounjouenpou P. (2008). *Aspergillus* noirs producteurs d'ochratoxine A dans le cacao Biodiversité et incidence des traitements post-récolte au Cameroun. Thèse unique de Doctorat, Université Montpellier 2 Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 156 p.
176. Moscatto J.A., Prudêncio-Ferreira S.H. & Haully, M.C.O. (2004). Yacon meal and inulin as ingredients in chocolate cake preparation. *Giência et Tecnologia dos Alimentos*, 24: 634-640.
177. Mossi I., Kouwanou C.S., Agbangnan P.D.C., Adjou E.S., Gbohaida V. & Sohounhloué D.C.K. (2018). Production du bioéthanol par fermentation du moût de tiges de *Sorghum saccharatum* (L.) du Bénin. *Revue Internationale des Sciences Appliquées*, 4: 29-35.
178. Mossu G. (1990). Le cacaoyer : le technicien d'agriculture tropicale. Païs, Francia, Institut de Recherches de Café et du Cacao. *Les Cahiers d'Outre-Mer*, 44-174.
179. Motamayor J. C., Risterucci A. M., Heath M. & Lanaud C. (2003). Cacao domestication II:
180. progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91(3): 322-330.
181. Moyo S., Gashea B.A., Collisona E.K. & Mpuchane, S. (2003). Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 87-100.
182. Murphy K.J., Chronopoulos K.A., Singh I., Maureen A.F., Moriarty H., Marilyn J.P., Turner A.H., Mann N.J. & Sinclair A.J. (2003). Dietary flavanols and procyanidin

RÉFÉRENCES

- oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit plate let function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 1466-1473.
183. Mussato S.I., Machado, E.M.S., Carneiro, L.M. & Teixeira J.A. (2012). Sugar metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied. Energy*, 92: 763–768.
184. Ndubuisi I.A., Nweze J.E., Onoyima N.J., Yoshinori M. & Ogbonna, J.C. (2018). Ethanol production from cassava pulp by a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* LC375240. *Energy and Power Engineering*, 10: 457-474.
185. N’guessan K.F., Aka S., Djeni N.T. & Dje K.M. (2008). Effect of traditional starter inoculation rate on sorghum beer quality. *Journal of Food Technology*, 6 (6): 271-277.
186. N’Guessan F.K., Coulibaly H.W., Alloue-Boraud M.W., Cot M. & Djè K.M. (2016). Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo. *Food of Science and Nutrition*, 4: 34–41.
187. Nielsen D.S., Hønholt S., Tano-Debrah K., & Jespersen L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22: 271–284.
188. Nielsen D.S., Teniola O.D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T. & Holzapfel W.H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 168–186.
189. Nielsen D.S., Snitkjaer P. & van den Berg F. (2008). Investigating the fermentation of cocoa by correlating Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles and Near Infrared spectra. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 133–140.

RÉFÉRENCES

190. Nielsen D.S., Crafac M., Jespersen L. & Jakobsen M. (2012). The microbiology of cocoa fermentation. In: Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S. (Eds.), *Chocolate in Health and Nutrition*. Humana Press, 60 p.
191. Niemenak N., Rohsiusb C., Elwersb S., Ndoumou D.O. & Liebere R. (2004). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of food composition and analysis*, 19: 612-619.
192. Nigam P.S. & Singh A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progress in Energy and Combustion Science*, 37: 52–68.
193. Nisiotou A.A., Spiropoulos A.E. & Nychas G.J.E. (2007). Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis affected grape must fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 73: 6705– 6713.
194. Niture S.K., Pant A. & Kumar A.R. (2001). Active site characterization of the single endo-polygalacturonase produced by *Fusarium moniliforme* NCIM 1276. *European Journal of Biochemistry*, 268 : 832–840.
195. OCDE-FAO, Perspectives Agricoles de l’OCDE et de la FAO 2020-2029, Paris, Editions OCDE, juillet (2020). <https://www.oecd.org/fr/publications/perspectives-agricoles-de-l-ocde-et-de-la-fao> 19991150.htm consulté en février 2023.
196. Okonji R.E., Itakorode B.O., Ovumedia J.O. & Adedeji O.S. (2019). Purification and biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of decomposing plant materials. *Journal Applied of Biology and Biotechnology*, 7: 1-8.

RÉFÉRENCES

197. Okuma Y., Endo A., Iwasaki H., Ito Y. & Goto S. (1986). Isolation and properties of ethanol-using yeasts with acid and ethanol tolerance. *Journal of Fermentation Technology*, 64: 379-382.
198. Opeke L. (1982). Optimising economic returns (profits) from cocoa by-products. School of Agriculture and Agricultural Technology. Akure, Nigeria, 88p.
199. Oussou K.F., Guclu G., Kelebek H. & Selli S. (2022). Elucidating the contribution of microorganisms to the spontaneous fermentation and the quality of Ivorian cacao (*Theobroma cacao*) beans: The quality of Ivorian cacao (*Theobroma cacao*) beans. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 14 (4): 23–35.
200. Osakabe N., Yasuda A., Natsume M. & Takizawa T. (2002). Catechins and their oligomer linked by C4C8 bonds are major cocoa polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation *in Vitro*. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 51.
201. Owusu M. (2010). Influence of raw material and processing on aroma in chocolate. Thèse, Université de Copenhague, Copenhague, Danemark, 218 p.
202. Padilla B., Gil J.V. & Manzanares P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-20.
203. Papalexandratou Z., Camu N., Falony G. & De Vuyst L. (2011a). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28: 964–973.
204. Papalexandratou Z., Falony G., Romanens E., Jimenez J.C., Amores F., Daniel H.-M. & De Vuyst L. (2011b). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa beans fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7698-7714.

RÉFÉRENCES

205. Papalexandratou Z., Lefeber T., Bahrim B., Lee O.S., Daniel H.-M., & De Vuyst L. (2013). *Hanseniospora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35: 73-85.
206. Parenicova L., Benen J.A., Kester H.C. & Visser J. (1998). pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 251: 72–80.
207. Passos F.M., Lopez A.S. & Silva D.O. (1984). Aeration and its influence on the microbial sequence in cacao fermentations in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 49: 1470–1474.
208. Peng L. & Chen Y. (2011). Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*, *Biomass-Bioenergy*, 35: 1600–1606.
209. Pedrolli D.B. & Carmona E.C. (2014). Purification and characterization of a unique pectin lyase from *Aspergillus giganteus* able to release unsaturated monogalacturonate during pectin degradation. *Enzyme Research*, 1-7.
210. Pereira Nunes X., Souza Silva F. & Alneida J.R.G. (2012). Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. 1ère edition Venketeshwer Rao, 290 p.
211. Piccoli-valle R.H., Passos F.M.L., Passos F.J.V. & Silva D.O. (2001). Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 : 135-140.

RÉFÉRENCES

212. Pina C., Santos C., Couto J.A. & Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of different culture conditions. *Food microbiology*, 21 : 439–447.
213. Pitcholo E.A. (1990). Essai d'utilisation des péricarpes de cabosses de cacao (*Theobroma cacao L.*) dans l'alimentation des poulets de chair au Togo. Thèse de Doctorat, Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires, Université Cheick Anta Diop de Dakar, Sénégal, 120 p.
214. Polizeli M.L.T.M, Jorge J.A. & Terenzi H.F. (1991). Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of Genetic and Microbiology*, 137: 1815–1823.
215. Pongcharoen P. (2022). The ability of *Pichia kudriavzevii* to tolerate multiple stresses makes it promising for developing improved bioethanol production processes. *Letters Applied in Microbiology*, 75: 36-44.
216. Pontillon J. (1998). Cacao et chocolat : production, utilisation et caractéristiques, Edition Techniques et Documents, Paris, France, 638 p.
217. Poondla V., Bandikari R., Subramanyam R. & Obulam V.S.R. (2015). Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolated and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4: 70-76.
218. Utami R., Widowati E., & Christy A., (2016). Screening and characterization of amylase enzyme in sweet orange (*Citrus sinensis*) juice clarification. *Nusantara bioscience*, 8 (2): 268-272.

RÉFÉRENCES

219. Radoi F., Kishida M. & Kawasaki H. (2005). Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. *FEMS Yeast Research*, 5 (6-7) : 663-8.
220. Rai P., Rai C., Majumdar G. C., Dasgupta S. & De S. (2006). Resistance in series model for ultrafiltration of mosambi (*Citrus sinensis* L. Osbeck) juice in a stirred continuous mode. *Journal of Membrane Science*, 283: 116-122.
221. Rein D. (2000). Cocoa inhibits platelet activation and function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72: 30-35.
222. Ribereau-Gayon P. & Stonestreet E. (1966). Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique*, 48: 188–196.
223. Ridley B.L., O'Neill M.A. & Mohnen D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57: 929-967.
224. Roelofsen P.A. (1958). Fermentation, drying, and storage of cacao beans. *Advances in Food Research*, 8: 225–296.
225. Rosa A.L., María L., Raymond Eder M.L.R., Reynoso C. & Lauret, C.S. (2017). Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) Grape Must. *Frontiers in Microbiology*, 8 (532): 1-8.
226. Rosslyn M.B., Maurizio C. & Graeme M.W. (2003). Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in wine yeast. *Journal of Wine Research*, 14: 3-15.
227. Rössner S. (1997). Chocolate divine food, fattening junk or nutritious supplementation? *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(6): 341–345.
228. Ruan R., Zhang Y., Chen P., Liu S., Fan L., Zhou N., Ding K., Peng P., Addy M., Cheng Y., Anderson E., Wang Y., Liu Y., Lei H. & Li B. (2019). Biofuels: In

RÉFÉRENCES

:

RÉFÉRENCES

- Introduction, *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*, Edition, Biomass, Biofuels, Biochemicals, London, UK, 886 p.
229. Ruiz H.A., Rodríguez-Jasso R.M., Rodríguez R., Contreras-Esquivel J.C. & Aguilar C.N. (2017). Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 65: 90-95.
230. Saad N., Briand M., Gardarin C., Briand Y. & Michaud, P. (2007). Production, purification, and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* NRRL 1894. *Enzyme Microbial Technology*, 41: 800-805.
231. Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J. & Vandamme E.J. (1993). Pectin, pectinases and protopectinase: production, properties, and applications. *Adventure Application Microbiology*, 39: 213-316.
232. Sakai T., Okushima M. & Yoshitake S. (1984). Purification, Crystallisation and Some Properties of Endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (8): 1951-1961.
233. Sanbongi C., Suziki N. & Sakane T. (1997). Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune function in humans *in vitro*. *Cell Immunology*, 177: 129-136.
234. Sanchez J., Guiraud J.P. & Galzy P. (1984). A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 262–267.

RÉFÉRENCES

235. Sanchez V.J.E., Daguinet G., Guiraud J.C.V. & Galzy P. (1985). A study of yeast flora and the effect of the pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 18 (2): 69-75.
236. Sandra L.G., Gérard L., Jose L.P., Michel B. & Jean-Pierre G. (2007). Study on the microbiology and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 124-130.
237. Sharma H.P., Sharma S.V. & Prasad, K. (2015). Application of non-thermal clarification in fruit juice processing - A Review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment.*, 1(1): 15- 21
238. Sieiro C., Poza M., Vilanova M. & Villa T.G. (2003). Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGUI gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry. *Applied Environmental Microbiology*, 69(3): 1861-1865.
239. Siekstele R., Bartkeviciute D. & Sasnauskas K. (1999). Cloning targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (*EPG I*). *Yeast*, 15 (4): 311-22.
240. Silva D, Martins E.S., Silva R. & Gomes E. (2002). Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial byproducts. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 318–324.
241. Singh S.A., & Rao, A.G.A. (2002). A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35: 115–123.
242. Singleton V., Orthofer R. & Lamuela-Ravento's R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu

RÉFÉRENCES

- reagent. In L. Packer (Ed.). Oxidants and antioxidants, part A, methods in enzymology, Edition Academic Press, New York, USA, 299, 178 p.
243. Sutherland J.W. (1995). Polysaccharides lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, 16 : 223-347.
244. Schwan R.F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and environmental Microbiology*, 64: 1447-1483.
245. Schwan R.F., Rose A.H. & Board R.G. (1995). Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 96–107.
246. Schwan R.F., Cooper R.M. & Wheals A.E. (1997). Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 234–244.
247. Schwan R.F. & Wheals A.E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 : 205–222.
248. Scordia D. Cosentino S.L. & Jeffries T.W. (2013). Effectiveness of dilute oxalic acid pretreatment of *Miscanthus x giganteus* biomass for ethanol production. *Biomass-Bioenergy*, 59 : 540–548.
249. Shobayashi M., Mitsueda S.-I., Ago M., Fujii T., Iwashita K. & Iefuji, H. (2005). Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69 (12): 2381–2388.
250. Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J. & Stanley G.A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 13–24.

RÉFÉRENCES

251. Tarko T., Duda-Chodak A. & Zajac N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods. *Annals of the National Institute of Hygiene*, 64: 79-84.
252. Thakur A., Pahwa R., Singh S., & Gupta, R. (2010). Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme Research*, 1-7.
253. Thangaratham T. & Manimegalai G. (2014) Optimization and production of pectinase using agro-waste by solid state and submerged fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (9): 357-365.
254. Thomas D.S. & Rose A.H. (1979). Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Archives of microbiology*, 122: 49-55.
255. Thomas P.K., Carl L.K., Harold H.S. & Eric, M.G. (2007). Immune effect of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear Cells. *Experimental Biology and Medicine*, 232: 293-300.
256. Tixier C. (2011). De l'arbre à cacao au chocolat : voyage à la source des arômes et des saveurs. *Phytothérapie*, 11: 79-84.
257. Tonye (2020). Le « cacao brésilien » booste les rendements. In *Afrique agriculture*, 38p.
- 258.** Tra Bi Y.C. (2017). Diversité génotypique et potentialités biotechnologiques des souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées de trois boissons traditionnelles fermentées (vin de palmier à huile, vin de palmier raphia et bière de sorgho) produites en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat Unique, UFR de Sciences et Technologie des Aliments, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, 225 p.

RÉFÉRENCES

259. Vaillant F., Millan A., Dornier M., Decloux M. & Reynes M. (2001). Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 48: 83-90.
260. van der Aa Kühle A., Jespersen L., Glover R.L.K., Diawara B. & Jakobsen M. (2001). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeast*, 18: 1069-1079.
261. Varela C. & Borneman A.R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34: 111–128.
262. Wan Y., Vinson J.A., Etherton T.D., Proch J., Lazarus S.A. & Kris-kerton P. (2001). Effect of cocoa powder and dark chocolate on LDL Oxydative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *American Journal Clinical Nutrition*, 74: 596-602.
263. White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990). PCR protocols. A guide to methods and applications. In: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et White T.J. (Edition Academic Press, San Diego, USA, 322 p.
264. Wolf J.P. (1968). Manuel d'analyse des corps gras ; Azoulayéd. Paris (France), 519 p.
265. Wojdyło A., Oszmianski J. & Kolniak, J. (2011). Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry*, 127: 623–631.
266. Yadav S., Anand G., Dubey A.K. & Yadav D. (2012). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase secreted by *Rhizopus oryzae* MTCC1987 and its role in retting of *Crotolaria juncea* fibre. *Biologia*, 67(6): 1069–1074.
267. Yan J., Wei Z., Wang Q., He M., Li S. & Irbis C. (2015). Bioethanol production from sodium hydroxide/hydrogen peroxide-pretreated water hyacinth via simultaneous

RÉFÉRENCES

- saccharification and fermentation with a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioresources Technology*, 193: 103–109.
268. Yandav S. & Shastri N.V. (2005). Partial purification and characterization of pectin lyase produce by *Penicillium oxalicumin* solid state fermentation. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 501-504.
269. Yao B.L., Messoum, F.G. & Tano K. Contamination des fèves de cacao par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en Côte d'Ivoire. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 10 (3): 319-32.
270. Yoshitake S., Numata T., Katsuragi T., Hours R.A. & Sakai T. (1994). Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77 : 370–375.
271. Yu J. Zhang X. & Tan T. (2007). A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production, *Journal of Biotechnology*, 129 : 415–420.
272. Zahouli G.I.B., Guehi S.T., Fae A.M., Ban-Koffi L. & Nemlin J.G. (2010). Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2 (4) :184-190.
273. Zhang J., Bruton B.D. & Biles C.L. (1999). *Fusarium solani*endo polygalacturonase from decayed muskmelon fruit: purification and characterization. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54: 171–186.
274. Zhao J. & Xia L. (2010). Bioconversion of corn stover hydrolysate to ethanol by a recombinant yeast strain, *Fuel Process Technology*, 91: 1807–1811.
275. Zhu Q.Y., Holt R.R., Lazarus S.A., Orozco J.T. & Carl K. (2002). Inhibitory effect of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Experimental Biology and Medicine*, 227 : 321-329.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe I : Fiche d'enquête

Enquête consommation sur le jus de mucilage de cacao

1- Quartier ou Commune ou Village:

2- Sexe: 1- M 2- F

3- Quel âge avez-vous ? 1) 5-15 ans 2) 15-25 ans 3) 25-50 ans 4) 50 ans et plus

4- Niveau d'étude : 1-Aucun 2-Primaire 3-Sécondaire 4-Supérieur

5- Profession : 1-Elèves 2-Etudiants 3-Fonctionnaires 4-Artisans

4- Chômeurs 5- Agriculteurs 6 - Autre (à préciser)

6- Situation matrimoniale : 1-Marié 2-Célibataire

7- Nationalité : 1-Ivoirienne 2-Ghanéenne 3-Burkinabé 4-Togolaise
5- Béninoise 6- Autres (à préciser)

8- Connaissez-vous le jus de mucilage de cacao? Oui Non

9- Consommez-vous le jus de mucilage de cacao? Oui Non

Si oui

10- A quel moment de la journée ?

1- Matin 2- Travaux champêtres 3- Soir 4- Autre (à préciser)

11- Combien de fois consommez-vous le jus de mucilage de cacao par jour ?

1- 1 Fois 2- 2 Fois 3-3 Fois 4- Autre (à préciser)

12- Quelle quantité consommez-vous de jus de mucilage de cacao par jour?

1- 250mL 2- 500mL 3- 1 L 4- Autre (à préciser)

13- Combien de temps peut on conserver le jus de mucilage de cacao pour consommation?

1- 1 Jour 2- 2 Jours 3-3 jours 4-autre (à préciser)

14- Avez-vous déjà ressenti un effet bénéfique après la consommation le jus de mucilage de cacao?

ANNEXES

1- Oui

2- Non

15- Si Oui, le ou lesquels ?

1-Laxatif

2-Fortifiant

3-Antidiarrhéique

4-Digeste

5 - Autres (à préciser)

ANNEXES

Annexe II : Séquences nucléotidiques

>YA1 *Rhodotorula mucilaginosa*

ACAAAGGATCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATC
TGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGC
ACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCG
GACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG
CTCAAATTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAG
TACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAAT
CGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTA
GCAGTTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAA
CGCAGTGTGCCTTTGGCGGGGGTTTCGACCTTTCACACTTAGGATGCTGGTGGA
ATGGCTTTAAACGACCCGTCTAAAACCCCGGGAAAAAAA

>YA2 *Yarrowia lipolytica*

ACAAAGGGATGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA
CCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCT
TGGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGT
ATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAA
ACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACTGTGA
AGGAAAGGTGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTGTTG
ATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGC
GGTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAG
CGCCTTTCGGGCGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCAC
CCATTTACCCGTCTGAAAACCCGGGACAAAAAAA

>YA 3 *Yarrowia lipolytica*

CCAAGGGATGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAC
CCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTT
GGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTA
TTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAA
CTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACTGTGAA
GGAAAGGTGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTGTTGA
TAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCG
GTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGC
GCCTTTCGGGCGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACC
CATTTACCCGTCTACCACCCGGGAACCAA

>YA 4 *Yarrowia lipolytica*

GCCTCAGTAACGGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCCTCGGGA
TTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGAATAGT

ANNEXES

ACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTAT
CAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTA
AAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTG
AAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAATAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGG
AAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTACTGCC
GACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTTCGGG
CGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTTCACC

>YA 5 *Saccharomyces cerevisiae*

TTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGG
TGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCC
TTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTC
TTTGTAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGT
GGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
AGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGTCTTAAAAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTG
TGGGTAGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATA
AATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGC
CAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATAT
GCCGCC

>YA 6 *Yarrowia lipolytica*

TGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGA
TTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGAATAGT
ACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTAT
CAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTA
AAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTG
AAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAATAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGG
AAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTACTGCC
GACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTTCGGG
CGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTTCACCC
G

>YA 7 *Yarrowia lipolytica*

AGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTAA
TTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGAATAGTACGTCA
TAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAG
AGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCT
AAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAG
AACTTTGAAAAGAGAGTGAATAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAATG
GGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTACTGCCGACGC
CGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTTCGGGCGTTCT
CCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTTC

>YA 8 *Yarrowia lipolytica*

ANNEXES

CAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAACCCTCGGGATTGTA
ATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCTTGGAAATAGTACGTC
ATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAA
GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGC
TAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAA
GAACTTTGAAAAGAGAGTGAATAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAAT
GGGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTACTGCCGACG
CCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTTCGGGCGTTC
TCCCCTAACCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTCA

>AK 1 *Debaryomyces hansenii*

CCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTC
GGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTT
CCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAAT
TCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG
GTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGT
ACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATCCTTTCCTT
CTTGGTTGGGTTCCCTCGCAGCTTACTGGGCCAGCATCGGTTTGGATGGTAGGATA
ATGACTAAGGAATGTGGCTCTACTTCGGTGGAGTGTTATAGCCTTGGTTGATACT
GCCTGTCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTTGACTAGGATGTTGGCATAATGATCTT
AAGCCA

>AK 2 *Rhodotorula mucilaginosa*

CCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTCG
GTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCT
GTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAG
CGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTG
GGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAG
TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAA
ATTGTTGGAAGGGAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGC
AGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTC
GGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGT
GCCTTTGGCGGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAAATGGCTTTA
AACGA

>AK 3 *Debaryomyces hansenii*

TTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGG
TGTCAGGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCC
TTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTC
TATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGT
GGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
AGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATCCTTTCCTTCTT
GGTTGGGTTCCCTCGCAGCTTACTGGGCCAGCATCGGTTTGGATGGTAGGATAATG

ANNEXES

ACTAAGGAATGTGGCTCTACTTCGGTGGAGTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCT
GTCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTTACTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGC
CA

>AK 4 *Debaryomyces hansenii*

TAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGT
GTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCC
TGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCT
ATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG
GTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
GTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATT
GTTGAAAGGGAAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCGATCCTTTCCTTCTTG
GTTGGGTTCCCTCGCAGCTTACTGGGCCAGCATCGGTTTGGATGGTAGGATAATGA
CTAAGGAATGTGGCTCTACTTCGGTGGAGTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCTG
TCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTTACTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGCC
A

>AK 5 *Rhodotorula mucilaginosa*

CTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTCG
GTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCT
GTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAG
CGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTG
GGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAG
TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAA
ATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGC
AGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTC
GGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGT
GCCTTTGGCGGGGGTTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAAATGGCTTTA
AACGAC

>AK 6 *Rhodotorula mucilaginosa*

CCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTC
GGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTC
TGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAG
CGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTG
GGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAG
TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAA
ATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGC
AGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTC
GGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGT
GCCTTTGGCGGGGGTTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAAATGGCTTTA
AACGACCC

ANNEXES

>AK 7 *Debaryomyces hansenii*

TTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGG
TGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCC
TTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTC
TATGTAAAGTGCTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGT
GGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
AGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATCCTTTCCCTTCTT
GGTTGGGTTCCCTCGCAGCTTACTGGGCCAGCATCGGTTTGGATGGTAGGATAATG
ACTAAGGAATGTGGCTCTACTTCGGTGGAGTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCT
GTCTAGACCGAGGACTGCGTCTTTTACTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGC
C

>AK 8 *Rhodotorula mucilaginosa*

TAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTCGGT
GTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTT
GGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGC
TTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTGGGT
GGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
CGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATT
GTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGG
CCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCGGCT
GTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCT
TTGGCGGGGGTTTCGACCTTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAATGGCTTTAAAC
GA

>TIAS1 *Yarrowia lipolytica*

CCAAAGGGATGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAA
CCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCT
TGGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGT
ATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAA
ACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGA
AGGAAAGGTGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTGTTG
ATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGC
GGTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAG
CGCCTTTCGGGCGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCAC
CCATTTACCCGTTCTTGACCCCCGGGAACAA

>TIAS 2 *Rhodotorula mucilaginosa*

ACAAAGGATCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATC
TGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCGCGTTGGACCGC
ACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCG
GACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG
CTCAAATTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAG
TACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAAT

ANNEXES

CGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTA
GCAGTTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAA
CGCAGTGTGCCTTTGGCGGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGA
ATGGCTTTAAACGACCCGTCTAACAACCCGGGGAAAAAAAAA

>TIAS 3 *Pichia kudriavzevii*

CCAAAGGGATGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAA
TCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGG
TGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGC
CGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCC
AAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCA
CGTGA AATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCG
CTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTG
CAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGA
TGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGA
ACGGCGCAACACCGCCCGTCTGAAAACCGGGGACAAAAAAAAA

>TIAS 4 *Pichia kudriavzevii*

ACAAAGGGATGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAA
TCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGG
TGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGC
CGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCC
AAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCA
CGTGA AATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCG
CTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTG
CAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGA
TGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGA
ACGGCGCAACACCGCCCGTCTAAAAACAGGGGAACAAAAAAAAA

>TIAS 5 *Yarrowia lipolytica*

ACAAAGGGATGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA
CCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCT
TGGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGT
ATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAA
ACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGA
AGGAAAGGTGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTTGTTG
ATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGC
GGTGTACTGCCGACCGGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAG

ANNEXES

CGCCTTTCGGGCGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCAC
CCATTTACACCGTCTTGAACACCACGGGACCAA

>TIAS 6 *Pichia kudriavzevii*

ACAAAGGGATGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAA
TCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGG
TGTCCAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGC
CGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCC
AAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCA
CGTGA AATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCCGACATGGGGATTGCGCACCG
CTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTG
CAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGA
TGCTGCGTGCAGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGA
ACGGCGCAACACCGCCCGTCTAGAAAACCGGGGACAAAA

>TIAS 7 *Yarrowia lipolytica*

CCAAAGGGATGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA
CCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCT
TGGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGT
ATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAA
ACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGA
AGGAAAGGTGAAAAGA AACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTGTTG
ATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGC
GGTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAG
CGCCTTTCGGGCGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCAC
CCATTTACACCGTCTTGAACACCCCGGGAACAAAGA

>TIAS 8 *Yarrowia lipolytica*

ACAAAGGGATGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA
CCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACCCAAGTTGCT
TGGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAACCGTTCTCCATGT
ATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAA
ACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGA
AGGAAAGGTGAAAAGA AACTTTGAAAAGAGAGTGAAATAGTATGTGAAATTGTTG
ATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGTTTCAGCCGCCCTCGTGGGC
GGTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGCGAGACGAGGGTTACAAATGGGAG
CGCCTTTCGGGCGTTCTCCCCTAACCCCTCCACACTGCCACCGACGACATAATCCAC
CCATTTACACCGTCTAAAACCCAGGACCAA

ANNEXES

Annexe III : Matériel technique



Spectrophotomètre



Centrifugeuse réfrigérée

ANNEXES



Incubateur-agitateur



Etuve

ANNEXES



Autoclave

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication 1: Identification of pectinase-producing yeast strains isolated from fermented mucilage of cocoa juice. Current topics in biotechnology, 2021, 12: 27-38. “Extrait de la these”.

Publication 2: Assessment of physicochemical, biochemical and functional properties of mucilage cocoa juice during storage at room temperature. Open Journal of Food and Nutrition, 2022, 1, 10-27. “Extrait de la these”.

Publication 3: Clarification treatments of pineapple (*Malus domestica*) and orange (*Citrus sinensis*) juices by pectinase from *Yarrowia lipolytica* strains identified from cocoa juice in fermentation. Journal of Biochemistry International, 2022, 9 (4): 82-93. “Extrait de la these”.

PUBLICATIONS

Publication 1

Identification of pectinase-producing yeast strains isolated from fermented mucilage of cocoa juice. *Current topics in biotechnology*, 2021, 12: 27-38. “Extrait de la these”.

Identification of pectinase-producing yeast strains isolated from fermented mucilage of cocoa juice

Tano Marie-Ange Sakia Mian^{1,2}, Fatoumata Camara², Wahauwouele Hermann Coulibaly^{3,*}, Grah Avit Maxwell Beugré¹, Alane Romaric N'Guessan³ and Koffi Marcellin Djè³

¹Laboratoire d'agro-valorisation, Unité de Formation et de Recherche d'Agroforesterie, l'Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire; ²Laboratoire de Nutrition et Sécurité Alimentaire, Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments (UFR-STA), Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire; ³Laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie des Aliments, Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments (UFR-STA), Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

This study isolated, screened, and identified pectinase-producing yeasts from fermented cocoa juice. The optimal conditions for the production of these pectinases were determined. Among 240 isolates screened, only 6 isolates were selected. These selected isolates exhibited halos whose diameters were higher than or equal to 10 mm. The isolates selected were identified by amplification of the 5.8S rDNA-ITS region and the amplified fragments were sequenced. It was found that, all strains identified belonged to same species *Yarrowia lipolytica*. The determination of optimal conditions for pectinase production revealed that the maximal pectinase activities were obtained at 12 h of incubation, at pH 5.5 and 6 and temperature 30 and 40 °C. For all parameters studied, the strains Tias J0-6, YA J3-1 and Buy J2-1 showed higher pectinase activity than others species.

KEYWORDS: pectinase, cocoa juice in fermentation, yeast isolates, *Yarrowia lipolytica*.

INTRODUCTION

Côte d'Ivoire, an agricultural country, is the world's largest producer of marketable cocoa,

ahead of Ghana, Indonesia and Brazil with an average production of 1,200,000 tons [1, 2]. Indeed, cocoa (*Theobroma cacao L.*) is mainly grown for its beans, used in chocolate production in developed countries such as Europe and America and for its fats, used in cosmetics, pharmaceutical industries and food products [2-4]. During cocoa beans exploitation, products such as mucilage juice and pods remain at the production site. Although important in the current economy of Côte d'Ivoire, the cocoa sector would benefit more from adding value to its by-products, such as mucilage juice, which is used as a feed supplement in rabbit breeding in Nigeria and in pectin production in Latin America [5, 6]. During shelling, more than 300 million liters of mucilage juice, commonly called as "cocoa water", produced each year is left in the fields. However, this beverage is appreciated by farm workers and their children. Mucilage juice is produced by breaking down the mucilaginous pulp surrounding the beans [7]. This decomposition is ensured by the pectinolytic enzymes of the yeasts [8]. Thus, the mucilage juice contains high pectin content [8, 9, 10]. This high pectin content could suggest the presence of pectinase-producing yeasts [8].

In Côte d'Ivoire, no studies have been carried out so far on the production of pectinases from yeast isolates of cocoa mucilage juice. Indeed, most of

*Corresponding author: wahauwouele@yahoo.fr;
coulibalyher.sta@univ-na.ci

the studies were focused on beans [11]. Only a few studies focused on cocoa mucilage juice have been carried out by Anvoh [10] where the mucilage juice was transformed into vinegar and marmalade. Thus, this study is the starting point for exploring the biotechnological properties of mucilage juice of yeasts.

In this context, the aim of this work is to highlight the biotechnological properties of cocoa mucilage juice considered as waste. Specifically, screening the pectinase-producing yeast isolates from fermented cocoa mucilage juice followed by their identification and determination of optimal conditions for the production of these pectinases were carefully carried out.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of yeast species

The yeast species were isolated from fermented cocoa juice collected from five (05) cocoa producers in different sites: Akoupe (6.3879° N, 3.8808° W) and Yakasse-Attobrou (6.1853° N, 3.6446° W) in South-East; Tiassalé (5.9043° N, 4.8261° W) in South, Taabo (6.2338° N, 5.1394° W) in Center and Buyo (6.4556° N, 6.9961° W) in West (Figure 1). A basic medium was used for the production of pectinase with composition (g/L) as follow; 3 g (NH₄)₂SO₄ (Scharlau, Spain), 4.5 g KH₂PO₄ (Scharlau, Spain), 1 g yeast extract (Laboratoire Humeau, France), 0.25 g MgSO₄•7H₂O

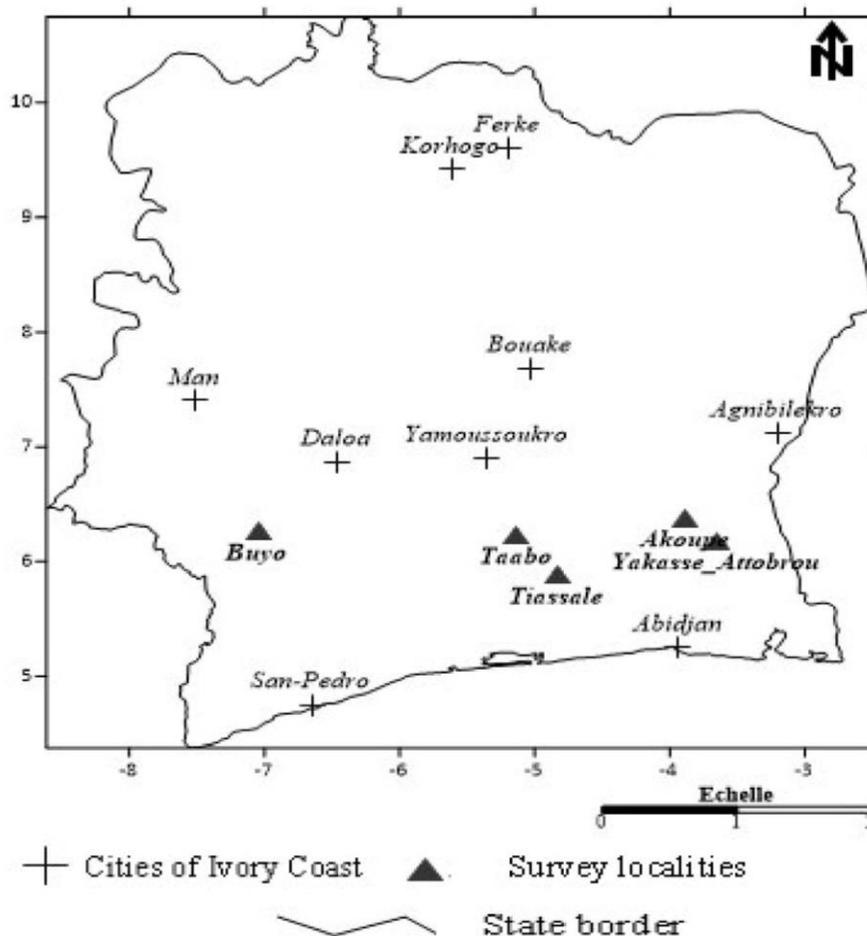


Figure 1. Sampling sites.

(Merck, Germany), 0.25 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany), 10 g polygalacturonic acid (Sigma Aldrich, Germany) and 10 g agar (Oxoid, UK). All these ingredients were dissolved in sterile distilled water and adjusted to pH 5. Media were sterilized in autoclave at 121 °C under pressure of 1 atmosphere for 17 min. The inoculated plates were incubated at 30 °C for 1-5 days.

Screening of yeast strain isolates for pectinolytic activity

A total of two hundred forty (240) isolates from fermented cocoa juice were assayed for pectinase activity using pectin-containing agar medium. Culture plates with pectin-containing agarose were inoculated with each isolate and incubated for 1-5 days at 30 °C. Isolates were replicated 2 times and tests were performed twice. After incubation, plates were stained with aqueous 7.5% copper acetate II solution for 15 to 30 min. Cultures expressing pectinase activity exhibited a clear zone around the margins of the colony. Isolates without a clear zone around the colony were considered as pectinase non-producer. The isolates which had a clear zone with the diameter greater than 10 mm were selected for further study.

Optimization of pectinase enzyme production from isolates selected

Culture conditions

The six isolates selected were used to produce pectinase enzyme using a liquid medium (g/L): 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Scharlau, Spain), 4.5 g KH_2PO_4 (Scharlau, Spain), 1 g yeast extract (Laboratoire Humeau, France), 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany), 0.25 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany), and 10 g polygalacturonic acid (Sigma Aldrich, Germany) at pH 5. Fermentation procedures were carried out in 500 mL Erlenmeyer flask containing 250 mL of growth medium with inocula concentration 10^7 cell/mL and incubated at 30 °C under shaking conditions (150 rpm) for 24 h. The biomass was separated by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant which constitutes the crude extract enzyme was used to assess the pectinase enzyme activity.

Effect of incubation time, pH and temperature

The six isolates identified were subjected to different culture conditions to determine the

optimum conditions for pectinase production. Pectinase production were estimated at regular intervals (0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h and 24 h) and selected temperatures (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C and 70 °C), pH (5, 5.5, 6, 7 and 8). All the experiments were carried out in 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 mL of basal medium.

Enzyme assay

The pectinase activity was measured according to Miller [12]. The assay mixture contained 100 μL of extract, and 100 μL of 1% pectin prepared in sodium acetate buffer (0.05 M; pH 5). After incubation at 40 °C for 30 min, the reaction was stopped by addition of 400 μL of dinitrosalicylic acid (DNSA) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The mixture was kept in boiling water bath for 10 minutes until the yellow color developed. Then the tubes were cooled and 4.4 mL of distilled water was added to the mixture. Absorbance change (OD) was measured spectrophotometrically at 540 nm. The amount of reducing sugar released was quantified using galacturonic acid as standard. The pectinase activity was expressed as international Unit (U) per ml of reaction medium. One unit of enzyme activity (μmol) was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of galacturonic acid under the assay conditions. The results were expressed as mean \pm standard deviation of mean.

Identification of yeasts isolates producing pectinase enzyme

Among 240 isolates tested, only six isolates had a clear zone with diameters greater than 10 mm. Thus, these six isolates were identified. Yeast cells from 48 h old fresh colonies growing on YPDA (10 g/L yeasts extract (Difco); 10 g/L bactopectone (DB, France); 10 g/L D-glucose (Sordalab, France); Agar 10 g/L (Oxoid, UK)) medium were collected in sterile conditions with the sterile tip of toothpick and suspended in the PCR mixture and directly used for PCR analysis. The amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 region was carried out in 50 μL of reaction mixture containing 0.25 μL of *Taq* polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 0.25 μL (100 μM) each of forward and reverse primers ITS1 5'TCCTCC GCTTATTGATATGC-3'; ITS 4- 5'TCCGTAGG TGAACCTGCGG-3' (Integrated DNA Technologies,

France) [13], 0.4 μL of each dNTP, 8 μL of MgCl_2 , 10 μL of *Taq* polymerase buffer and 30.85 μL of nuclease-free water (Promega). The amplification was performed with a total of 30 PCR cycles in a thermal cycler (Techne Prime, UK). The cycling program was started with an initial cell lysis at 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 2 min, annealing at 60 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 2 min. The PCR was ended with a final extension at 72 °C for 7 min. Amplified samples were kept at -20 °C until further use. The amplified DNA fragment was separated by applying 10 μL of each PCR product with 2 μL of blue-orange 69 loading dye (Promega) to agarose (Promega) gel prepared to 0.8% (w/v) and containing 0.4 μL ethidium bromide (Promega). Approximate sizes of amplicons were determined using a standard molecular weight marker (200-bp DNA ladder; Promega). The gel was run in 1X TBE buffer [89 mM Tris (Promega), 89 mM Boric acid (Promega), 2 mM Na₂-EDTA (Promega)] for 45 min at 100 V and photographed using gel documentation system (Clearver Scientific Ltd, - Clear view UV Transilluminator USA).

Yeast identification by sequencing and sequence analysis

Representative strains of each PCR-RFLP profile were identified at the species level by sequencing of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene. To do so, the PCR mix was prepared as for the amplification of the ITS region except that the primers used were NL1 5'-GCATATCAAT AAGCGGAGGAAAAG-3' and NL4 5'-GGTCC GTGTTTCAAGACGG 3' [14]. PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 54 °C for 40 s and DNA extension at 72 °C for 1 min 30 s. A final extension was completed at 72 °C for 7 min. PCR amplification and sequencing of the *ACT1* gene and the *ACT1* gene intron was performed as described by Jacques *et al.* [15]. The amplified fragments were then sequenced by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Sequences were processed using the package phred/phrap/consed. The obtained sequences were compared to sequences at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using blastn. Sequence alignments were generated

by using ClustalX [16] and were visualized with Genedoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed using XLStat software (version 2016). Duncan and Tukey's tests were used to assess the mean values of pectinase activity. Differences were considered significant for values of $P < 0.05$. After the alignment of nucleotide sequences was performed with software MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics, the same software was used to build the phylogenetic tree.

RESULTS AND DISCUSSION

Screening of yeast strain isolates for pectinolytic activity

Two hundred forty (240) isolates from fermented cocoa juice were screened by pectin agar plate method and the zone of clearance was calculated. Among two hundred forty (240) isolates screened, only six isolates were selected on the basis of their ability to hydrolyze pectin with a zone clear diameter greater or equal 10 mm. Tias J0-6 exhibited a zone of clearance around 20 mm, YA J3-1 and Buy J4-1 had a zone clearance around 18 mm. The zones of clearance were around 15, 12 and 10 mm for Tias J1-8, Buy J2-1 and Tias J4-8, respectively. The clear zone of hydrolysis around the selected isolates is depicted in Figure 2 as an example. Some isolates had a zone of clearance below 10 mm or no clearance zone around the colonies (data not shown). On the basis of screening program, the six isolates were found to be a potential source of pectinolytic enzyme. Thus, the pectinases from these six isolates were characterized. The clear zone diameters of yeasts strains selected in this study were higher than those found by Banu *et al.* [17], Thangaratham and Manimegalai [18] and Dange and Harke [19] who found around 3 to 4.3 mm of clear zone for *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopusoryzae* and *Aspergillusoryzae*, respectively. On the hand other, Poondla *et al.* [20] reported that a strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated and identified from fruit wastes exhibited a zone of clearance of 16 mm. The clear zone diameter value could be an indicator of pectinase activity.

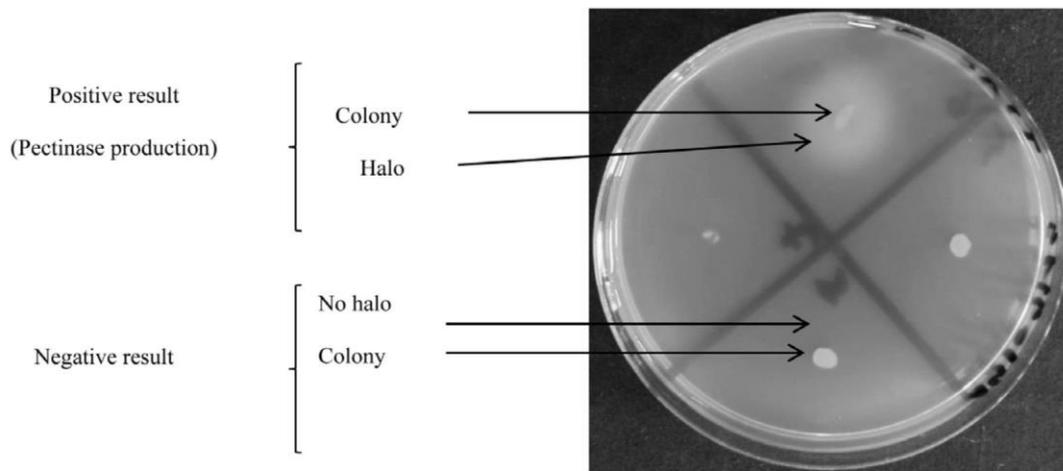
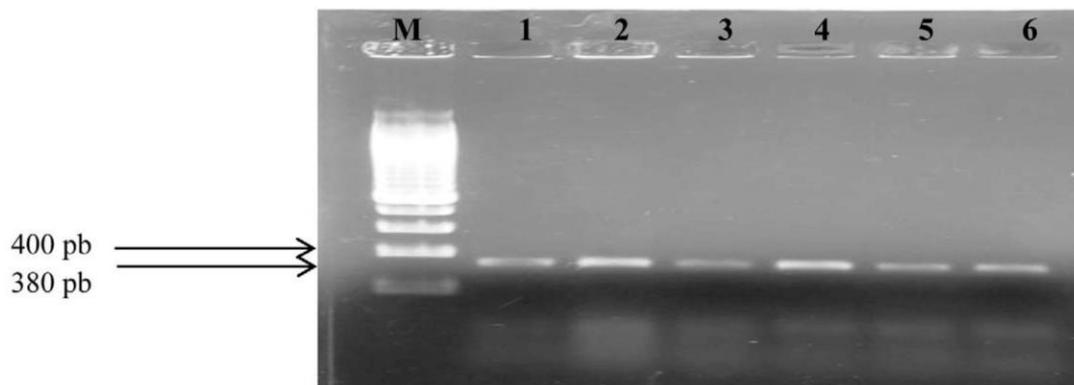


Figure 2. Pectinase enzyme production revelation by halo appearance.



M: DNA marker (200pbDNA ladder);

1-Tias J0-6; 2-Buy J2-1. 3-YA J3-1; 4-Buy J4-1; 5-Tias J1-8; 6-Tias J4-8

Figure 3. Electrophoresis of DNA of yeast isolates of pectinase producer on 0.8% agarose gel.

Molecular identification of yeast isolates selected

Amplification of the 5.8S rDNA-ITS region

Gel agarose electrophoresis of DNA of 6 yeast isolates amplified through PCR showed that all amplicons had the same size (380 pb) (Figure 3).

Molecular characterization of 6 yeast isolates selected

Table 1 presents nucleotide sequence of 6 yeasts isolates selected. All isolates belonged to same specie *Yarrowia lipolytica*. The same specie

has been found for all isolates yeast identified. On the hand over, this result showed that wastes from the fermentation of cocoa beans could contain microorganisms that are able to produce substances of interest such as enzymes. Phylogenetic analysis revealed the existence of three groups: group A contained several species belonging to *Yarrowia* genera particularly *Yarrowia lipolytica* strain CBS 0124 and *Yarrowia lipolytica* strain ATCC 18942 which are related to the isolates of group B (isolates of this study), supported by a bootstrap value of 100%. Group C was not related to the two previous group (Figure 4).

Table 1. Identification of 6 yeast isolates selected.

Group	Nucleotide sequence	Specie
BUY J2-1	AGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGGCGCTCCCATT GTAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACTCGGCGTCGGC AGTACACCGCCCACGAGGGGCGGCTGAAACCTCGGC ACTCTCCACTCATTTCCTTCCCTATCAACAATTTACA TACTATTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTACCTTT CTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCACCAGTA TTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTTGAGCTG CATTCCCAAACAACACTCGACTCTTTGATAAGGCAATAC ATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGTTGTCACCCTCT ATGACGTAATTTCCAAGCAACTTGGGTTAGCTTTCTC CAATGCCAAATCTTCAAATTACAATCCCGAGGGTTT AAATTTGAGCTTTT	<i>Yarrowia lipolytica</i>
BUY J4-1	ACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCAAAGTTC TTTTACCTTTTCCTTACAGTACTTGTTCGCTATCGGTC TCTCACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCC ACTTTGAGCTGCATTTCCCAAACAACACTCGACTCTTTGAT AAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGT TGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAGCAACTTGGG TTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAAATTACAATCC CGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACT	<i>Yarrowia lipolytica</i>
TIAS J0-6	GGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGG CGTCCCATTGTAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACT CGGCGTCGGCAGTACACCGCCCACGAGGGGCGGCTG AAACCTCGGCCACTCTCCACTCATTTCCTTCCCTATCA ACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCAAAGTTC TTTTACCTTTTCCTTACAGTACTTGTTCGCTATCGGTC TCTCACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCC ACTTTGAGCTGCATTTCCCAAACAACACTCGACTCTTTGAT AAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGT TGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAGCAACTTGGG TTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAAATTACAATCC CGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCG	<i>Yarrowia lipolytica</i>
TIAS J1-8	GGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCCCGAAAGG CGTCCCATTGTAACCCTCGTCTCGCTATCGATGACT CGGCGTCGGCAGTACACCGCCCACGAGGGGCGGCTG AAACCTCGGCCACTCTCCACTCATTTCCTTCCCTATCA ACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCAAAGTTC TTTTACCTTTTCCTTACAGTACTTGTTCGCTATCGGTC TCTCACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCC ACTTTGAGCTGCATTTCCCAAACAACACTCGACTCTTTGAT AAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCAGACGGGGT TGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAGCAACTTGGG TTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAAATTACAATCC CGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGC CCGT	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Table 1 continued..

Group	Nucleotide sequence	Specie
TIAS J4-8	TCGTCGGTGGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCC CGAAAGGGCGTCCCATTTGTAACCCTCGTCTCGCTATC GATGACTCGGCGTCGGCAGTACACCGCCCACGAGGGG CGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCCACTCATTTCCTTC CCTATCAACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTC AAAGTTCTTTTCACCTTTCCTTCACAGTACTTGTTTCGC TATCGGTCTCTACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTT TACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCTCAAACAACCTCGA CTCTTTGATAAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCA GACGGGGTTGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAG CAACTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAA TTACAATCCCGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGC TTCCTCGCCGT	<i>Yarrowia lipolytica</i>
YA J3-1	TCGTCGGTGGCAGTGTGGAGGGTTAGGGGAGAACGCC CGAAAGGGCGTCCCATTTGTAACCCTCGTCTCGCTATC GATGACTCGGCGTCGGCAGTACACCGCCCACGAGGGG CGGCTGAAACCTCGGCCACTCTCCCACTCATTTCCTTC CTATCAACAATTTACATACTATTTCACTCTCTTTTCA AAGTTCTTTTCACCTTTCCTTCACAGTACTTGTTTCGC ATCGGTCTCTACCAGTATTTAGCTTTAGATGGAGTT ACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCTCAAACAACCTCGAC TCTTTGATAAGGCAATACATGGAGAACGGTTAGCCAG ACGGGGTTGTCACCCTCTATGACGTAATTTCCAAGC AACTTGGGTTAGCTTTCTCCAATGCCAAATCTTCAA TACAATCCCGAGGGTTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGC TCA	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Optimization of pectinase enzymes produced from *Yarrowia lipolytica* strains

Effect of incubation time

The pectinase production was optimized for the six isolates selected using incubation time range from 0 to 24 h. For all six *Yarrowia lipolytica* strains, effect of incubation period also showed that the production of pectinase increased with duration of incubation with the maximal production recorded at 12 h of fermentation after which there was a decline. Only, Buy J4-1 strain exhibited maximum pectinase activity at 16 h of incubation (Figure 5). The maximum pectinase activities at 12 h of incubation were 0.209 ± 0.01 , 0.237 ± 0.002 , 0.272 ± 0.02 , 0.327 ± 0.02 , and 0.322 ± 0.02 U/mL for Tias J4-8, Tias J1-8, Tias J0-6, YA J3-1, and Buy J2-1 strains, respectively. The maximum pectinase activity for Buy J4-1 strains reached at 16 h of incubation was

0.221 ± 0.07 U/mL. In addition, the statistical analysis showed a significant difference between strains. On the basis of incubation time, Tias J0-6, YA J3-1, and Buy J2-1 strains exhibited the maximum pectinase activity than other isolates. Maximum pectinase activity in this study was observed at 12 h of incubation. This time was less than that found by Kashyap *et al.* [21] who reported that maximal pectinase activity from *Bacillus sp.* DT7 was observed after 24 h of incubation. Okonji *et al.* [22] showed that the maximal pectinase activity from *Aspergillus fumigatus* was reached after 144 h of incubation. The maximal pectinase activities from *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, and *Rhizopus oryzae* isolated and identified from cassava traditional ferments used for attieke production in Côte d'Ivoire were observed between 12 and 16 h of incubation [23]. Also, *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 52712) exhibited maximal pectinase

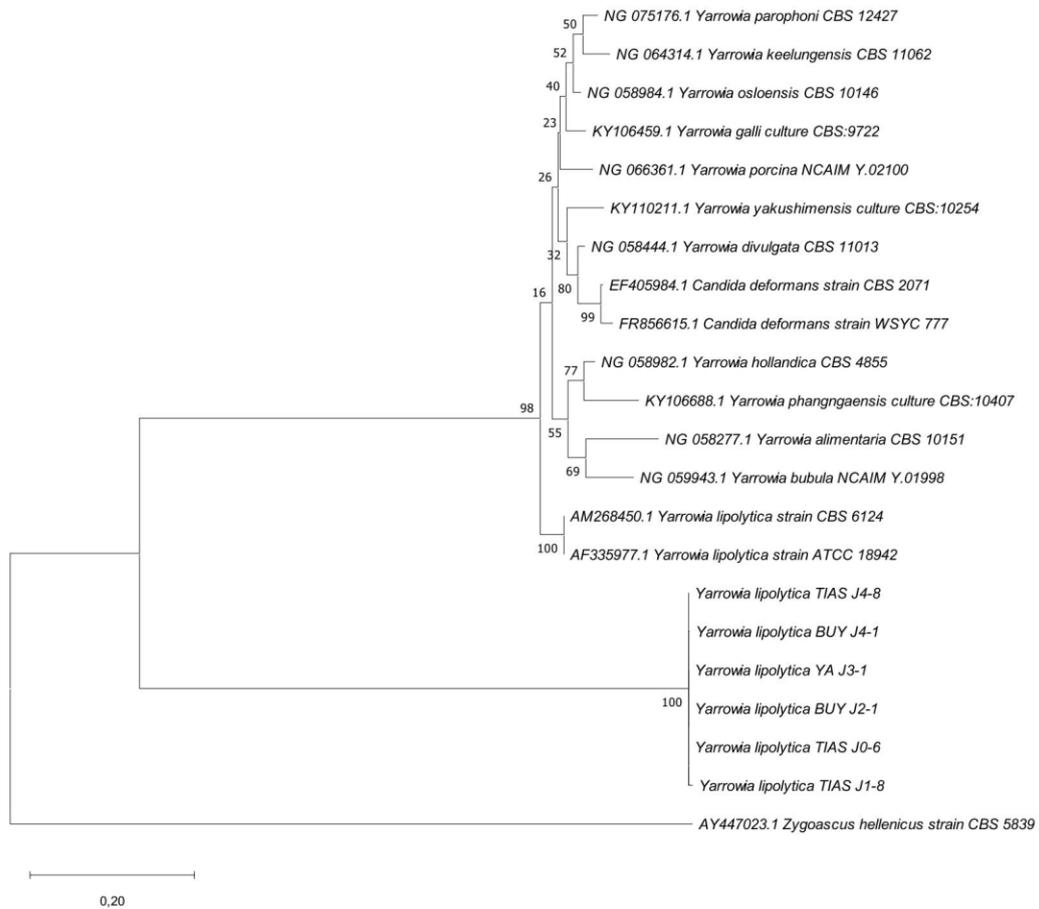


Figure 4. Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method.

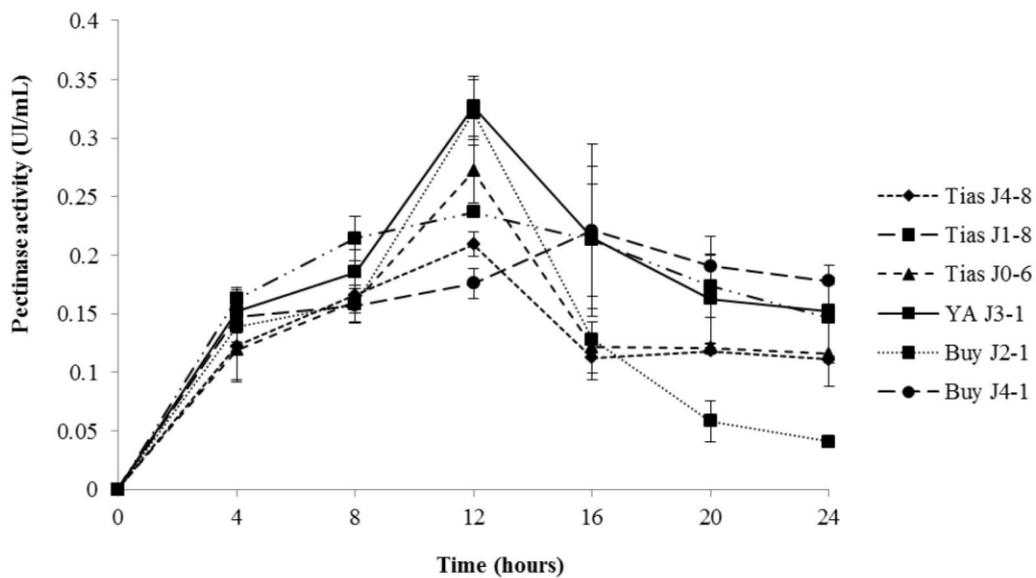


Figure 5. Effect of time on pectinase production by *Yarrowia lipolytica* strains from fermented cocoa juice.

activity at 6 days of fermentation using a ratio of 80:20 percent corn cob and orange peels as substrate [24]. Maximal pectinase activity of *Saccharomyces cerevisiae* isolated and identified from fruit wastes was obtained at 48 h of incubation [20]. Thus, the incubation period required to achieve maximum pectinase activities appears to be dependent on the microorganisms.

Effect of pH

The effect of pH on pectinase activity was tested by adjusting the pH of the pectin liquid medium between pH 5.0 and 8.0. Figure 6 depicts the pH effect on pectinase production. Highest pectinase activities (0.074 ± 0.005 and 0.06 ± 0.0007 U/mL) were observed with Tias J0-6 and YA J3-1 strains at pH 5.5. The maximum pectinase activity (0.11 ± 0.005 U/mL) at pH 6 was observed with Buy J2-1 strain. At neutral pH (7), Buy J2-1 strain exhibited highest pectinase activity (0.08 ± 0.02 U/mL). Buy J1-4 and Tias J4-8 strain had maximal pectinase activities (0.054 ± 0.01 and 0.076 ± 0.001 U/mL respectively) at pH 8. Tias J1-8 strain had optimum pectinase activity (0.045 ± 0.01 U/mL). In sum, maximum activities were observed with Tias J0-6 and YA J3-1 strain at pH 5.5, Buy J2-1 isolate at pH 6 and Tias J4-8 strain at pH 8. In addition, the statistical analysis showed a significant difference between strains

for a same pH. This result was in accordance with the literature. Indeed, Piccoli-valle *et al.* [25] reported that pectin lyase from *P. griseoroseum* had maximal activity at neutral pH (7). Kashyap *et al.* [21] showed that maximal pectinase production (15.72 U/ml) from *Bacillus sp.* DT7 was observed around neutral pH (7.2). Maximum pectin lyase activity from *Saccharomyces cerevisiae* isolated and identified from fruit wastes was attained at pH 6 [20]. However, the pH optimum of pectinolytic activity depended on the microorganisms. For some microorganisms, optimum pectinolytic activity was attained at acid pH, while for other microorganisms, the pectinase activities were optimum at alkaline pH. Indeed, pectinolytic enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* (ATTC 52712) and *Saccharomyces bayanus* have been found to be active at broad pH ranges of 3-5.5 [26, 27]. *Aspergillus fumigatus* pectinase has an optimum pH at 5.0 [22]. Kashyap *et al.* [22] and Manashi *et al.* [28] reported that pectinase produced by *Bacillus subtilis* showed optimum activity at pH 5.0. *P. viridicatum* showed maximum production of polygalacturonase and pectin lyase at a pH of 4.5 and 5, respectively [29]. Piccoli-valle *et al.* [25] observed that a high polygalacturonase and pectin esterase activity was shown by *P. griseoroseum* at acid pH between 4.5 and 5. Some authors reported that

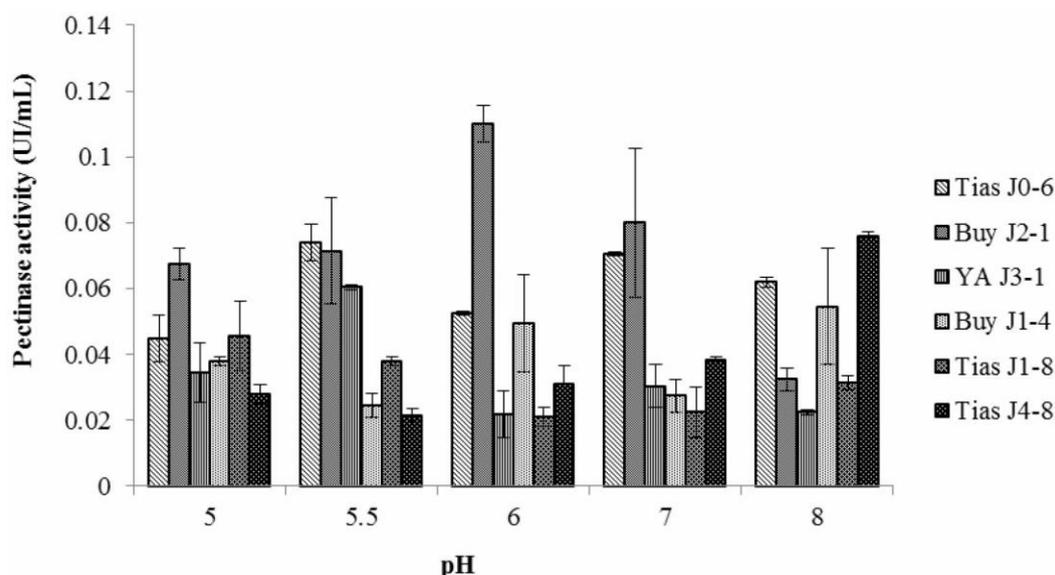


Figure 6. Effect of pH on pectinase excretion by *Yarrowia lipolytica* strains from fermented cocoa juice.

Saccharomyces cerevisiae IM1-8b and *Kluyveromyces marxianus* CECT1043 had maximum pectinase activities at pH 4.5 [30, 31].

Effect of incubation temperature

The optimal temperature for pectinase production by each *Yarrowia lipolytica* strain was measured by determining its activity at different temperatures. Generally, the effect of incubation temperature also showed that the production of pectinase decreased with increase in incubation temperature. As shown in Figure 7, of the five incubation temperatures tested (30, 40, 50, 60 and 70 °C) maximal pectinase production was observed at 30 and 40 °C incubation. The activity of the enzyme was markedly decreased at temperatures higher than 40 °C. Among the six isolates selected, only Tias J0-6 strain had optimal pectinase activity (0.151 ± 0.003 U/mL) at 40 °C. The maximum pectinase activity of others isolates was obtained at 30 °C. At this temperature (30 °C), the enzyme activities ranged between 0.171 ± 0.001 and 0.124 ± 0.002 U/mL. Also, the statistical analysis showed a significant difference among the isolates. Among the isolates selected, the highest pectinase activity was obtained with YA J3-1 strain (0.171 ± 0.001 U/mL), Buy J4-1 strain (0.143 ± 0.001 U/mL) and Tias J4-8 strain (0.143 ± 0.004 U/mL). The maximum pectinase

activity of YA J3-1, Buy J4-1 and Tias J4-8 strains was recorded at 30 °C. Thus, some authors reported that the activities of polygalacturonase and pectin lyase of *Saccharomyces cerevisiae* isolated and identified from fruit wastes reached maximum at 30 °C. Similar results with respect to the optimum fermentation temperature of 30 °C were observed in the case of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus foetidus* and *Kluyveromyces wickerhamii* [32, 33, 34]. Similar to the case with pH, the optimum temperature could depend on the microorganisms.

CONCLUSION

The results revealed that out of the 240 yeasts isolates from fermented cocoa juice, six isolates Tias J0-6, YA J3-1, Buy J4-1, Tias J1-8, Buy J2-1, and Tias J4-8 that produced pectinase were identified as *Yarrowia lipolytica* species. Concerning pH, maximal pectinase activities have been observed at pH 5.5 and 6. Regarding temperature, maximal pectinase activities were observed at 30 and 40 °C. With regard to incubation time, maximal pectinase activities were observed at 12 h. On the basis of the pectinase physicochemical characteristics produced through the six strains Tias J0-6, YA J3-1, Buy J4-1, Tias J1-8, Buy J2-1, and Tias J4-8, three strains Tias J0-6, YA J3-1, and Buy J2-1 seemed to be the suitable candidates

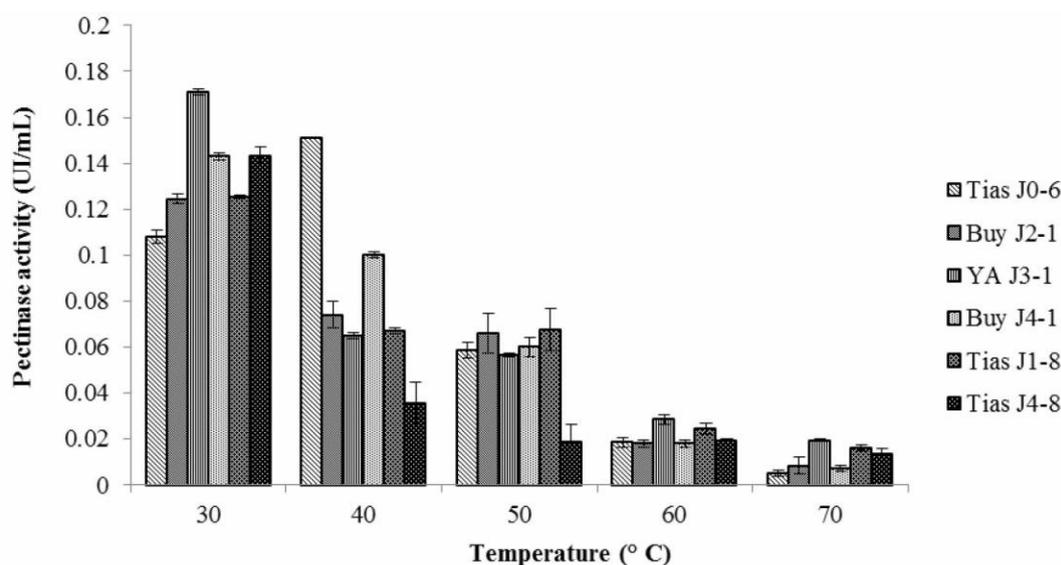


Figure 7. Effect of temperature on pectinase excretion by *Yarrowia lipolytica* strains from fermented cocoa juice.

for purification and biochemical characterization of pectinase.

ACKNOWLEDGMENT

Thanks to head master and her team of Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM EA3882) Technopôle Brest-Iroise 29280 Plouzané for their technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. Franzen, M. and Mulder, M. B. 2007, *Biodiversity and Conservation*, 16, 3835-3849.
2. ICCO: International Cocoa Organization. 2019.
3. Moscatto, J. A., Prudêncio-Ferreira, S. H. and Haully, M. C. O. 2004, *Giência et Tecnologia dos Alimentos*, 24, 634-640.
4. Guehi, T. S., Dingkuhn, M., Cros, E., Fourny, G., Ratomahenina, R., Moulin, G. and Clement, A. 2007, *Research Journal of Applied Biological Sciences*, 3, 838-843.
5. Ayindé, O. E., Ojo, V., Adeyina, A. A. and Adesoye, A. 2010, *Pakistan Journal of Nutrition*, 9, 195-197.
6. Bazarte, H., Sangronnis, E. and Unai, E. 2008, *Sociedad Latinoamericana de Nutrition*, 58, 64-70.
7. Carr, J. G. 1982, *Cocoa*. In *Economic Microbiology* (Ed). A. H. Rose, Academic Press.
8. Barel, M. 2009, *Du cacao au chocolat, l'épopée d'une gourmandise*, Quae.
9. Baensch, W. 2000, *Gate Information Service*, gtz, pp. 18.
10. Anvoh, K. Y. B. 2012, *Thèse Unique*, Abidjan.
11. Guehi, S. T., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D. K. and Zahouli, G. I. B. 2010, *Journal of Food Science and Technology*, 2, 163-171.
12. Miller, G. L. 1959, *Anal. Chem.*, 31(3), 426-428.
13. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990, *PCR protocols. A guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Ed.), Academic Press, San Diego, 315-322.
14. Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. 1998, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
15. Jacques, N., Mallet, S. and Casaregola, S. 2009, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 1242-1251.
16. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. 2007, *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
17. Banu, A. R. Kalpana, M. D. Gnanaprabhal, G. R. Pradeep, B. V. and Palaniswamy, M. 2010, *Indian J. Sci. Technol.*, 3, 377-381.
18. Thangaratham, T. and Manimegalai, G. 2014, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3, 357-365.
19. Dange, V. U. and Harke, S. 2018, *International Journal of Life Sciences Research*, 6, 83-95.
20. Poondla, V., Bandikari, R., Subramanyam, R. and Obulam, V. S. R. 2015, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 70-76.
21. Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, A. and Tewari, R. 2000, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 277-282.
22. Okonji, R. E. Itakorode, B. O. Ovumedia, J. O. and Adedeji, O. S. 2019, *J. App. Biol. Biotech.*, 7, 1-8.
23. Bouatenin, K. M. J. P., Djeni, N. T., Kouame, K. A., Coulibaly, W. H. and Dje, K. M. 2019, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101217.
24. Dzogbefia, V. P., Ametefe, G. D. and Kwatia, C. A. S. 2017, *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3, 78-86.
25. Piccoli-valle, R. H. Passos, F. M. L. Passos, F. J. V. and Silva, D. O. 2001, *Braz. J. Microbiol.*, 32, 135-140.
26. Ameko, E. 1998, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana.
27. Gognies, S., Gainvors, A., Aigle, M. and Belarbi, A. 1999, *Yeast*, 15, 11-22.
28. Manashi, J., Madhur, N. and Ravindra, A. 2015, *Preparative Biochem. Biotech.*, 45, 205-250.

-
29. Silva, D., Martins, E. S., Silva, R. and Gomes, E. 2002, *Br. J. Microbiol.*, 33, 318-324.
 30. Birgisson, H., Delgado, O., Garcia, B., Arroyo, L., Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. 2003, *Extremophiles*, 7, 185-193.
 31. Eschstruth, A. and Divol, B. 2011, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 623-634.
 32. Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A. and Villa, T. G. 1994, *Canad. J. Microbiol.*, 40, 974-977.
 33. Kumar, Y. S. Vijayakumar, P. and Reddy, O. V. S. 2012, *Food Biotechnol.*, 26, 107-123.
 34. Moyo, S. Gashea, B. A. Collisona, E. K. and Mpuchaneb, S. 2003, *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 87-100.

PUBLICATIONS

Publication 2

Assessment of physicochemical, biochemical and functional properties of mucilage cocoa juice during storage at room temperature. *Open Journal of Food and Nutrition*, 2022, 1, 10-27.

“Extrait de la these”.

Article

Assessment of physicochemical, biochemical and functional properties of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

Tano Marie-Ange Sakia Mian ^{1,2}, Fatoumata Camara ², Wahauwouele Hermann Coulibaly ^{3,*}, Grah Avit Maxwell Beugré ¹

¹Laboratoire d'agro-valorisation; Unité de Formation et de Recherche d'Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire

²Laboratoire de Nutrition et Sécurité Alimentaire, Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments (UFR-STA), Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

³Laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie des Aliments, Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments (UFR-STA), Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

*Correspondence: wahauwouele@yahoo.fr; +2250707731604; Côte d'Ivoire

Abstract: Beans cocoa exploitation process generated by-products such as mucilage cocoa juice. This juice called "cocoa water" was often considered as waste because her storage is delicate at room temperature. The aim of this study was to assess self-life of mucilage cocoa juice during storage at room temperature. Consumption survey revealed that mucilage cocoa juice was self-life until 72 hours at room temperature and according to surveyed population, he possessed laxative, strengthening and anti-diarrheal properties. For all physicochemical, biochemical and functional parameters assessed during storage at room temperature, variations were irregular. Also, mucilage cocoa juice samples have phenolic compounds contents and antioxidant activities important and high energetic values.

Keywords: Mucilage cocoa juice, storage at room temperature, phenolic compounds, antioxidant activities

How to cite this paper: Mian, T. M. A. S., Camara, F., Coulibaly, W. H., & Beugré, G. A. M. (2022). Assessment of physicochemical, biochemical and functional properties of mucilage cocoa juice during storage at room temperature. *Open Journal of Food and Nutrition*, 1(1), 10–26. Retrieved from <https://www.scipublications.com/journal/index.php/ojfn/article/view/186>

[cations.com/journal/index.php/ojfn/article/view/186](https://www.scipublications.com/journal/index.php/ojfn/article/view/186)

[dex.php/ojfn/article/view/186](https://www.scipublications.com/journal/index.php/ojfn/article/view/186)

Received: November 20, 2021

Accepted: February 3, 2022

Published: February 4, 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The cocoa tree (*Theobroma cacao* Linne) is widely farmed for its beans in tropical farms around the world [1]. Three nations (Côte d'Ivoire, Ghana, and Cameroun) are the largest producers, contributing for more than 70% of global production in 2018-2019. [2]. Only one country, Côte d'Ivoire, accounts for more than 35 percent of global production [2]. Her entire output was meant for sale to industrialized countries (Europe and America), where the fermented cocoa beans were mostly used to make chocolate. Cocoa "fermentation" is one of the phases in post-harvest processing that determines the quality of the final product. The cocoa beans are embedded in a mass of mucilaginous pulp in the pods, and after both beans and pulp were removed from the pods, the mucilaginous pulp was destroyed by pectinolytic enzymes to produce a mucilage fluid known as "cocoa water" or "cocoa honey" [3-4]. Mucilage juice is created when the mucilaginous pulp enclosing beans is broken down, resulting in cotyledon death [5]. This beverage is popular among farm laborers and their children. However, fermentation of cocoa beans involved multiple processes, resulting in by-

products that are frequently discarded as waste. Indeed, each year, more than 300 million liters of mucilage liquid are wasted during the shucking process [6].

Furthermore, the high level of alcohol obtained after a few days of storage at room temperature in juice could indicate the presence of yeasts with a relatively high resistance and tolerance to alcohol and metabolites produced, such as organic acids (acetic acid, lactic acid, citric acid), and other products that influenced the taste [7]. Anvoh [6] found that under controlled fermentation to 28 °C and 35 °C, the alcohol concentrations of mucilage juice were 7.8% and 8.4%, respectively, in her investigation.

According to Cocolin *et al.* [8], 38 % and 54 % of total isolates from cocoa bean fermentation could grow at 8, 10 and 12% (v/v) of ethanol, respectively. *S. cerevisiae* grew the fastest at 12 % ethanol. The majority of investigations on cocoa fermentation were focused on beans at the time of handover. Some authors researched cocoa mucilage juice to transform it into marmalade, vinegar, wine, and refreshing beverages [4-6-7-9]. Therefore, objective of this study was to determine the maximum storage and consumption time of mucilage cocoa juice through survey. The physicochemical, biochemical and functional properties were investigated.

2. Materials and Methods

2.1 Survey form

A survey sheet has been prepared to determine the knowledge level of mucilage juice of cocoa, maximal storage time, beneficial effects eventual. The next analyses depended of survey results.

2.2. Material

The mucilage cocoa juices were collected from five (05) cocoa producers in different locations: Akoupé: (6.3879° N, 3.8808° W) and Yakasse-Attobrou: (6.1853° N, 3.6446° W) in the south-east; Tiassalé (5.9043° N, 4.8261° W) in the south; Taabo (6.2338° N, 5.1394° W) in the center; and Buyo. Moreover, samples were taken from production equipment's, with five (05) liters being taken aseptically in sterile plastic bottles, the samples being maintained in a box containing ice, and being routed to the laboratory. The bottles were kept at room temperature in the laboratory. Each 24 hours, mucilage cocoa juices were sampled for different analyses.

2.3. Methods

2.3.1. Study sites and population

The surveys were conducted in the same localities where samplings have been carried. For this study, 500 people were interviewed with 100 per locality.

2.3.2. Size of individuals to be investigated

The sample size for this investigation was determined using Israel's [10] formula for a non-exhaustive independent sample.

$$n = t^2 (p (1 - p)) / e^2 \quad (1)$$

With n denoting the sample size, e denoting the margin of error, t denoting the margin coefficient calculated from the confidence rate, and p denoting the population in the study area. Based on data from the general population census of Côte d'Ivoire, the sample for each area was created using the probability approach proportional to the size of households in each locale [11-12].

Consumers are given step-by-step instructions on how to complete the questionnaire on the websites. The questions were either multiple choice questions with two

or three possible responses or yes/no questions with true/false answers. The final survey was organized around three (3) primary points: knowledge and consumption of cocoa mucilage juice, storage time of cocoa mucilage juice and eventual benefits effects of cocoa mucilage juice.

2.3.3. Physicochemical and biochemical analyses

The constant weight method was used to determine the ash content and moisture level [13]. Fat content was estimated using a liquid-liquid extraction in according with method AOAC [13]. Protein content was evaluated with Kjeldahl method [13]. The amount of fibers in the sample was determined using Wolf's method [14]. The glucid total contents and energetic values were determined by calcul from others biochemical compounds contents.

The vitamins (ascorbic acid and cobalamin) organic acids (lactic, malic, oxalic, propionic, tartaric, citric and acetic acids) were separated and quantified by Shimadzu LC-6A Liquid Chromatograph, equipped by a detector (Shimadzu SPD-6A UV Spectrophotometric detector) a pump (Shimadzu LC-6A Liquid Chromatograph) and an Integrator (Shimadzu C-R 6A Chromatopac). An ion-exclusion ORH-801 column was used for chromatographic separation (300 mm x 6.5 mm, Interchrom, France). The eluant was 0.004 N H₂SO₄ at a flow rate of 0.8 ml/min, with a 210 nm detector. For HPLC samples, a 20 µL injection volume was used. The analysis was carried out twice and the mean values were used. The organic acids standards were dissolved in distilled water at values between 0.05 and 0.4 g/L. The standards were filtered and injected into the same containers as the samples. By comparing retention periods and peak areas to those of a standard, components were found and quantified.

2.3.4. Phytochemical contents of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

2.3.4.1. Phenols total contents

The Folin-Ciocalteu colorimetric technique was used to determine total phenol content [15]. After centrifugation, 250 µL of diluted Folin-Ciocalteu-reagent (10% v/v) were added to a 50 µL aliquot of the final result. After 1 minute, 750 µL of aqueous Na₂CO₃ (20% w/v) was added, and the volume was adjusted to 5.0 mL using H₂O. Except for the sample, the controls contained all of the reaction reagents. The absorbance was measured at 760 nm after 2 hours of incubation at 25 °C and compared to both a gallic acid calibration curve and controls. Total phenols were measured in gallic acid equivalents per mL (g GAE/mL), and the results were provided as the means of three measurements.

2.3.4.2. Total flavonoid contents

The AlCl₃ colorimetric technique was used to estimate total flavonoid content [16]. A total of 0.5 mL of sample was mixed with the corresponding amounts of distilled water, aluminum trichloride (AlCl₃) 10% (w/v) (Labosi, Paris, France), sodium acetate (1 M), and 2 mL of water. On a Rayleigh spectrophotometer, absorbance at 415 nm was recorded after 30 minutes of incubation at room temperature (UV spectrophotometer; USA). Total flavonoid contents were determined using the means of three replicates and compared to a 0–300 g/mL quercetin calibration curve (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).

2.3.4.3. Total tannins contents

The Bate-Smith reaction, in which colorless proanthocyanidins are converted into colored anthocyanins by heating at 100 °C in an acidic solution and their amounts assessed based on their absorbance at 550 nm, was used to determine easily

extractable tannins [17]. Two (2 mL) sample, 1 mL distilled water, and 3 mL 12N hydrochloric acid were added to two test tubes. One sample test tube was kept standing while the other was hermetically sealed and immersed in a water bath at 100 °C for 30 minutes before cooling in ice for 10 minutes. Each test tube received 0.5 mL of ethanol, and the optical densities were measured. The concentration of tannins in g/L was determined by using the following equation, which is proportional to the concentration of anthocyanins.

$$\text{Total tannins} = 19.33 * \Delta DO \quad (2)$$

The difference in optical density between the two tubes is denoted by ΔOD

2.4. Antioxidants activities

2.4.1. Antiradical activity: DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) assay

The DPPH assay method, which is one of the most widely used methods for assessing the antioxidant capacity of natural products, was chosen because of its simplicity and accuracy [18]. In the presence of an alcoholic solution of DPPH, yielding the free radical form DPPH, the antioxidant activities of mucilage cocoa juice are assessed by evaluating their respective free radical scavenging abilities [19]. In a methanol solution, the samples were mixed with the stable DPPH radical. 2 mL sample, 2 mL DPPH radical solution 100 mM in methanol were added to the reaction mixture. When DPPH combines with an antioxidant that can donate hydrogen, it undergoes a transformation. From deep violet to bright yellow in color. Using a Rayleigh UV spectrophotometer, the color changes after 30 minutes of reaction time were measured as Absorbance (Abs) at 517 nm (USA). Using equation (3), the rate of scavenging activity (AA %) was estimated as follows:

$$AA = \left[\frac{X-Y}{X} \right] * 100 \quad (3)$$

Where X is the absorbance at 517 nm of oxidized DPPH in pure unreacted form and Y is the absorbance of the sample after 30 min incubation with DPPH.

2.4.2. Ferric reducing-antioxidant power FRAP (potassium ferricyanide ferric chloride) assay

Using the potassium ferricyanide-ferric chloride method, the ferric ion (Fe^{3+}) reduction ability of mucilage cocoa juice samples was examined [20]. A 0.5 mL aliquot of each sample was mixed with 0.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 0.5 mL of potassium ferricyanide $K_3Fe(CN)_6$ (1 percent) and incubated at 50 C for 20 minutes. A volume of 0.5 mL trichloroacetic acid (10% (w/v)) was used to stop the reaction. The absorbance of 0.5 mL of the reaction mixture was measured at 700 nm after it was mixed with 0.8 mL of distilled water and 0.1 mL of $FeCl_3$ (0.1 %). Each sample's reducing power was measured in μg of ascorbic acid equivalents (AAE) per mL.

2.5. Statistical analysis

The R software was used to do an analysis of variance, and Tukey's test was used to identify differences between mean values ($P < 0.05$). In order to regroup mu- cilage cocoa juices during storage which have the same characteristics during storage, dendrogram was done using R. Pearson correlation analysis was used to look into any links between antioxidant activity and the presence of phenolic substances.

3. Results

3.1. Data survey

3.1.1. Profile of the surveyed population

The survey allowed to establish socio-demographic profile of the respondents. The results showed that 79% of the respondents were male, compared with 31% who were female. The main age groups were 25 to 50 years (62.2%) and 15 to 25 years (30.8%). Most of the respondents had no education (54.4%), the majority of whom worked in the agricultural sector (71%), and married people (67.8%) were the most numerous. Among the people interviewed, Ivorians (77.4%) and Burkinabe (19.8%) were the most dominant (Data not shown).

3.1.2. Knowledge, consumption and frequency of consumption by the population interviewed

The survey revealed that all respondents (500 people: 100%) knew about mucilage cocoa juice and 98.8% of interviewed consumed it. Also, the respondents preferred to consume mucilage cocoa juice more during field work (37%) and in the evening (33%) with a frequency of 3 times (31.80%) and more than 3 times (32.60%) per day (Data not shown).

3.1.3. Amount consumed, storage time and beneficial effect of mucilage cocoa juice

Most interviewed claimed, that they consumed more than 3 liters per day (52.8%) and that the cocoa mucilage juice had a maximum self-life of 3 days (46.96%).

Number of respondents stated that they felt a beneficial effect (95.14%) following the consumption of mucilage cocoa juice. Among these beneficial effects, the laxative (39.70%) and strengthening (20.44%) characteristics were the ones most mentioned by the interviewed ([Table 1](#)).

Table 1. Amount consumed, storage time and beneficial effect of mucilage cocoa juice

Parameters	Number of re- spondents	Percentage
Amount of consumed juice (n = 494)		
250 mL	46	9.31
500 mL	98	19.89
3 L	261	52.80
Others	89	18
Storage time (n = 494)		
24 hours	31	6.27
48 hours	145	29.37
72 hours	232	46.96
More than 3 times	86	17.4
Benefit effect (n=494)		
Yes	470	95.14
No	24	4.86
Effect (n=494)		
Laxative	196	39.70
Strengthening	101	20.44
Anti-diarrheal	80	16.19
Digest	52	10.52
Others	39	7.89
None	26	5.26

n= number of people surveyed

3.2. Physicochemical and biochemical characteristics of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

From the survey's data, mucilage cocoa juice had a maximum self-life of 3 days. Thus, sampling during mucilage cocoa storage have been done until 3 days. The results of physicochemical and biochemical characteristics of mucilage cocoa juice during storage have been assessed each 24 hours during 72 hours (3 days).

3.2.1. Evolution of physicochemical parameters of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

The analysis of physicochemical parameters was focused on dry matter, moisture, ash, protein, lipids, fibers and carbohydrate. The values of the evolution of these parameters were consigned in the [Table 2](#). Generally, and whatever the parameter, the values of these parameters evolved in an irregular way during the conservation. On the other hand, total lipids and total fibers were not detected in our samples. From all the parameters studied, total carbohydrates have the highest content between 11.46 and 1.64%. Furthermore, statistical analyses showed a significant difference between the samples during storage.

Table 2. physicochemical parameters of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

		T0	T24	T48	T72
	Dry matter	12.29±0.063 a	12.31±0.084 a	11.89±0.014 a	5.29±0.14 c
	Moisture	87.70±0.063 e	87.64±0.014 c	88.11±0.014 e	94.725±0.16 c
	Ash	0.63±0.05 a	0.59±0.06 a	0.48±0.02 ab	0.38±0.04 b
	Protein	0.30±0 b	0.31±0.01 b	0.77±0.01 a	0.37±0.01 b
	Lipid	0	0	0	0
	Fiber	0	0	0	0
Taabo	carbohydrate	11.37±0.07 bc	11.46±0.1 a	10.64±0.04 b	4.53±0.07 a
	Dry matter	11.44±0.12 b	6.965±0.02 b	8.605±0.1 c	10.04±0.007 a
	Moisture	88.56±0.12 d	93.035±0.02 b	91.395±0.10 c	89.95±0.007 e
	Ash	0.44±0.007 b	0.25±0.03 c	0.285±0.012 c	0.43±0.04 b
	Protein	0.40±0.009 a	0.25±0.009 c	0.33±0.01 b	0.41±0.02 b
	Lipid	0	0	0	0
Yakassé	Fiber	0	0	0	0
Attobrou	carbohydrate	10.60±0.02 bc	6.47±0.04 a	8.37±0.13 a	9.21±0.07 a
	Dry matter	5.46±0.11 e	4.125±0.007 c	9.415±0.07b	8.7±0.16 b
	Moisture	94.54±0.11 a	97.375±2.12 a	90.58±0.077 d	91.3±0.16 d
	Ash	0.17±0.03 c	0.14±0.04 c	0.44±0 bc	0.425±0.03 b
	Protein	0.12±0.02 c	0.12±0.01 d	0.30±0.009 b	0.4±0.008 b
	Lipid	0	0	0	0
	Fiber	0	0	0	0
Akoupé	carbohydrate	5.17±0.06 a	2.37±0.05 a	8.68±0.04 a	7.88±0.04 a
	Dry matter	5.875±0.02 d	3.64±0.04 d	3.545±0.007 d	3.35±0.04 d
	Moisture	94.125±0.02 b	96.36±0.04 a	96.45±0.007 b	96.65±0.04 b
	Ash	0.615±0.02 a	0.42±0.05 b	0.62±0.03 a	0.63±0.07 a
	Protein	0.3±0.008 b	0.66±0.02 a	0.14±0 d	0.2±0 c
	Lipid	0	0	0	0
	Fiber	0	0	0	0
Tiassalé	carbohydrate	4.97±0.05 c	2,56±0.05 c	2,79±0.02a	2,52±0.06 d
	Dry matter	7.28±0.02 c	3.075±0.007 e	2.675±0.16 e	2.445±0.03 e
	Moisture	92.72±0.02 c	96.92±0.007 a	97.325±0.16 a	97.55±0.035 a
	Ash	0.38±0.07 b	0.27±0 c	0.40±0.04 bc	0.35±0.02 b
	Protein	0.27±0 b	0.31±0 b	0.25±0.01 c	0.46±0.01 a
	Lipid	0	0	0	0
	Fiber	0	0	0	0
Buyo	carbohydrate	6.63±0.42 d	2.5±0.02 c	2.03±0.03 c	1.64±0.07 e

Values are means ±standard deviation, n=3. Means in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test ($p < 0.05$).

3.3 Evolution of biochemical parameters of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

3.3.1 Changes in the vitamin

The analysis of vitamin content allowed identification and quantification of 2 vitamins: ascorbic acid and cobalamin. An irregularity in evolution of contents of vitamins (ascorbic acid and cobalamin) was observed for all samples (Table 3). Globally, cobalamin contents were higher than ascorbic acid contents. The highest ascorbic acid and cobalamin contents were recorded at the beginning of storage in the Tiassalé sample with 14.97 ± 0.45 and 34.51 ± 66.09 g/L respectively. The lowest concentration of ascorbic acid was obtained with the Buyo sample after 48 h of conservation, while the lowest concentration of cobalamin was observed with the Akoupé sample at the beginning of conservation and the Buyo sample at the end of conservation with 10.245 ± 0.5 and 12.52 ± 0.39 g/L respectively. Furthermore, statistical analysis showed a significant difference between samples during storage.

Table 3. Vitamin contents (g/L) in mucilage cocoa juice during storage at room temperature

		T0	T24	T48	T72
Tiassalé	Ascorbic acid	$14.970 \pm 0.45b$	$2.465 \pm 0.02 e$	$3.59 \pm 0.57 fg$	$5.93 \pm 0.44 e$
	Cobalamin	$34.51 \pm 66.09 a$	$14.30 \pm 00a$	$13.52 \pm 0.67 bc$	$14.87 \pm 0.7 a$
Yakassé Attobrou	Ascorbic acid	$4.625 \pm 0 e$	$8.21 \pm 2.96 d$	$7.74 \pm 1.65 de$	$4.545 \pm 1.12 e$
	Cobalamin	$14.665 \pm 0.38 bc$	$13.56 \pm 0.01 ab$	$12.87 \pm 1.06 c$	$12.52 \pm 0.39 abc$
Buyo	Ascorbic acid	$5.175 \pm 0.41 e$	$2.26 \pm 1.67 e$	$2.25 \pm 1.41 g$	$5.255 \pm 0.64 e$
	Cobalamin	$13.84 \pm 0.81 bc$	$13.39 \pm 0.69 ab$	$15.935 \pm 2.43 b$	$10.25 \pm 1.09 cd$
Akoupé	Ascorbic acid	$10.435 \pm 0.86 cd$	$7.5 \pm 0.7 d$	$5.27 \pm 0.29 ef$	$9.205 \pm 2.89 d$
	Cobalamin	$10.245 \pm 0.5 cd$	$11.03 \pm 0.29 bc$	$20.61 \pm 0.25 a$	$12.15 \pm 0.19 bc$
Taabo	Ascorbic acid	$7.43 \pm 0.43 de$	$9.6 \pm 0.63 cd$	$9.29 \pm 0.12 d$	$4.73 \pm 0.38 e$
	Cobalamin	$13.86 \pm 0 bc$	$13.75 \pm 0.03 a$	$12.98 \pm 0.28 c$	$12.94 \pm 0.11 ab$

Values are means \pm standard deviation, $n=3$. Means in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test ($p < 0.05$).

3.3.2 Changes of the organic acid content

The analysis of organic acid content by HPLC allowed identification and quantification of 6 organic acids: tannic, citric, tartaric, fumaric, lactic and acetic acids. As other parameters, evolution of organic acid contents during storage was irregular. The lowest concentration was obtained with fumaric acid, whatever sample, during the whole storage period, whereas highest concentrations were observed with citric and tartaric acids after 24 hours of storage in the Tiassalé sample, with 75.66 ± 1.32 and 77.77 ± 1.31 g/L respectively (Table 4). Furthermore, statistical analyses showed a significant difference between the samples during storage.

Table 4. Organic acids content (g/L) of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

		T0	T24	T48	T72
Tiassalé	Tannic acid	0.505±0.02 ij	4.19±1.28 h	2±0.02 l	0.87±0.09 mn
	Acetic acid	0.89±0.01 hij	7.42±0.04 fg	3.71±0.01 k	1.55±0.07 lmn
	Citric acid	9.2±1.13 cd	75.66±1.32 b	35.68±0.1 c	15.83±1.37 e
	Lactic acid	4.03±0.02 f	33.33±4.2 d	17.53±1.3 e	6.97±0.09 i
	Fumaric acid	0.062±0.001 j	0.51±0.01 kl	0.25±0.07 o	0.1±0.02 n
	Tartric acid	9.45±0.07 cd	77.77±1.31 a	36.8±0.07 ab	16.27±0.04 e
Yakassé Attobrou	Tannic acid	1.405±0.02 ghij	0.855±0.02 kl	0.99±0.007 mno	1.675±0.14 klmn
	Acetic acid	2.57±0.09 fgh	1.66±0.29 jkl	1.8±0.07 lm	2.55±0.11 klm
	Citric acid	23.52±1.38 a	14.66±0.25 e	19.41±0.72 d	21.44±1.14 d
	Lactic acid	10.55±1.34 c	6.71±0.37 g	7.89±1.28 i	10.88±0.20 gh
	Fumaric acid	0.16±0.007 j	0.1±0.0007 l	0.13±0.02 o	0.18±0.004 n
	Tartric acid	25.13±1.37 a	15.7±0.14 e	18.41±0.01 e	24.31±1.4 c
Buyo	Tannic acid	1.3±0.02 hij	1.98±0.02 ijk	1.9±0.01 lm	1.57±0.04 lmn
	Acetic acid	2.3±0.07 fghi	3.51±0.04 hij	3.63±0.04 k	2.82±0.05 kl
	Citric acid	23.3±1.55 a	35.75±0.14 c	36.38±0.51 bc	28.25±1.59 ab
	Lactic acid	10.34±0.07 c	15.78±0.02 e	16.24±0.01 f	12.49±1.28 fg
	Fumaric acid	0.15±0.001 j	0.24±0.04 kl	0.21±0.04 o	0.19±0.003 n
	Tartric acid	24.095±2.87 a	36.43±0.57 c	37.39±0.57 a	29.97±1.68 a
Akoupé	Tannic acid	0.41±0.02 ij	0.43±0.04 kl	0.8±0.04 no	0.58±0.01 n
	Acetic acid	0.743±0.00 hij	0.752±0 kl	1.43±0.01 lmn	1.047±0.01 mn
	Citric acid	7.58±2.71 de	7.6±0.42 fg	14.48±0.11 g	10.47±2.72 h
	Lactic acid	3.33±1.37 fg	3.56±0.12 hi	6.39±0.12 j	4.61±0.15 j
	Fumaric acid	0.05±0.003 j	0.054±0.002 l	0.097±0.009 o	0.07±0.01 n
	Tartric acid	7.77±1.31 de	7.87±0.09 fg	14.88±1.3 g	10.76±1.32 gh
Taabo	Tannic acid	0.80±0.03 hij	0.51±0.04 kl	0.56±0.01 no	1.57±0.09 lmn
	Acetic acid	1.48±0.11 ghij	0.86±0.008 kl	0.976±0.008 mno	3.44±0.48 jk
	Citric acid	14.48±0.11 b	9.23±0.66 f	10.37±0.09 h	27.915±0.75 b
	Lactic acid	6.92±0.65 e	4.32±0.73 h	4.49±0.01 k	13.34±0.21 f
	Fumaric acid	0.549±0 hij	0.058±0.002 l	1.03±0.01 mno	0.19±0.003 n
	Tartric acid	15.88±0.11 b	8.97±0.09 f	9.92±0.02 h	29.11±0.15 ab

Values are means ±standard deviation, n=3. Means in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test(p < 0.05).

3.3.3. Changes of the energetic value

The changes of the energy value of the cocoa juices during storage is presented in Figure 1. It emerges from this analysis that these values evolve in an irregular manner whatever the sample. At the beginning of storage, the highest energy value was obtained with the Taabo sample with 40.59±0.8 Kcal/100 mL, followed by the Yakasse-Attobrou sample with 37.84±0.9 Kcal/100 mL after 24 hours of storage. At 48 hours of conservation, the highest energy value was recorded with the Taabo sample with 37.98±0.6 Kcal/100 mL, whereas at the end of conservation this value was higher with the Akoupe sample (37.09±0.8 Kcal/100 mL).

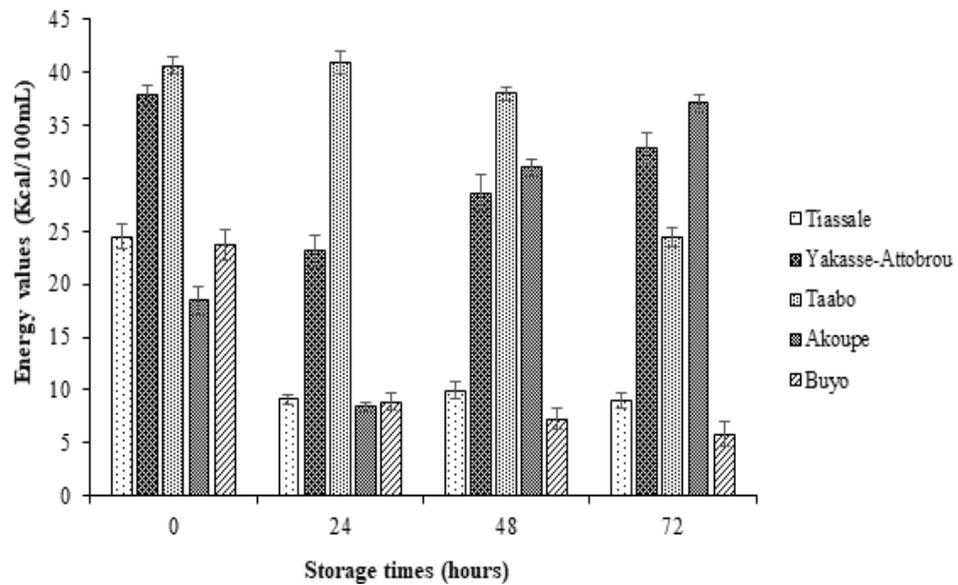


Figure 1. Evolution of energetic values of juices during storage

3.4. Evolution of phytochemical compounds of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

3.4.1. Changes of phenols total content

Phenols total content of mucilage cocoa juice during storage was presented in Figure 2. These contents evolve irregularly during storage. However, whatever sample, highest levels of phenols total were observed in Tiassalé juices throughout storage period. These contents ranged from 1.17 ± 0.7 at the beginning of storage to 1.32 ± 0 g/L GAE at the end of storage. Statistical analyses showed a significant difference between the samples during storage.

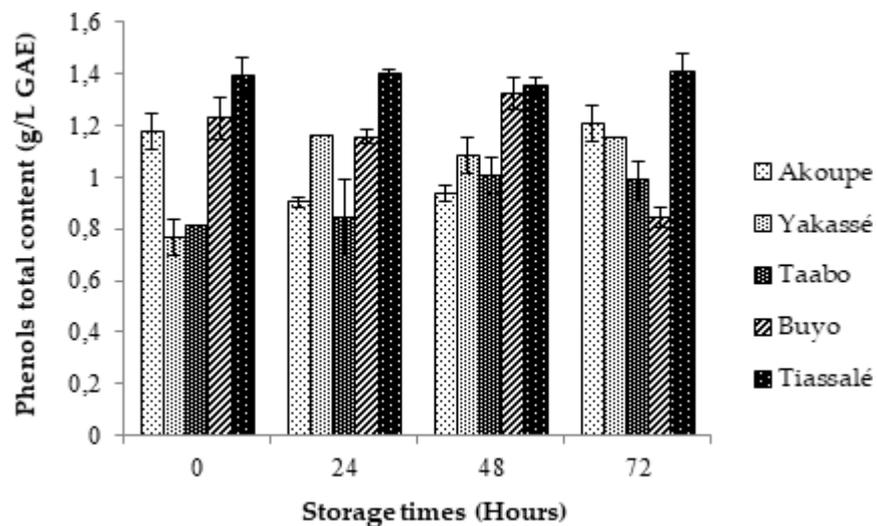


Figure 2. Phenols total contents variations of juices during storage

3.4.2. Changes of flavonoids total content

Figure 3 showed changes of total flavonoids contents of mucilage cocoa juice samples during storage. Like total phenols, total flavonoids evolution was characterized by irregular variations. Highest concentrations differed from one sample to

another during storage. Thus, at the beginning of storage (0h), highest content was obtained with Akoupé sample with 0.083 ± 0.00084 g/L EQ, followed 24 hours later by Buyo sample with 0.14 ± 0.00021 g/L EQ, and then Yakasse-Attobrou sample at 48h and at the end of storage (72h) with 0.21 ± 0.00042 and 0.16 ± 0.001 g/L EQ respectively. Also, the statistical analyses showed a significant difference between samples during storage.

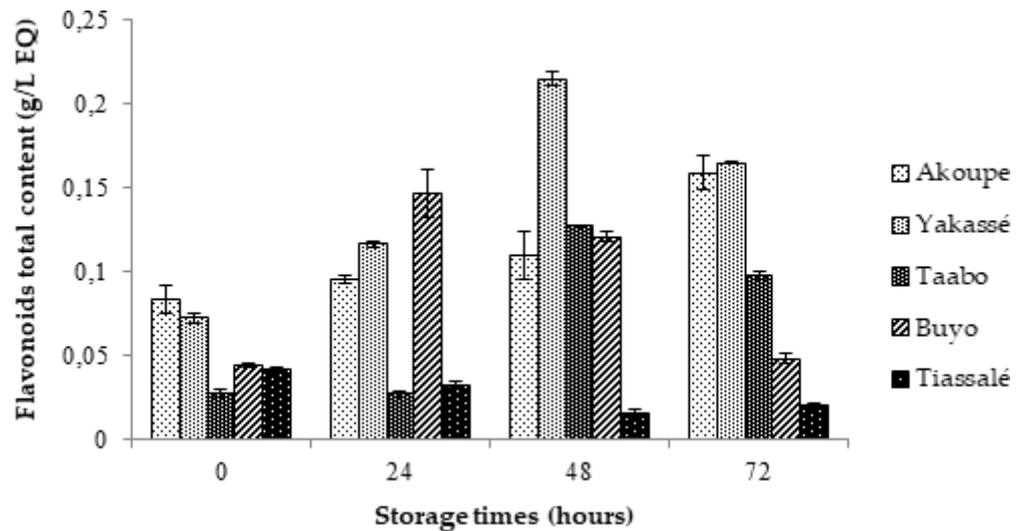


Figure 3. Flavonoids total contents variations of juices during storage

3.4.3. Changes of tannins total content

On the basis of total tannins content variations, samples can be classified into two groups. Thus, first group, was represented Akoupé and Tiassalé samples, which characterized by a decreasing in total tannins content during storage. The values went from 46.38 ± 1.36 to 2.89 ± 0 g/L and then from 60.40 ± 0.68 to 5.31 ± 0.68 g/L for Akoupé and Tiassalé samples respectively. The second group was composed of samples from Taabo, Yakasse-Attobrou and Buyo where total tannins content in mucilage cocoa juice during storage showed irregular fluctuations (Figure 4). Also, total tannins remained most abundant group of phenolic compounds in the juice samples. Furthermore, statistical analyses showed a significant difference between samples during storage.

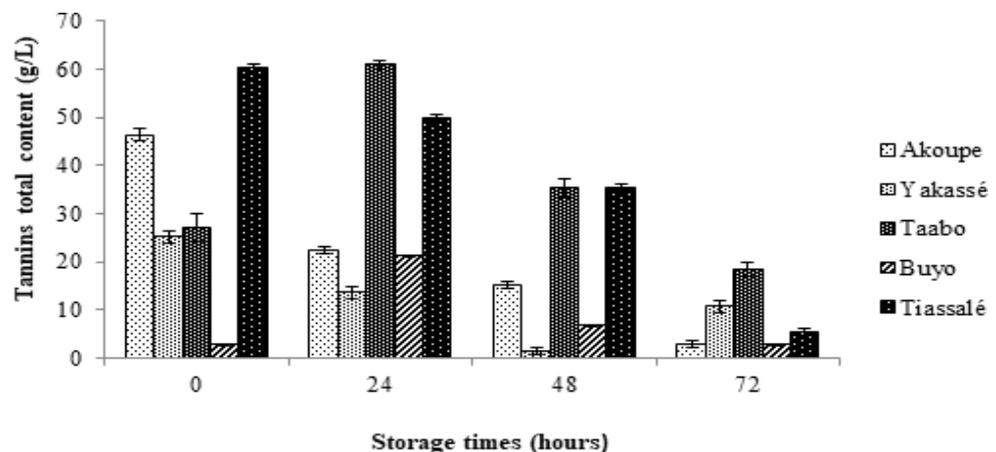


Figure 4. Tannins total contents variations of juices during storage

3.5. Antioxidant activities of mucilage cocoa juice during storage at room temperature

3.5.1. DPPH radical scavenging ability

DPPH radical scavenging ability rate allowed to characterize samples according to their evolution. Thus, Akoupe and Taabo samples were by regular variations reflected by a decreasing in activity from 40.07 ± 0.5 to $7.63 \pm 0.01\%$ and from 89.66 ± 7.6 to $2.35 \pm 0.01\%$ respectively. The irregularities in evolution of antioxidant activity were observed in samples from Tiassalé, Yakasse-Attobrou and Buyo (Figure 5). In addition, a significant difference was recorded between the samples during storage.

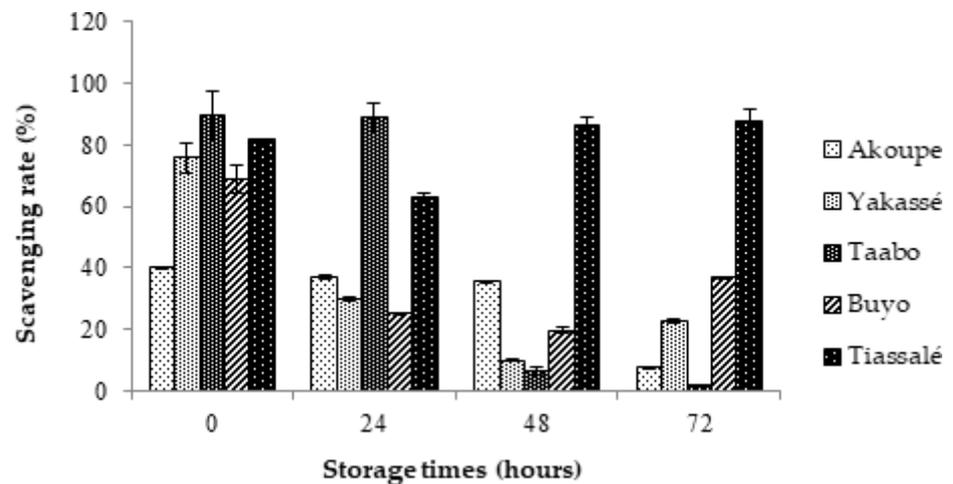


Figure 5. Scavenging rate of juices during storage

3.5.2. Ferric reducing-antioxidant power FRAP (potassium ferricyanide ferric chloride)

Evolution of antioxidant activity values determined by FRAP method was showed in Figure 6. For all samples, fluctuations were irregulars excepted for Taabo and Tiassalé samples. Taabo sample was characterized by an increase in antioxidant activity from 3.5 ± 0.56 $\mu\text{g/mL}$ of vitamin C at beginning of storage (0h) to 24.1 ± 0.14 $\mu\text{g/mL}$ of vitamin C at the end of storage (72h). On the other hand, in Tiassalé sample, a decrease in antioxidant activity was observed throughout storage period, with values lowed from 23.8 ± 2.77 to 7.43 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$ of vitamin C. Moreover, whatever sample, highest antioxidant activity was obtained with Buyo sample after 48 h of storage with 29.93 ± 1.30 $\mu\text{g/mL}$ of vitamin C whereas lowest activity was recorded in Taabo sample at beginning of storage (0) with 3.5 ± 0.56 $\mu\text{g/mL}$ of vitamin C. Also, a significant difference was recorded between the samples during storage.

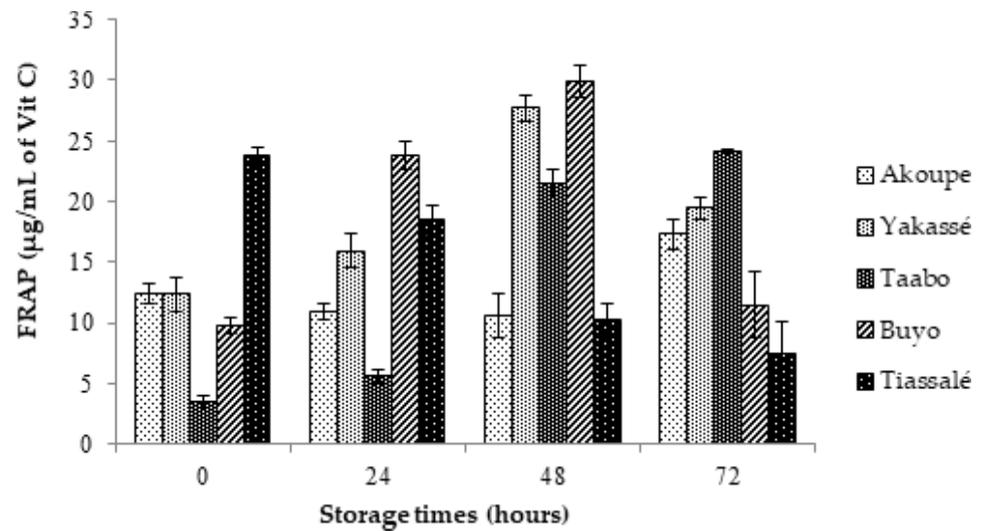


Figure 6. Antioxidant activity (FRAP) evolution of juices during storage

3.6. Correlation between phenolic compounds and antioxidant activities of mucilage coco juice during storage at room temperature

A correlation matrix has been created to explore the possible relationships between phenolic compounds and antioxidant activities during mucilage cocoa juice storage (tables not shown). At beginning storage (0h), antioxidant activity (FRAP) was positively correlated to total phenols and total tannins ($r=0.698$ and $r=0.688$ respectively). In contrast, a negative correlation has been observed between total flavonoids and antioxidant activity (DPPH) ($r=-0.807$). At 24 hours of storage, positive correlation has been recorded between antioxidant activity (FRAP) and total phenols and total flavonoids with $r=0.761$ and $r=0.610$ respectively whereas antioxidant activity (DPPH) and total tannins were positively correlated ($r=0.967$). Antioxidant activity (FRAP) was positively correlated with total flavonoids ($r=0.678$) and negatively with total phenols ($r=-0.867$), whereas correlation between antioxidant activity (DPPH) and total phenols was positive ($r=0.545$) and negative with total flavonoids ($r=-0.867$) at 48 hours of storage.

At the end of storage (72h), the reducing power of ferric iron to ferrous iron (FRAP) was positively correlated with total flavonoids ($r=0.705$) and total tannins ($r=0.759$). On the other hand, with free radical scavenging activity (DPPH), the analysis showed a positive correlation with total phenols with $r=0.549$ and a negative correlation with total flavonoids where $r=-0.732$.

3.7. Cluster dendrogram of mucilage coco juices during storage at room temperature

Dendrogram presented in [Figure 7](#) revealed that during storage, mucilage cocoa juices sampled in 5 aeras where cocoa was cultivated, showed the similarities and differences. This analysis has been carried out on basis physicochemical, biochemistry, phytochemical compounds and antioxidant activities parameters data. In this paragraph correlation coefficients to axis not mentioned. Thus, at beginning of storage (0h), mucilage cocoa juices have been regrouped in 3 class: Akoupe and Tiassalé samples were similar; also, Yakasse-Attobrou and Buyo samples were similar, but Taabo sample was different from previous samples ([Figure 7a](#)). At 24 h of storage, mucilage cocoa juice samples from Yakasse-Attobrou and Buyo were similar but different from others samples, which represented each one a different group ([Figure 7b](#)). After 48 hours of storage, cluster dendrogram showed that Akoupe and Yakasse-

Attobrou samples consisted a same group which was different from others samples. For others samples, each one was different from one another (Figure 7 c). At the end of storage (72h), samples from Taabo and Yakassé-Attobrou were identical. The samples from Buyo, Tiassalé and Akoupé were different from each other (Figure 7d).

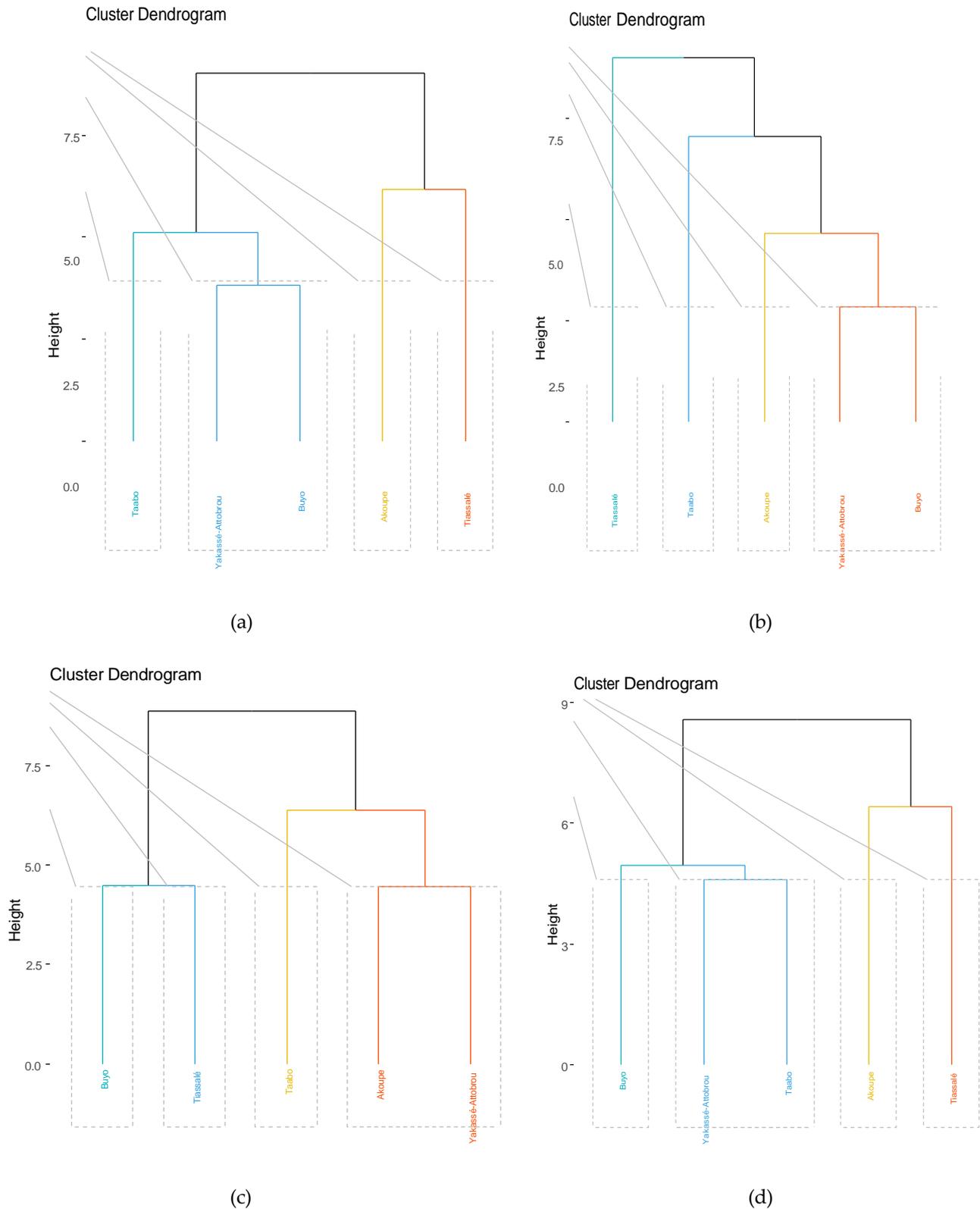


Figure 7. Cluster dendrogram of mucilage coco juices during storage at room temperature. (a) 0 h of storage; (b) 24 h of storage; (c) 48 h of storage; (d) 72 h of storage

4. Discussion

Mucilage cocoa juice, a cocoa by-product generated during the beans processing, was derived from degradation of mucilaginous pulp coating beans by pectinolytic action of yeasts present in environment [21]. Thus, often considered as a waste product, mucilage cocoa juice could have interesting nutritional properties. A survey conducted to determine level of knowledge of mucilage cocoa juice by population, its maximum shelf-life and benefits attributed to it. The survey showed that mucilage cocoa juice was very well-known by population, especially in rural areas, and was consumed with great frequency. Also, its high frequency of consumption was linked to properties attributed by consumers, in particular laxative, strengthening and anti-diarrheal. The maximum shelf-life of mucilage cocoa juice at room temperature storage was 3 days. In fact, people interviewed stated that juice was no longer pleasant to drink after 3 days because of alcohol produced. This alcohol occurrence associated with acidity of juice was due to spontaneous alcoholic fermentation triggered by yeasts present on beans processing equipment and in environment [22]. Thus, nutritional and functional analysis of mucilage cocoa juice during storage was carried out during 3 days.

Assessment of physicochemical, biochemical and functional parameters of mucilage cocoa juice showed in general an irregular evolution of these parameters. The moisture content values in this study were higher than those reported by Anvoh [6] and Werner *et al.* [7]. On the other hand, lipid, protein and ascorbic acid contents were higher in the samples of these authors than in this study but organic acids contents in this work were higher than values reported by Schwan; Ardhana and Fleet, [23-24] which were for citric acid, 2.1–2.4% (w/w), lactic acid, 0.03% (w/w) and acetic acid, 0.04% (w/w).

Moreover, vitamins such as ascorbic acid and cobalamin in juices of this study could give it strengthening property that consumers attribute to it.

Also, virtues of mucilage cocoa juice could be related to presence of phenolic compounds contents in the beans and the mucilage. Indeed, according to Lee *et al* [25], cocoa was very rich in polyphenols. Moreover, Bloch [26] pointed out that Ivorian cocoa was the third richest in phenolic compounds. Furthermore, Hanhineva, [27] reported that polyphenols were responsible of several properties.

Able to lower blood pressure in rats, prevent LDL (low density lipoprotein) oxidation, inhibit vascular smooth muscle cell proliferation, prevent platelet aggregation and stabilize immune cells.

They have been described as antioxidants, anti-platelet aggregation, anti-inflammatory, anti-allergenic, anti-thrombotic, neuroprotective, anti-viral, chemo-preventive and more evidence indicate that polyphenols influence lipid and carbohydrate metabolism [27].

Furthermore, fluctuations observed in phenolic compounds content and antioxidant activity, both assessed by DPPH and FRAP methods, could be due to cocoa variety, cultivation techniques or space. Niemenak *et al.* [28] claimed that polyphenol contents of cocoa during fermentation could increase by 25% for some varieties or decrease by 11-25% for other varieties. In this study, mucilage juices were obtained from several different varieties, hence the term "all types" in cocoa culture jargon. Also, these variations in phenolic compound levels and corresponding antioxidant activities could also be due to the cultivation techniques used, which vary from one region to another, and to environmental factors such as rainfall and temperature. Indeed, juices of this investigation were sampled from a part of the area called "the cocoa loop" which extends from the West to the East of Côte d'Ivoire through the Central region. In addition, the general analysis of mucilage cocoa juices from 5

sample areas during storage showed that juices could present both similar and different characteristics during storage.

Dietary fiber as a compound contributing to digestion and production of soft stools would be responsible for the laxative character mentioned by consumers. However, analyses revealed only trace amounts of fiber, so laxative properties could be due to other compounds such as polyphenols. The latter have been reported as digestion-enhancing compounds [29-30]. Therefore, laxative property of mucilage cocoa juice would be more due to phenolic compounds than to dietary fiber. This same observation has been done par Coulibaly *et al.* [31] where phenolic compounds contents were most important in traditional sorghum beer than dietary fiber contents.

Also, irregular contents of physicochemical, nutritional and functional parameters would be largely related to microorganisms' activities, particularly fermentation, naturally present in juice. Koffi *et al.* [22] reported involvement of yeasts and moulds, acetic and lactic bacteria, *Bacillus* in the fermentation process of cocoa beans in Côte d'Ivoire. Thus, fluctuations observed in organic acids and phenolic compounds could be due to these microorganisms. Yeasts produce alcohol by transforming the sugars present in juice, such as acetic bacteria and lactic bacteria, which mainly produce acetic acid and lactic acid respectively. Furthermore, Macheix *et al.* [32] reported that yeasts were able to use phenolic compounds for their growth.

5. Conclusion

The survey on current state of knowledge of mucilage cocoa juice revealed that this juice was largely known by people. For these latter, maximal time of storage at room temperature was 72 hours and he possessed laxative, strengthening and anti-diarrheal.

Physicochemical, biochemical and functional properties investigation of mucilage cocoa juice during storage at room temperature showed that irrespective of juice, variation of all parameters were irregulars. During storage at room temperature, juices exhibited differences and similarities. Also, juices have phenolic compounds contents and antioxidant activities important. For further investigation, storage parameters will be study for allow her consumption during long time.

Author Contributions: his work was carried out in collaboration between all authors. Authors FC and GAMB were responsible for study design and supervision of work. Authors WHC, and TMASM were responsible for laboratory work, data analysis and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data Availability Statement: Data is not publicly available, only available by requesting email to corresponding author.

Acknowledgments: Participants of survey for their valuable time and support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Lopez A.S. and Dimick P.S. Cocoa fermentation In: Biotechnology (Reed, G. and Nagodawithana, T.W., Eds.), 2nd ed, Enzymes, Biomass, Food and Feed, Weinheim, Germany, 1995, 9, pp. 561–577.
- [2] ICCO: International cocoa organization. The world cocoa economy, current status, challenges and prospects. Annual report (2019).
- [3] Barel M. "Du cacao au chocolat, l'épopée d'une gourmandise." Quae. 2009.

- [4] Guirlanda C.P. da Silva G.G. Takahashi J.A. Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product? *Future Foods*, 2021 ;4,100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.
- [5] Carr J.G. Cocoa. In: Rose, A.H. (Ed.), *Fermented Foods: Economic Microbiology*, 1982; 7. Academic Press, London, pp. 275–292.
- [6] Anvoh K.Y.B. Caractérisation physico-chimique et microbiologique du jus de mucilage de la fève fraîche de cacao (*Theobroma cacao* L.) et sa transformation en produits dérivés : alcool, jus stabilisé, marmelade, pâte à tartiner, vinaigre. Thèse Unique, Abidjan, 27/10/2012.
- [7] Werner B. Aliments et brevages aromatisés à partir du cacao. Gate Information Service, gtz, 2000; pp. 18.
- [8] Cocolin L. Visintin S. Alessandria V. Valente A. Dolci P. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa beans fermentation in West Africa. *International journal of food microbiology*, 2016; 216, 69–78.
- [9] Duarte FW. Dias D.R.Oliveira J.M. José A.Teixeira J.A. Silva J.B.A. Schwan R.F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. *LWT - Food Science and Technology*, 2010; 43, 1564–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.010>
- [10] Israel D.G. Determining Sample Size. University of Florida. Fact Sheet PEOD-6, 5. Johnston, R.W., Tompkin, R.B., 1992. Meat and poultry products. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington DC, 1992; pp. 821–835.
- [11] Bartlett E.J.I. Kotlik W.J. Higgins C.C. Organizational research: determining appropriate sample size in survey research. *Inf. Technol. Learn. Perform. J.* 2001; 19, 43–50.
- [12] INS (Institut National de la Statistique) Recensement général de la population et des habitations, données socio-démographiques des localités. Région des Lagunes. République de Côte d'Ivoire. 1998; Tome I 83.
- [13] AOAC., Official methods of analysis. AOAC Ed., Washington DC, 1990; pp 684.
- [14] Wolf, Manuel analyses des corps gras, 1968. Azoulay Ed., Paris, France, p. 519.
- [15] Singleton V. Orthofer R. Lamuela-Raventó's R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In L. Packer (Ed.). *Oxidants and antioxidants, part A, methods in enzymology*, 1999; 299, pp. 152–178. New York: Academic Press
- [16] Meda A. Lamien C.E. Romito M. Millogo J. Nacoulma O.G. Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honeys as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 2005; 91, 571–577.
- [17] Ribereau-Gayon P. and Stonestreet E. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Anal*, 1966; 48, 188–196.
- [18] Alves C.Q. David J.M. David J.P. Bahia M.V. Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quím. Nova* 2010; 33, 2202– 2210. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>.
- [19] Brand-Williams W. Cuvelier M.E. Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995; 28, 25– 30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [20] Liuk L. Sun Y. Laura T. Liang X. Ye H. Zeng X. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kud-lingcha made from Ilex kudingcha C.J. Tseng. *Food chem.* 2009;112, 35– 41.
- [21] Barel M. De la cabosse à la tablette; Éditions Quae, 2013.
- [22] Koffi B.L. Ouattara G.H. Karou T.G. Guehi S.T. Nemlin J.G. Diopoh J.K. Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *Agronomie Africaine*, 2013; 25(2), 159–170.
- [23] Schwan R.F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64, 1477–1483.
- [24] Ardhana M.M. and Fleet G.H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 2003; 2732, 1–13.
- [25] Lee K.W. Kim Y.J. Lee H.J. Lee C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem*, 2003; 51, 7292–7295.
- [26] Bloch S.A. Les polyphénols du cacao. 2014.
- [27] Hanhineva K. Törrönen R. Bondia-Pons I. Pekkinen J. Kolehmainen M. Mykkänen H. Poutanen H. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci*, 2010; 11, 1365–1402.
- [28] Niemenak N. Rohsius B. Elwers S. Ndoumou D.O. Liebere R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of food composition and analysis*, 2004; 19, 612–619.
- [29] Gary W. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013; 57, 48– 57. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200511>.
- [30] Tarko T. Duda-Chodak A. Zając N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 2013; 64, 79–84.
- [31] Coulibaly W. H. Bouatenin K. M. J-P. Cot M. Kouamé K. A. Tra Bi Y.C. Koky N. M.C. Djameh C. Djè K.M. Influence of yeasts on bioactive compounds content of traditional sorghum beer (tchapalo) produced in Côte d'Ivoire. *Current research in food science*, 2020; 3, 195–200.

- [32] Macheix J.J. Fleuriet A. Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, 2005; p. 185

PUBLICATIONS

Publication 3

Clarification treatments of pineapple (*Malus domestica*) and orange (*Citrus sinensis*) juices by pectinase from *Yarrowia lipolytica* strains identified from cocoa juice in fermentation. *Journal of Biochemistry International*, 2022, 9 (4): 82-93. “Extrait de la these”.



CLARIFICATION TREATMENTS OF PINEAPPLE (*Ananas comosus*) AND ORANGE (*Citrus sinensis*) JUICES BY PECTINASE FROM *Yarrowia lipolytica* STRAINS IDENTIFIED FROM COCOA JUICE IN FERMENTATION

FATOUMATA CAMARA ^{a*}, TANO MARIE-ANGE SAKIA MIAN ^{a,b*},
WAHAUWUELE HERMANN COULIBALY ^c, ALANE ROMARIC N'GUESSAN ^c
AND GRAH AVIT MAXWELL BEUGRÉ ^b

^a Laboratoire de Nutrition et Sécurité Alimentaire, Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments (UFR-STA), Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

^b Laboratoire d'Agro-Valorisation, Unité de Formation et de Recherche d'Agroforesterie, l'Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa, BP-150, Côte d'Ivoire.

^c Laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie des Aliments, Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments (UFR-STA), Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.56557/JOBI/2022/v9i47917

Received: 20 August 2022

Accepted: 28 October 2022

Published: 01 November 2022

Original Research Article

ABSTRACT

Background: Pectinases are a group of enzymes that break down pectin, a polysaccharide that is found in plant cell walls. Today, the application of pectinolytic enzymes plays an important role in food technology for the maceration of fruits and vegetables, including for the extraction and clarification of juice.

Aim of the Study: This study aimed to test the clarifying ability of pectinase of three *Yarrowia lipolytica* strains (Tias J0-6; YA J3-1; Buy J2-1) identified for cocoa juice in fermentation.

Materials and Methods: The pectinase from *Yarrowia lipolytica* strains (Tias J0-6; YA J3-1; Buy J2-1) were produced using a basic liquid medium and partially purified through ion exchange chromatography. The fruit juices were clarified by enzymatic treatments against a control (free enzymatic treatment juice) and physicochemical and phytochemical parameters and antioxidant activities of the clarified juices were determined.

Results: The results revealed that from three strains, Tias J0-6 strain produced pectinase which showed the best clarification activity on pineapple and orange juices. The juices clarified exhibited an increasing of clarity values and decreasing viscosity and pH values. Thus, pectinase of Tias J0-6 allowed increasing clarity to 41.81% and 7.27%, to decrease viscosity up to 14.03% and 6.55% respectively for pineapple juices and orange juices clarified. The pH values decreased from 4.036±00 to 4.031±00 and from 5.010±00 to 4.592±00

*Corresponding author: Email: marienagemian@yahoo.fr, cfabimay@yahoo.com;

respectively for orange and pineapple juices. The antioxidant activities of juices clarified were strongly correlated to total tannins and total flavonoids ($r = 0.717$, $r = 0.754$, $r = 0.855$).

Conclusion: Tias J0-6 strain seemed a suitable candidate to biotechnology applications such as fruit juices clarification.

Keywords: Pectinase; *Yarrowia lipolytica*; pineapple juice; orange juice; clarification; functional food.

1. INTRODUCTION

“Pectinases constitute a unique group of enzymes which catalyze the degradation of pectic polymers present in the middle lamella and primary cell walls of plants” [1]. “As an important renewable resource, pectin has great potential applications in the biomedical, food, agricultural, textile industry, plant tissue maceration, fruit juice clarification, waste water treatments and other industries” [2]. “The degradation of pectin is mainly facilitated by pectinases group of enzymes, including pectin methyl esterases (PME, E.C.3.1.1.11), pectin lyases (PL, E.C. 4.2.2.10), exopolysaccharuronase (exo-PG, E.C. 3.2.1.67), and endopolysaccharuronase (endo-PG, E.C. 3.2.2.15)” [3]. “Various microbes have been reported to produce pectinase, such as filamentous fungi including *Aspergillus* sp.” [4], *Aspergillus niger* MTCC 478 [5], *Aspergillus fumigatus* [6], bacteria including *Bacillus* sp. [7,8], *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* [9] and yeast including *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* [10], *Aureobasidium pullulans* [11], *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 52712) [12], *Saccharomyces cerevisiae* [13]. “In general, both submerged state fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF) have been successfully used in pectinases production from different microbial strains” [14-17].

“It is estimated that, nearly 20-40% of fruits produced in developing countries are lost due to spoilage, mishandling during transportation and inadequate cold storage facilities and processing techniques, hence the need for conversion into juice concentrate” [18]. “Fruit juices are naturally cloudy, yet in different degrees, especially due to presence of polysaccharides (pectin, cellulose, hemicelluloses, lignin and starch), proteins, tannins and metals” [19]. “As the juice clear appearance is a determinant factor for consumers, the fruit juice industry has been investing in methods that optimize this feature” [20]. “The high concentration of pectin leads to colloid formation, which constitutes one of the main problems during the processing of clear fruit juices. However, although the suspended pulp particles can be removed through filtration, the presence of pectin may make this method difficult” [21]. “The depectinisation of fruit juices through the use of pectinases has been presented as an efficient alternative to reduce turbidity, in many studies” [8-19-22,23]. “Pectinases degrade pectin hence resulting in

viscosity reduction and cluster formation, which facilitates separation through centrifugation or filtration. As a result, the juice presents higher clarity, as well as more concentrated flavour, color, higher yield and quality” [24-27].

The current research aims to evaluate pectinase activity from *Yarrowia lipolytica* strains from fermented cocoa juice and to investigate its ability for pineapple and orange juice clarity as well as to determine phenolic compounds and antioxidant activities.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganisms for the Production of the Enzymatic Extracts

“Three *Yarrowia lipolytica* strains (Tias J0-6; YA J3-1 and Buy J2-1) belonged to the culture collection of the Food Technology Department (University Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d’Ivoire). They were isolated and identified from the cocoa juice in fermentation by Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length polymorphism (PCR- RFLP) of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region and sequencing of D1/D2 domains of the 16S rRNA gene” [28]. Partial 16S rRNA sequences of the strains were deposited in the NCBI database with accession numbers of ON202632, ON202635, ON202630 for strains Tias J0-6; YA J3-1 and Buy J2-1 respectively. They were used for the production of enzymatic extracts by using a basic liquid medium was used for the production of pectinase with composition (g/L) as follow; 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Scharlau, Spain), 4.5 g KH_2PO_4 (Scharlau, Spain), 1 g yeast extract (Laboratoire Humeau, France), 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany), 0.25 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Germany), 10 g pectin citrus (Sigma Aldrich, Germany) and 10 g agar (Oxford, UK). All these ingredients were dissolved in sterile distilled water and adjusted to pH 5.5, and 6 respectively for YA J3-1, Tias J0-6 and Buy J2-1 and media were sterilized in autoclave at 121 °C under pressure of 1 atmosphere for 17 min.

2.2 Experimental Conditions

“Erlenmeyer flasks (500 mL) with 100 mL of pectin liquid medium were used to obtain the enzymatic

extracts by culture process. Three flasks were inoculated with a suspension of YA J3-1, Tias J0-6 and Buy J2-1 respectively. Each flask was inoculated with each strain suspension diluted to reach an $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.3. The flasks were incubated at 40; 30 and 30 °C respectively for Tias J0-6, YA J3-1 and Buy J2-1 strains for 12 h. These conditions corresponding to optimal production conditions of pectinase of these strains described” by Mian et al. (2021) [28]. The biomass was separated by centrifugation at 8.000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant constitutes the enzymatic extract crude. The crude extract enzyme preparation was used firstly to evaluate pectinase activity and then to perform the partial purification.

2.3 Partially Purified Pectinase Production Ion by Ion Exchange Chromatography

Anion exchanger, DEAE-Sepharose, was packed into a glass column (2.6 *6 cm). The column was equilibrated with sodium acetate buffer (0.05M, pH 5.5) and a 3.0 mL sample was loaded on to it. The column was washed with sodium acetate buffer containing 400 mM NaCl concentration. Fractions of 3 mL volume were collected. The fractions showing pectinase activity were pooled, concentrated and used to evaluate the pectinase enzyme activity.

2.4 Enzyme Assay

The pectinase activity was measured according to Miller [29]. The assay mixture contained 100 µL of extract, 100 µL of 1% pectin prepared in sodium acetate buffer (0.05 M; pH 5). After incubation at 40 °C for 30 min, the reaction was stopped by addition of 400 µL of dinitrosalicylic acid (DNSA) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The mixture was kept in boiling water bath for 10 minutes until the yellow colour developed. Then the tubes were cooled and 4.4 mL of distilled water was added to the mixture. Absorbance change (OD) was measured spectrophotometrically at 540 nm. The amount of reducing sugar released was quantified using galacturonic acid as standard. The pectinase activity was expressed as international Unit (U) per ml of reaction medium. One unit of enzyme activity (µmol) was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of galacturonic acid under the assay conditions. The results were expressed as mean ± standard error of mean.

2.5 Clarification of Pineapple and Orange Juices using Pectinase

Two kilograms of each fruit (pineapple and orange) were washed thoroughly with running water, dried,

cut in pieces. Sweet orange and pineapple juice were extracted manually using a fruits squeezer. Pineapple juice and orange juice were then filtered using a filter cloth to separate the pulp. The pineapple juice and orange juice were then transferred into a bottle and incubated in water bath at 85 °C for 5 min [30]. The pineapple (100 mL) and orange juice (100 mL) were stored in the bottle and different enzymatic treatments were given. Juice without treatment is kept as control. 100 mL of each juice were added with partially purified pectinase of each strain (200 µL). Pectinase- treated pineapple and orange juices were then incubated in water bath at 40, 30 and 30 °C for 2 h respectively for Tias J0-6, YA J3-1 and Buy J2-1 strains. To inactivate enzymatic reaction, the bottles were heated at 90 °C for 5 min.

The pH measurements were performed using a pH-meter (Hanna Instruments; HI 8010) after calibration with KCl buffer. Titratable acidity was determined through titration with 0.1 N NaOH. The titratable acidity was expressed as % meq of lactic acid. Density of each juice was determined by using of densimeter (Mettler Toledo). The clarity, color and browning of the juices obtained were determined by measuring the absorbance at a wavelength of 660 nm, 440 nm and 420 nm using spectrophotometer (Rayleigh; USA) and distilled water was used as the reference. The viscosity was measured by a viscometer (Techno Fischer) and distilled water was used a reference. Time required to flow through the capillary section of the viscometer was noted using a stop watch for the reference. All the experiments were carried out in triplicate.

2.6 Phytochemical Analysis of Fruits Juices

2.6.1 Total phenols

“Total phenols contents were estimated according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method” [31]. To 50 µL aliquote of juice after centrifugation were added 250 µL of diluted Folin-Ciocalteu-reagent (10% v/v). After 1 min, 750 µL of 20% (w/v) aqueous Na_2CO_3 were added, and the volume was adjusted to 5.0 mL with H_2O . The controls contained all the reaction reagents except the sample. After 2 h of incubation at 25 °C, the absorbance was measured at 760 nm and compared to both a gallic acid calibration curve and to controls. Total phenols were determined as gallic acid equivalents per mL (µg GAE/mL), and the values are presented as means of triplicate analyses.

2.6.2 Total tannins

“The quantitation of easily extractable tannins was carried out using the Bate-Smith reaction, during

which uncolored proanthocyanidines are converted into colored anthocyanins (quantitated based on their absorbance at 550 nm) through heating at 100 °C in acidic medium” [32]. In two test tubes, 2 mL of aliquot, 1 mL of distilled water and 3 mL of 12 N hydrochloric acid were added. One of the two tubes, hermetically closed, was placed in water bath at 100 °C for 30 minutes, and then was cooled for 10 min in ice. Finally, 0.5 mL of ethanol was added to both tubes. The concentration of tannins, which is proportional to the concentration of anthocyanins, was calculated in g/L using the following equation (1):

$$\text{Tannins} = 19.33 \times \Delta \text{OD} \quad (1)$$

Where ΔOD is the variation in optical density between the two tubes.

2.6.3 Total flavonoid contents

Total flavonoid contents were determined as reported by Meda et al. [33] using the AlCl_3 colorimetric method. Briefly, 0.5 mL of aliquot was mixed with the same volumes of distilled water, aluminum trichloride (AlCl_3) 10% (w/v) (Labosi, Paris, France), sodium acetate (1M) and 2 mL of water. After 30 min of incubation at room temperature, absorbance at 415 nm was assessed (UV spectrophotometer Rayleigh; USA). Total flavonoid contents were estimated from means of three replicates against a 0–300 $\mu\text{g/mL}$ quercetin calibration curve (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) and expressed as μg of quercetin equivalents (QE)/mL.

2.6.4 Total anthocyanins

Anthocyanins (At) are found in two forms: free anthocyanins (Af), which are susceptible to discoloration by SO_2 , and anthocyanins combined with tannins (Ac), which are not [34]. Initially, a solution was prepared by adding: 1 mL of aliquot, 1 mL of ethanol (95%) acidified with 0.1% hydrochloric acid (HCl) and 20 mL to 2% hydrochloric acid (35%). In a first test tube, 5 mL of the above solution was added to 2 mL of distilled water. In a second test tube, 5 mL of the above solution was added to 2 mL of sodium bisulfite (15%). After incubation for 20 min at room temperature, the absorbance at 520 nm was measured for an optical path of 10 mm. The concentration was calculated in mg/L by the following relation equation (2):

$$\text{Anthocyanins} = 875 \times \Delta \text{OD} \quad (2)$$

Where ΔOD is the variation of optical density between the first tube and the second tube

2.7 Antioxidant Activities

2.7.1 Antiradical activity: DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) assay

“Among commonly used methods for the investigation of the antioxidant capacity of natural products, the DPPH assay was selected for its ease of use and accuracy” [35]. The antioxidant activity of juice samples was assessed Brand-Williams et al. [36], “by evaluating their respective free radicals scavenging abilities in the presence of an alcoholic solution of DPPH, yielding the free radical form DPPH° . The samples were reacted with the stable DPPH radical in a methanol solution. The reaction mixture consisted of adding 2 mL of sample, 2 mL of DPPH radical solution 100 mM in methanol. When DPPH reacts with an antioxidant compound, which can donate hydrogen, it is reduced. The changes in color (from deep violet to light yellow) were read [Absorbance (Abs)] at 517 nm after 30 min of reaction using a UV spectrophotometer (Rayleigh; USA). The rate of scavenging activity (AA%) was calculated as follows using equation” (3):

$$(\%) \text{AA} = [(X - Y)/X] \times 100. \quad (3)$$

Where X is the absorbance at 517 nm of oxidized DPPH in pure form and Y is the absorbance of the sample after 30 min incubation with DPPH

2.7.2 Ferric reducing-antioxidant power FRAP (potassium ferricyanide-ferric chloride) assay

“The ferric ion (Fe^{3+}) -reducing capacity of juice samples was investigated by using the potassium ferricyanide-ferric chloride method” [37]. Briefly, 0.5 mL of each sample, 0.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), and 0.5 mL of potassium ferricyanide $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%) were mixed and incubated at 50 °C for 20 min. The reaction was stopped by adding 0.5 mL trichloroacetic acid (10% (w/v)). Finally, 0.5 mL of previous mixture was mixed with 0.8 mL of distilled water and 0.1 mL of FeCl_3 (0.1%) and absorbance was measured at 700 nm. The reducing power of each sample was expressed as μg of ascorbic acid equivalents (AAE) per mL.

2.8 Statistical Analysis

The statistical tests were performed through variance analysis (ANOVA) and Tukey’s test, with probability level below 5% ($P < 0.05$) using software XLStat version 2016.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Enzymatic Activity Assays of Extract Crude and Extract Purified

The enzymatic activities from extracts crude and extracts purified of strains were showed in Fig. 1. For all strains, enzyme activity after purification procedure showed the highest value. The pectinolytic activities from extracts crude were 0.138 ± 0.007 ; 0.177 ± 0.001 and 0.235 ± 0.01 U/mL while those from extracts partially purified were 0.183 ± 0.001 ; 0.209 ± 0.003 and 0.392 ± 0.005 U/mL respectively for YA J3-1, Tias J0-6 and BuyJ2-1 strains. This observation had been reported by Utami et al. [38] where the amylase activity of yeast strain was highest after ammonium sulfate precipitation and dialysis steps. Whether the strains and extracts, the highest pectinase activity was obtained with BuyJ2-1 strain and the lowest activity with YA J3-1. More the statistical analysis showed the significant difference between strains ($P < 0.05$).

3.2 Application of Purified Pectinase in Fruit Juices Clarification

“In general, microbial pectinases are important group of enzymes with potential applications in various industries like wine industry, paper industry, textile industry and food industry” [39]. “Use microbial pectinases presented several advantages mainly low-cost production, enzyme content is more predictable and controllable, availability of raw materials for production, and high production without ethical approval, rate filtration reduced, provide a wide range of products to consumers” [19].

Application of purified pectinase in clarification of fruit juices was studied on pineapple juice (pH 5.01 ± 0.014) and orange juice (pH 4.036 ± 0.001) produced at laboratory. Thus, the pineapple juice and orange juice clarification trials from our enzymatic extracts partially purified allowed to assess most relevant indicators of clarified juices mainly clarity, viscosity and pH [8-38-40-42].

As it can be seen in Tables 1 and 2, the difference result of pH, viscosity, and clarity between pineapple juice and orange juice without enzyme additions and pineapple juice and orange juice with enzymes treatment was observed. Whether the juice and pectinase of strains, the values pH of clarified juices decreased than those of control. These values were ranged between 3.962 ± 0.00 and 4.031 ± 0.00 for juices treated against 4.036 ± 0.00 for orange juice control. The pH decreased was most important with Buy J2-1

strain. In addition, the significant difference was observed between pectinase treatments ($P < 0.05$).

The same observation was obtained with pineapple juice. The pH of pineapple juices treated decreased (4.584 ± 0.00 ; 4.495 ± 0.00 ; 4.592 ± 0.00) than pineapple juice un-treated (5.01 ± 0.00). The lowest pH value of juices treated was obtained with YA J3-1 strain. The analysis pineapple juice with Tias J0-6; YA J3-1 and Buy J2-1 pectinase treatment have significantly different to the control ($P < 0.05$). The addition of pectinase in pineapple juice and orange juice decreased the pH value. According to Acar et al. [30] treated “juices became more acidic, indicating that the enzyme able to hydrolyze the pectin polymer in solution into its monomer form named galacturonic acid. The pectinase of Buy J2-1 and YA J3-1 strains resulted the lowest pH values of 3.962 ± 0.00 and 4.495 ± 0.00 respectively in orange juice and pineapple juice”. According to Acar et al. [30], “the decrease in pH was due to the increasing amount of galacturonic acid content which was the result of pectin hydrolysis by pectinase which was causing pineapple juice and orange juice more acidic. In both cases, the pH decreasing was correlated with increasing acidity. Several pectinases in particular polygalacturonases from *Aspergillus carbonarius* and *Achaetomium sp. Xz8* have been reported to have the capacities to improve the juice yield and clarity” [43] and reduce the viscosity of papaya juice [44]. “Polygalacturonase produced by *A. niger* using banana peel as a substrate has been used for clarification of banana juice” [45]. “Use of polygalacturonases from *Neosartorya fisheri* in clarification of apple and strawberry juice have also been reported” [46].

The viscosity of pectinase-treated orange juice samples ranged from 0.147 ± 0.001 to 0.169 ± 0.001 cP respectively for Tias J0-6, YA J3-1 and Buy J2-1 strains which lower than control sample (0.171 ± 0.002 cP). The lowest viscosity was observed with Tias J0-6 (0.147 ± 0.001 cP). There was a significant difference between viscosity values from samples, then between samples and control. For pineapple juice, the viscosity of juices treated decreased than control, pineapple juice un-treated. The viscosity values of treated pineapple juices were 0.295 ± 0.00 , 0.297 ± 0.00 and 0.285 ± 0.01 cP respectively for Tias J0-6, YA J3-1 and Buy J2-1 strains against 0.305 ± 0.007 cP for the control. There is none significant difference between juice samples pectinase treatment and control although the samples viscosity was lowest than control. Based on these results, among the *Yarrowia lipolytica* strains tested, Tias J0-6 and YA J3-1 were able to decrease the viscosity by 14.03% and 6.55% for orange juice and pineapple juice respectively. The pectinase efficacy could depend of juice nature and

microorganisms. Indeed, Meryandini et al. [8] reported that “pectinase of *Bacillus* sp decrease the viscosity of apple juice by 6.99% which is higher amounts of enzyme may be effectively reduce the viscosity of the juice”. Dey et al. [47] reported that “the results of apple juice clarification using purification polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 was able to decrease viscosity to 38%”. Arsad et al. [48] reported that “the viscosity value of juice can decrease significantly by combining pectinase and other enzyme types, such as cellulose”.

The clarity values of pineapple juice and orange juice treated by pectinase enzyme from our isolates were given in Table 2. For all juices treated, the clarity was characterized an increasing of clarity values than control (juices untreated). The clarity values of orange juices treated were ranged between 28.4 ± 00 and $29.2\pm 00\%$ which lower than control (27.5%). The highest value was obtained with Tias J0-6 strain ($29.2\pm 00\%$). In pineapple juices treated, the clarity values were comprised between 3.55 ± 0.07 and 3.90 ± 0.14 %. These values were highest than control ($2.75\pm 00\%$). Such as orange juice, the highest clarity value was observed with Tias J0-6 strain ($3.90\pm 0.14\%$). For both juices, pectinase treatments have significantly different to the control although there was no significant change in others treatments. The increasing of clarity values of juices treated indicated pectinase of our isolates addition in orange and pineapple juices showed clarification ability. Tias J0-6 strain increased clarity of orange juice and pineapple juice by 7.27 and 41.81% respectively with

respect to controls. Several studies reported involvement pectinase microbial in increasing of fruit juices clarity. Pectinase of *Bacillus* sp can increase clarity of apple juice by 42.6% [8]. Also, Alvarez et al. [49] reported that “during the incubation in apple juice treatment, the pectinase (In this experiment used Pectinex 3XL, activity 3000 FDU¹/mL) break down the pectin polymer in solution which ultimately increased the formation of pectin and protein into clots, resulting in a clearer fruit juice supernatant. The potential of pectinase produced by bacterial was found in clarifying the others juice fruit such as lemon” [50] and mango [51]. In addition, pectinase of *Aspergillus niger* MTCC 478 increased by 27% orange juice clarity with respect to control [5]. “Transmittance of the treated juice increased because of removal of colloidal and suspended particles in the juice especially pectin. Colloid formation due to the presence of pectin is a major challenge in fruit juice industry, which decreases the commercial value of juices. Pectin present in fruit juices is degraded by pectinases resulting in viscosity reduction and cluster formation. As a result, the juice becomes clear and more concentrated in flavor and color” [26-27]. “Clarification of fruit juice can be attributed to biochemical nature of the enzyme. The application of pectinase in improving the quality of fruit juices is still relatively low compared to the commercial enzyme Novozym 33095” [52] which can increase clarity up to 80% and reduce viscosity up to 40%. On the hand other, the clarification of fruit juice in this study was corroborated by decreasing of color, browning and density of samples juices than controls (Tables 1 and 2).

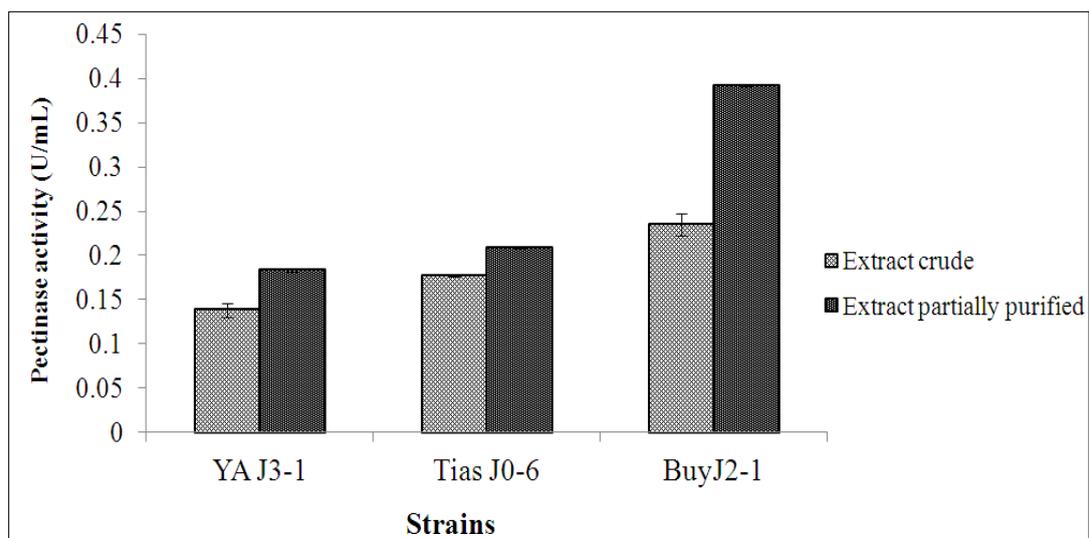


Fig. 1. Pectinase activities of strains

Table 1. Physicochemical characteristics of orange juices clarified

	Clarity (%)	Color (%)	Browning (%)	pH	Acidity (%)	Viscosity (cP)	Density
Control	27.5±00 ^a	11.9±00 ^a	9.9±00 ^a	4.036±00 ^a	1.030±0.014 ^a	0.171±0.002 ^a	1.008±0 ^a
Pectinase (Tias J0-6)	29.2±00 ^b	11.65±0.07 ^a	3.25±0.07 ^b	4.031±00 ^a	1.076±0.019 ^a	0.147±0.001 ^b	1.006±0 ^a
Pectinase (YA J3-1)	28.4±00 ^b	11.55±0.21 ^a	8.95±0.07 ^c	4.018±00 ^b	1.071±0.012 ^a	0.155±0.002 ^c	0.962±0 ^a
Pectinase (Buy J2-1)	28.8±00 ^b	11.25±0.35 ^a	6.7±0.14 ^d	3.962±00 ^c	1.080±00 ^a	0.169±0.001 ^a	0.997±0 ^a

Values are means ± standard deviation, n = 3. Means in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test (P < 0.05)

Table 2. Physicochemical characteristics of pineapple juices clarified

	Clarity (%)	Color (%)	Browning (%)	pH	Acidity (%)	Viscosity (cP)	Density
Control	2.75±00 ^a	0.8±00 ^a	0.6±00 ^a	5.010±00 ^a	0.250±0.02 ^b	0.305±0.007 ^a	1.008±00 ^a
Pectinase (Tias J0-6)	3.90±0.14 ^b	0.6±00 ^b	0.5±00 ^b	4.592±00 ^b	0.390±00 ^a	0.295±00 ^a	1.006±00 ^a
Pectinase (YA J3-1)	3.65±0.07 ^b	0.5±00 ^b	0.4±00 ^b	4.495±00 ^c	0.455±0.007 ^a	0.297±00 ^a	1.005±00 ^a
Pectinase (Buy J2-1)	3.55±0.07 ^b	0.5±00 ^b	0.4±00 ^b	4.584±00 ^b	0.355±0.04 ^{ab}	0.285±0.01 ^a	1.005±00 ^a

Values are means ± standard deviation, n = 3. Means in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test (P < 0.05)

Table 3. Phytochemical composition of fruits juices clarified

	Orange juices			Pineapple juices		
	Total phenols (µg/mL EGA)	Total flavonoids (µg/mL EQ)	Total tannins (g/L)	Total phenols (µg/mL EGA)	Total flavonoids (µg/mL EQ)	Total tannins (g/L)
Control	267.38±5.98 ^a	58.36±0.41 ^b	110.85±0.68 ^a	407.67±7.61 ^a	130.19±3.53 ^a	23.46±0.05 ^a
Pectinase (Tias J0-6)	297.96±8.42 ^a	59.23±0.53 ^b	172.71±1.49 ^b	381.22±13.59 ^a	124.90±5.3 ^a	31.93±0.04 ^b
Pectinase (YA J3-1)	316.23±55.47 ^a	66.49±0.33 ^a	171.45±0.27 ^b	398.84±4.78 ^a	127.3±1.08 ^a	34.39±0.007 ^c
Pectinase (Buy J2-1)	283.92±17.4 ^a	65.95±0.03 ^a	170.19±0.13 ^b	391.61±34.81 ^a	126.82±2.85 ^a	53.26±0.02 ^d

Values are means ± standard deviation, n = 3. Means in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test (P < 0.05)

Table 4. Antioxidant activities of fruit juices clarified

		DPPH (% Antiradical Activity)	FRAP ($\mu\text{g/mL}$ Ascorbic Acid)
	Control	35.31 \pm 0.24 ^a	186.45 \pm 2.4 ^a
	Pectinase (Tias J0-6)	42.39 \pm 0.82 ^b	113.345 \pm 0.06 ^b
Orange juices	Pectinase (YA J3-1)	31.4 \pm 0.12 ^c	211.16 \pm 7 ^c
	Pectinase (Buy J2-1)	32.82 \pm 1.01 ^{ac}	140.04 \pm 3.64 ^d
	Control	50.96 \pm 0.5 ^a	224.02 \pm 11.74 ^a
	Pectinase (Tias J0-6)	55.31 \pm 1.28 ^b	192.42 \pm 3.98 ^b
Pineapple juices	Pectinase (YA J3-1)	51.77 \pm 0.35 ^a	189.07 \pm 1.85 ^b
	Pectinase (Buy J2-1)	60.43 \pm 0.54 ^d	166.6 \pm 0.96 ^c

Values are means \pm standard deviation, n = 3. Means in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test (P < 0.05)

Table 5. Correlation between phytochemical composition of fruit juices clarified and antioxidant activities

		Total Phenols	Total Tannins	Total Flavonoids
	DPPH	-0.071	0.717*	-0.995*
Orange juices	FRAP	0.430	-0.216	0.754*
Pineapple juices	DPPH	-0.131	0.855*	-0.169
	FRAP	-0.118	-0.987*	-0.282

* The correlation is significant at the 0.05 level

3.3 Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Fruit Juices Clarified

Among the phenolic compounds assayed in fruit juices clarified in this study, the total tannins were found in highest amount than others. In orange juices, an increasing of total tannins was observed compared to the control. The total phenols contents were ranged between 170.19 ± 0.13 and 172.71 ± 1.49 g/L which highest than control 110.85 ± 0.68 g/L. In addition, there had significantly difference between samples juices and control. Such as orange juices, the total tannins were polyphenols which found in greatest content in pineapple juices clarified. Their amounts increased in samples juices than control. The total tannin contents were comprised between 31.93 ± 0.04 and 53.26 ± 0.02 g/L while control sample showed 23.46 ± 0.05 g/L (Table 3). The most total tannins concentration had been obtained in pineapple juice clarified by pectinase of Buy J2-1 strain. "More, statistical analysis showed a significant difference between pineapple juices treated and control. In Table 3, it was informed that orange juices and pineapple juices had the highest level of polyphenols in general. Polyphenol content in fruit juices clarified is an important variable to be controlled due to the antioxidant activity of these substances" [53], "which are associated to the prevention of certain pathologies as coronarian diseases and cancer" [54]. "On the other hand, polyphenols can form complexes with proteins that could result in the formation of haze [55] and present limited possibility of separation by centrifugation" [56]. Antioxidant activities of fruit juices clarified were assessed from two methods: DPPH and FRAP. The method DPPH showed that antiradical activity (DPPH) rates were highest in orange juice and pineapple juice clarified by pectinase of Tias (J0-6) $42.39 \pm 0.82\%$ and pectinase of Buy (J2-1) $60.43 \pm 0.54\%$ than controls ($35.31 \pm 0.24\%$ and $60.43 \pm 0.54\%$) respectively (Table 4). More, there had significantly difference between samples juices and controls. For the FRAP method, the antioxidant activity was most important in orange juice clarified by pectinase of YA J3-1 with 211.16 ± 7 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid while in pineapple juice clarified, the highest value (192.42 ± 3.98 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid) was obtained in juice clarified by pectinase of Tias (J0-6) although this value was less than control value (224.02 ± 11.74 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid) (Table 4). In addition, the statistical analysis showed a significantly difference between samples and controls. Thus, the pectinase could be influenced the phenolic compounds content of fruit juices clarified in particularly the tannins and therefore their antioxidant activities. Indeed, pectinase activities could weaken the pulp cells, thus releasing an inaccessible juice but mainly constituents related to the solid parts, such as

tannins. This could confirm the high content of total tannins found in our samples. Also, the pectinase improved to polyphenols extraction. Indeed Wojdyło et al. [57] showed that polyphenols content from marc treated with pectinase was higher than control (pomace untreated).

On the hand other, correlation matrix with coefficients presented in Table 5, was created to explore the possible relationships between phenolic compounds and antioxidant activities. The higher and positives correlations coefficients were found between total tannins and antiradical activity ($r = 0.717, P < 0.05$) and between total flavonoids and antioxidant activity assessed by FRAP method ($r = 0.754, P < 0.05$) regarding orange juices clarified. However, negative correlation coefficient ($r = -0.995, P < 0.05$) was found between total flavonoids and antiradical activity. In pineapple juices clarified, the antioxidant activities (antiradical activity and ferric reducing power) were strongly correlated only to total tannins. Positive correlation coefficient was observed between total tannins and antiradical activity ($r = 0.855, P < 0.05$) while a negative correlation coefficient had been obtained between total tannins and ferric reducing power ($r = -0.987, P < 0.05$).

4. CONCLUSION

The use of pectinase of three *Yarrowia lipolytica* strains Tias J0-6, YA J3-1 and Buy J2-1 from fermented cocoa juice in fruit juices clarification showed the ability of these isolates to clarify these juices. Among the three strains, Tias J0-6 exhibited most important ability in fruit juices clarification. Pectinase of Tias J0-6 allowed increasing clarity to 7.27 and 41.81%, to decrease viscosity up to 14.03% and 6.55% respectively for pineapple juices and orange juices clarified. Additionally, the juices clarified showed antioxidant properties important mostly because to total tannins and total flavonoids. All of these properties make the pectinase of Tias J0-6 strain a suitable candidate in application potential in the beverage industry. Other investigations will can to be performed on others fruit juices to tested the efficacy of pectinase of Tias J0-6. Also, the nutritional value and shelf life of the purified of fruit juices will can be determined.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Fogarty MV. and Kelly CT. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*. ed. Fogarty,

- M.W. pp. 131±182. London & New York: Elsevier Applied Science Publishers. ISBN 1-85166486-6 Gainvors, A. and Belarbi, A. 1995 Detection methods for polygalacturonase producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1983;10: 1311-1319.
2. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 2008; 11:266–277.
 3. Yadav PK, Singh VK, Yadav S, Yadav KDS, Yadav D. *In silico* analysis of pectin lyase and pectinase sequences. *Biochem (Moscow)*. 2009;74(9):1049–1055.
 4. Reddy PL, Sreeramulu A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district. *Int J of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2012;1(3):186-193.
 5. Yadav D, Yadav S, Anand G. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *Biotech*, 2017;7: 3-8.
 6. Okonji RE, Itakorode BO, Ovumedia JO, Adedeji OS. Purification and biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of decomposing plant materials. *J App Biol Biotech*. 2019;7: 1-8.
 7. Aaisha GA, Barate DL. Isolation and identification of pectinolytic bacteria from soil samples of Akola Region, India. *Int J of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015;5(1): 514-521.
 8. Meryandini A, Cocok AM, Fahrurrozi B. Pectinase production and clarification treatments of apple (*malus domestica*) juice. *Annales Bogorienses*. 2017;21: 63-68.
 9. Bouatenin KMJP, Djeni NT, Kouame KA, Coulibaly WH, Dje KM. Excretion of β -glucosidase and pectinase by microorganisms isolated from cassava traditional ferments used for attieke production in Côte d'Ivoire. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;20:101217.
 10. Djoulde RD, Etoa FX, Essia Ngang JJ, Mbofung CMF. Screening des microorganismes à potentialités fermentaires pour le manioc. *Tropicultura*. 2005;23:11-18.
 11. Merin MG, Martin MC, Rantsior K, Cocolin L, Morata de Ambrosini VI. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine bonarda grape. *Braz J Microbiol*. 2015;46:815-823.
 12. Dzugbefia VP, Ametefe GD, Kwatia CAS. Optimal conditions for pectinase production by *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 52712) in solid state fermentation and its efficacy in orange juice extraction. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2017;3:78-86.
 13. Poondla V, Bandikari R, Subramanyam R, Obulam VSR. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their characterization, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2015;4:70-76.
 14. Castilho LR, Medronho RA, Alves TLM. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*. 2000 ;71:45–50.
 15. Silva D, Martins ES, Silva R, Gomes E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial byproducts. *Br J Microbiol*. 2002;33:318–324.
 16. Pedrolli DB, Carmona EC. Pectin lyase from *Aspergillus giganteus*: comparative study of productivity of submerged fermentation on citrus pectin and orange waste. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2009;45:677–683.
 17. Dinu D, Nechifor MT, Stoian G, Costache M, Dinischiotu A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J Biotechnol*. 2007;131:128–137
 18. Singh C, Poonia GS, Toor GS. Distribution pattern of fruit processing industry in Punjab. *Indian Food Packer*. 1994; 8(1): 47.
 19. Vaillant F, Millan P, Brien GO, Dornier M, Decloux M, Reynes M. Crossow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*. 1999 ;42:215-224.
 20. Tribess TB, Tadini CC. Inactivation kinetics of pectin methyl esterase in orange juice as a function of pH and temperature-time process conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86:1328-1335.
 21. Sulaiman MZ, Sulaiman NM, Liew SY. Limiting permeate flux in the clarification of untreated starfruit juice by membrane ultrafiltration. *Chemical Engineering Journal*. 1998; 69:145-148.
 22. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of Pectinases in commercial sector: a review. *Biores Technol*. 2001;77:215–227.
 23. Landbo A-K, Meyer AS. Statistically designed two step response surface optimizations of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2007; 8:135-142.

24. Blanco P, Sierro C, Villa TG. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;175:1-9.
25. Mutlu M, Sarioglu K, Demir N, Ercan MT, Acar J. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of Food Engineering*. 1999;41:147-150.
26. Kaur G, Kumar S, Satyanarayana T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum Termophile*. *Bioresource Technology*. 2004;94:239-243.
27. Abdullah LAG, Sulaiman NM, Aroua MK, Noor, MMMJ. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*. 2007;81:65-71.
28. Mian TM-AS, Camara F, Coulibaly WH, Beugré GAM, N'Guessan AR, Djè KM. Identification of pectinase-producing yeast strains isolated from fermented mucilage of cocoa juice. *Current topics in biotechnology*. 2021;12:27-38.
29. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 1959; 31(3):426-428.
30. Acar J, Alper N, Esturk O. The production of cloudy apple nectar using total liquefaction enzymes. *Fruit Process*. 1999;8:314-317.
31. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Ravento's R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In L. Packer (Ed.). *Oxidants and antioxidants, part A, methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). 1999. New York: Academic Press
32. Ribereau-Gayon P, Stonestreet E. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal*. 1966; 48: 188-196.
33. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honeys as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 2005; 91: 571-577.
34. Ribereau-Gayon P, Stonestreet E. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim*. 1965 ; 9 : 2649-2652.
35. Alves CQ, David JM, David, JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*. 2010; 33: 2202-2210.
36. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss.Technol*. 1995; 28: 25-30.
37. Lim L, Sun Y, Laura T, Liang X, Ye H, Zeng X. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. *Food Chem*. 2009; 112: 35-41.
38. Utami R, Widowati E, Christy A. Screening and characterization of amylase enzyme in sweet orange (*Citrus sinensis*) juice clarification. *Nusantara bioscience*. 2016;8 (2):268-272.
39. Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R. Microbial pectinases : an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*. 2016;6(1) :47.
40. Rai P, Rai C, Majumdar GC, Dasgupta S, De S. Resistance in series model for ultrafiltration of mosambi (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice in a stirred continuous mode. *Journal of Membrane Science*. 2006 ;283:116-122.
41. Dedehou SCAE., Dossou J, Soumanou MM. Etude diagnostique des technologies de transformation de la pomme de cajou en jus au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2015;9(1):371-387.
42. Sharma HP, Sharma S, Vaishali Prasad K. Application of Non-thermal clarification in Fruit Juice processing - A Review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment*. 2015;1(1): 15- 21
43. Nakkeeran E, Umesh-Kumar S, Subramanian R. *Aspergillus carbonarius* polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. *Biores Technol*. 2011;102:3293-3297
44. Tu T, Luo H, Meng K, Cheng Y, Ma R, Shi P, Huang H, Bai Y, Wang Y, Zhang L, Yao B. Improvement in thermostability of an *Achaetomium* sp. Strain Xz8 endopolygalacturonase via the optimization of charge-charge interactions. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81(19): 6938-6944.
45. Barman S, Sit N, Badwaik LS, Deka SC. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *J Food Sci Technol*. 2015;52:3579-3589.
46. Pan X, Li K, Ma R, Shi P, Huang H, Yang P, Meng K, Yao B. Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. *Food Chem*. 2015;188:569-575.
47. Dey TB, Adak S, Bhattacharya P, Banerjee R. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and Its application in apple juice clarification. *Food Sci Technol*. 2014;59:591-595.

48. Arsad P, Sukor R, Wan IWZ, Mustapha NA, Meor AS. Effect of enzymatic treatment on physicochemical properties of sugar palm fruit juice. *Int J on Adv Science Engineering Information Technology*. 2015;5:308-312.
49. Alvarez S, Alvarez R, Riera FA, Coca J. Influence of depectinization on apple juice ultra-filtration colloidal and surface. *Physicochemical and Engineer Aspect*. 1998;138:337-382.
50. Wojdyło A, Oszmianski J, Kolniak J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry*. 2011;127:623–631.
51. Iriani ES, Said EG, Suryani AS. Pengaruh Konsentrasi Penambahan Pektinase dan Kondisi Inkubasi terhadap Rendemen dan Mutu Jus Mangga Kuini (*mangifera odorata* Griff). *J Pascapanen*. 2005;2(1):11-17.
52. Poletto P, Borsoi C, Zeni M, da Silveira MM. Downstream processing of pectinase produced by *Aspergillus niger* in solid state cultivation and its application to fruit juices clarification. *Food Sci Technol*. 2015;35(2):391-397.
53. Müller L, Gnoyke S, Popken AM, Böhma V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT- Food Science and Technology*. 2010;43:992- 999.
54. Halliwell B, Gutteridge JMC. In *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.). New York: 1999. Oxford University Press.
55. Siebert JK. Haze formation in beverages. *LWT- Food Science and Technology*. 2006; 39:987-994.
56. Pinelo M, Zeuner B, Meyer AS. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*. 2010;88:259-265.
57. Wojdyło A, Oszmianski J, Kolniak J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry*. 2011;127:623–631.

RESUME

Le processus de traitement des fèves de cacao génère plusieurs déchets tels que les cabosses et le jus de mucilage de cacao. Ce jus provient de la dégradation de la pectine enrobant les fèves par les levures dotées d'activités pectinolytiques. Aussi, au bout de quelques jours le jus de mucilage de cacao devient difficilement consommable quand bien même qu'il soit apprécié des populations à cause de sa concentration relativement élevée en éthanol. Ces deux phénomènes pourraient suggérer la présence de levures résistantes à l'éthanol et/ou productrices de pectinases. Malgré ces potentialités, le jus de mucilage de cacao est laissé à l'abandon dans les champs sous forme de déchet. Ainsi, cette étude a été réalisée dans le but de valoriser le jus de mucilage de cacao. Les approches méthodologiques adoptées ont porté sur 15 échantillons à raison de 3 échantillons par sites de prélèvement, ont concerné la réalisation d'une enquête afin d'évaluer l'état actuel des connaissances du jus de mucilage. Puis des analyses physico-chimiques, nutritionnelles et fonctionnelles des jus de mucilage de cacao au cours de la conservation à température ambiante, suivi du screening des isolats des levures résistantes à l'éthanol et/ou productrices de pectinases et à leur identification. Enfin des applications biotechnologiques à travers la production de bioéthanol par les espèces de levures résistantes à l'éthanol et à la clarification des jus de fruits par celles productrices de pectinases ont été effectuées. Il ressort donc de cette étude que le jus de mucilage peut être conservé durant 3 jours maximum selon les personnes interviewées. Aussi durant la conservation à température ambiante, les paramètres physico-chimiques, phytochimiques, nutritionnels et fonctionnels évoluaient de manière irrégulière. L'étude des propriétés biotechnologiques des souches de levures contenues dans le jus de mucilage de cacao a permis tout d'abord d'isoler des souches de levures des échantillons Akoupé, Yakassé-Attobrou et Tiassalé où la teneur en éthanol était respectivement de 9,83% ; 8,74% et 7,21% (v/v) puis celles productrices de pectinase à travers l'apparition d'halo blanc autour de la colonie. L'identification moléculaire a montré que les isolats des levures résistantes à l'éthanol appartenaient à 5 espèces : *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kudriavzevii* alors que celles productrices de pectinases appartenaient toutes à l'espèce *Yarrowia lipolytica*. Les applications biotechnologiques des souches de levures résistantes à l'éthanol ont montré que les espèces *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kudriavzevii* en monoculture et en culture mixte étaient capables de produire du bioéthanol dont le taux variait entre 7,01 et 7,38% (v/v). Par ailleurs, les pectinases partiellement purifiées produites par les souches *Yarrowia lipolytica* clarifiaient les jus d'orange et d'ananas qui étaient caractérisés par une augmentation de la clarté et une baisse de la couleur, du brunissement, de la viscosité et du pH. Ces données démontrent que le jus de mucilage de cacao possède d'importantes teneurs en composés phénoliques et en activités antioxydantes et pourrait contenir des micro-organismes dotés de propriétés biotechnologiques.

Mots-clés : Jus de mucilage de cacao, pectinase, bioéthanol, clarification, levures

ABSTRACT

The cocoa bean processing generates several wastes such as pods and cocoa mucilage juice. This juice comes from the degradation of the pectin coating the beans by yeasts with pectinolytic activities. Also, after a few days, cocoa mucilage juice becomes difficult to consume, even though it is appreciated by the population because of its relatively high concentration of ethanol. These two phenomena could suggest the presence of ethanol-resistant and/or pectinase-producing yeasts. Despite these potentialities, cocoa mucilage juice is left abandoned in the fields as waste. Thus, this study was carried out with the aim of valorizing the juice of mucilage of cocoa. The methodological approaches adopted concerned 15 samples at a rate of 3 samples per site of sampling, concerned the realization of a survey to evaluate the current state of the knowledge of the juice of mucilage. Then, physicochemical, nutritional, and functional analyses of cocoa mucilage juice during conservation at room temperature, followed by the screening of isolates of ethanol-resistant and/or pectinase-producing yeasts and their identification. Finally, biotechnological applications through the production of bioethanol by ethanol-resistant yeast species and the clarification of fruit juices by pectinase-producing yeasts were carried out. It appears from this study that the mucilage juice can be preserved for a maximum of 3 days according to the interviewees. Also, during the conservation at room temperature, the physicochemical, phytochemical, nutritional and functional properties evolved irregularly. The study of the biotechnological properties of the yeast strains contained in the cocoa mucilage juice allowed us to isolate yeast strains from the Akoupé, Yakassé-Attobrou and Tiassalé samples, where the ethanol content was 9.83%, 8.74% and 7.21% (v/v), respectively, and then those that produce pectinase through the appearance of white halo around the colony. Molecular identification showed that the ethanol-resistant yeast isolates belonged to five species: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii* and *Pichia kudriavzevii*, whereas the pectinase-producing isolates all belonged to the *Yarrowia lipolytica* species. Biotechnological applications of ethanol-resistant yeast strains showed that the species *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kudriavzevii* in monoculture and in mixed culture could produce bioethanol with a rate varying between 7.01 and 7.38% (v/v). In addition, partially purified pectinases produced by *Yarrowia lipolytica* strains clarified orange and pineapple juices which were characterized by increased clarity and decreased color, browning, viscosity, and pH. These results show that cocoa mucilage juice has high contents of phenolic compounds and antioxidant activities and may contain micro-organisms with biotechnology properties.

Keywords: Cocoa mucilage juice, pectinase, bioethanol, clarification, yeast