

# Optimisation De La Production De L' $\alpha$ -Amylase Par Les Microorganismes Isolés Des Ferments Traditionnels De Manioc Provenant De Trois Zones De Production De *L'attiéké* En Côte d'Ivoire

***Bouatenin Koffi Maïzan Jean-Paul***

***Djéni N'dédé Théodore***

***Kakou Abodjo Célah***

Département des sciences et technologies des aliments,  
Université de Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire

***Menan Eby Hervé***

Centre de Recherche et de diagnostic  
et des Maladies Opportunistes, Abidjan, Côte d'Ivoire

***DjeKoffi Marcellin***

Département des sciences et technologies des aliments,  
Université de Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire

doi: 10.19044/esj.2016.v12n9p259

URL:<http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v12n9p259>

---

## Abstract

This research work aimed at studying production kinetic of  $\alpha$ -amylase by microbial strains isolated from three traditional cassava ferments; with a view of their potential use as starter cultures. The study was carried out on 42 amyolytic strains comprising 15 lactic acid bacteria species, 9 yeast, 9 *Bacillus* sp. And 9 moulds. Amyolytic activities were assessed *in vitro* in a broth. Independently of strains and their origin, results showed three  $\alpha$ -amylase regulation kinetics. From the 3 species which constitutively secrete  $\alpha$ -amylase, only *Candida tropicalis* LVX8 excretes a large amount of  $\alpha$ -amylase ( $171.33 \pm 3$  EU/mL) in 24 hours. Among strains, which  $\alpha$ -amylase excretion is regulated by a repression, the optimal duration for each one of them varied from 4 to 24 hours. Thus, *Lactobacillus casei* LABZ4 secretes within 4 hours of culture,  $47.3 \pm 1.41$  EU/mL, whereas yeast (LVX1, LVZ19, LUY16 and LVZ1), moulds (MZ2, MZ1 and MY2) and Bacilli (BX5, BY4 and BZ15) strains excreted each during 12 to 20 hours  $\alpha$ -amylase amounts ranging from  $60 \pm 3.7$  and  $106 \pm 1.3$  EU/mL. For strains with amylase production modulated by inactivation, maximal amounts of enzymes were very low and reached after only 4 hours. However, for yeasts LVX14, LUY3 and LVZ18, inactivation was observed from 16 hours, with

activities higher than 100 EU/mL. Considering the diversity of production kinetics of  $\alpha$ -amylase, the use of these isolates for a controlled fermentation of cassava dough would be optimal in co-culture.

---

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, Enzyme activity, Production kinetics, Cassava traditional ferment, microbial strains

---

### Résumé

L'objectif de ce travail était d'étudier la cinétique de production de l' $\alpha$ -amylase par des souches microbiennes isolées de trois types de ferments traditionnels de manioc, en vue de leur utilisation comme cultures starters. L'étude a porté sur 42 souches amylolytiques comprenant 15 bactéries lactiques, 9 levures, 9 *Bacillus* sp. et 9 moisissures. L'activité amylolytique a été évaluée pendant 24 heures in vitro en milieu liquide. Indépendamment du microorganisme et de son origine, les résultats ont montré trois types de cinétiques de régulation de l' $\alpha$ -amylase. Des trois espèces qui sécrètent constitutivement l' $\alpha$  amylase, seule *Candida tropicalis* LVX8 excrète une quantité importante d' $\alpha$ -amylase de  $171,33 \pm 3$  UE/mL en 24 heures. Parmi les souches dont l'excrétion est régulée par un mécanisme de répression, la durée optimale pour chacune d'elles varie de 4 à 24 heures. Ainsi *Lactobacillus casei* LABZ4 sécrète en 4 heures  $47,3 \pm 1,41$  UE/mL, alors que les souches de levures (LVX1, LVZ19 et LVZ1), moisissures (MZ2, MZ1 et MY2) et *Bacillus* (BX5, BY4 et BZ15) ont chacune excrété pendant 12 à 20 heures des activités comprises entre  $60 \pm 3,7$  et  $106 \pm 1,3$  UE/mL. Pour les souches dont l' $\alpha$ -amylase sécrétée est modulée par inactivation, les quantités maximales conduisant à l'inactivation sont plus faibles notamment chez les bactéries lactiques, les *Bacilli* et moisissures testées et atteintes après seulement 4 heures. Par contre, chez les levures LVX14, LVY3 et LVZ18, l'inactivation est observée à partir de 16 heures avec des activités supérieures à 100 UE/mL. Compte tenu de la diversité de cinétiques de production de l' $\alpha$  amylase, l'utilisation de ces isolats pour des fermentations contrôlées de manioc ne serait optimale qu'en co-culture.

---

**Mots-clés:**  $\alpha$ -amylase, activité enzymatique, cinétiques de production, ferment traditionnel de manioc, souches microbiennes

### Introduction

*L'attiéké* est une semoule de manioc fermentée cuite à la vapeur d'eau, ayant une couleur blanchâtre et un goût légèrement acidulé (Kouadio et al., 1991, Akely et al., 2007). Jadis, consommé principalement dans la région sud de la Côte d'Ivoire, Il est maintenant connu et apprécié sur tout le territoire ivoirien et dans la sous-région ouest africaine. Aboua et al. (1990),

avaient estimé cette consommation *d'attiéké* entre 28000 et 34000 tonnes par an, équivalant à 40000 à 50000 tonnes de manioc frais, avec 100 tonnes *d'attiéké* frais produit quotidiennement pour la seule ville d'Abidjan par la filière artisanale (ONUFI, 1990). *L'attiéké* est alors passé du cadre familial à une production commerciale stimulé par une demande urbaine sans cesse croissante et la formation de petites coopératives de production, et occupant une place importante dans l'économie Ivoirienne (Diop, 1992). En Côte d'Ivoire, Cette production est pratiquée et particulièrement maîtrisée par les femmes des groupes ethniques Avikam, Ebrié, Alladjan et Adjoukrou. *L'attiéké* Adjoukrou et *l'attiéké* alladjan sont composés d'un mélange de grains moyens et de petits grains de tailles comprises entre 2 à 0,315 mm, d'odeur agréable et de pH compris entre 4 à 4,5 (Kouadio et al., 1991 ; Assanvo et al., 2000 ; Djéni, 2009). *L'attiéké* Adjoukrou contient environ 47,55% d'eau et celui d'origine Alladjan contient 47,83% d'eau (Djéni, 2009). Quant à *l'attiéké* Ebrié, il est composé d'un mélange de petits grains et de gros grains contenant environ 50% d'eau avec des grains détachables à texture collante (Djéni et al., 2011). En effet la production de *l'attiéké* traditionnelle est laborieuse et longue, comprenant une combinaison d'étapes parmi lesquelles l'épluchage, le broyage, la fermentation, le pressage, la granulation, le séchage et la cuisson à la vapeur. Cette production traditionnelle *d'attiéké* à l'aide de tubercules de manioc pré-fermentés, bouillis ou rous a ses inconvénients en ce qui concerne la productivité et les normes sanitaires car la production est caractérisée par une maîtrise empirique des productrices basées sur la tradition locale (Assanvo et al., 2000). C'est l'un des produits dont la production traditionnelle nécessite l'utilisation d'un inoculum de tubercules de manioc de 3 jours sur lequel une flore microbienne spontanée s'est développée. Ce ferment traditionnel constitue la principale source de microorganismes actifs de la fermentation de la pâte de manioc. Dans la mesure où l'inoculum pré-fermenté est spontanément colonisé par une variété de micro-organismes, le produit contient une flore microbienne inconnue et potentiellement dangereuse. A cet effet, il est essentiel de connaître le processus de fermentation afin de sélectionner une culture de levain avec des propriétés bien définies pour la production *d'attiéké*. Ces propriétés sont surtout la production des enzymes intervenant au cours de la fermentation du manioc. Parmi ces enzymes, on recense les protéases, les cellulases et les amylases qui sont d'une grande importance en biotechnologie (Scriban et al., 1999). Cependant, différents microorganismes ont été intensivement utilisés pour la biosynthèse des enzymes amylolytiques (Huq et al., 2002). Les amylases extracellulaires ont été trouvées chez les champignons et les bactéries (Ramashandran et al., 2004 et Ait-kaki, 2004). L'utilisation de ces microorganismes a apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier

agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (Abu et *al.*, 2005). L'utilisation des microorganismes fermentaires dans la production d'enzymes amylolytiques est de plus en plus sollicitée à cause de la facilité de leur culture et l'absence de risques pathogènes (Fossi et *al.*,2005). De plus, Les microorganismes amylolytiques contribuent à la production rapide et importante d'acides organiques et de composés volatiles nécessaires à la production d'arôme et de flaveur pour reconstituer chaque type *d'attiéké* (Djeni, 2009). Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour les microorganismes, aussi bien pour la croissance que pour la production d'enzymes. La production d'enzymes amylolytiques par les microorganismes fermentaires a été considérablement améliorée par l'addition de différentes sources de carbone comme l'amidon (Dubey et *al.*, 2000). L'amidon va affecter non seulement la croissance mais aussi l'apparition des amylases, mais également la vitesse avec laquelle les hydrates de carbone sont métabolisés (Prescott et *al.*, 1987). Dès lors, le présent travail a pour but de faire une étude cinétique de la production de l' $\alpha$ -amylase pour la détermination des conditions et facteurs optimaux de croissance des souches amylolytiques présélectionnées en vue de les utiliser ultérieurement pour le contrôle et l'optimisation du processus de fermentation du manioc ; ce qui permettrait de mettre en place des starters spécifiques à chaque type *d'attiéké* (Adjoukrou , Alladjan et Ebrié ) en Côte d'Ivoire. Pour réaliser ce travail, 42 souches ont été présélectionnées parmi 345 microorganismes isolés des ferments traditionnels de manioc Adjoukrou, Alladjan et Ebrié à travers leur propriétés technologiques (Bouatenin et *al.*, 2012) . Ces Souches présélectionnées ont également été identifiées à partir de leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et moléculaires (Djeni et *al.*, 2015).

## **Matériel**

Le matériel d'étude est constitué des 42 souches de bactéries lactiques, de *Bacillus* sp., de levures et moisissures productrices d' $\alpha$ -amylase, présélectionnées des différents des ferments traditionnels de manioc Adjoukrou , Alladjan et Ebrié(Bouatenin et *al.* 2012). Les identifications sont réalisées à partir des isolats fraîchement repiqués. Ainsi l'activité amylassique de ces microorganismes identifiés est évaluée au cours de la fermentation pendant 24 heures en milieu liquide.

## **Methodes**

### **Préparation des inocula et ensemencement des milieux de culture**

La préparation des inocula a été réalisée suivant la méthode décrite par Aka (2009). Des colonies pures de bactéries lactiques, de *Bacillus*, de levures et de moisissures ont été ensemencées individuellement dans 5 mL

de bouillons spécifiques (bouillon MRS pour les bactéries lactiques ; bouillon nutritif pour les *Bacillus*, et bouillon sabouraud pour levures et de moisissures). L'ensemble est incubé à 35 °C pendant 48 heures. Le dépôt obtenu dans la partie inférieure de chaque ballon a été récupéré par décantation, puis introduit dans des tubes à centrifuger préalablement stérilisés. Ces tubes sont ensuite centrifugés à 5000 tours/mn, pendant 5 minutes. Après centrifugation, le culot a été recueilli et la densité microbienne a été déterminée d'un densimat (bio Merieux, France) contre un blanc constitué de bouillon stérile non inoculé. La concentration des inocula obtenus varie entre 5 et 7 Mac Farland (McF). Les concentrations des inocula ont été converties à  $10^6$  UFC/mL pour effectuer les différentes analyses enzymatiques.

### **Dosage de l'activité amylasique**

Le dosage de l'activité  $\alpha$ -amylase est réalisé selon la méthode décrite par Vazquez *et al.* (2004). Pour la détection de l'activité  $\alpha$ -amylasique, les isolats sont cultivés sur un milieu liquide contenant 1% d'amidon, 1% d'extrait de viande, 1% de peptone et 0,3% NaCl. Le milieu est tamponné à pH 6,9. Des ballons de capacité de 500 ml renfermant 250 mL de milieu liquide chacun sont inoculés séparément en raison de  $10^6$  cellules /mL par chaque souche pure à étudier. Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation rotative ( $105 \text{ tours.mn}^{-1}$  ; 1 tour =  $2\pi$  rad) durant 24 heures pour les différents isolats (bactéries lactiques, *Bacilli*, levures et moisissures). Toutes les 4 heures, 10 mL du milieu de culture sont prélevés et centrifugés à 6000 tour/40min. Le surnageant obtenu est dialysé à une concentration appropriée à 4°C. Le dialysat constitue la préparation enzymatique brute. Le mélange réactionnel enzyme – substrat est composé de 100  $\mu\text{L}$  d'amidon (1%) dissous dans 125  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de sodium (0,2M) à pH 6,9. A ce mélange 75 $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique y sont ajoutés. Ce milieu réactionnel est incubé au bain-marie pendant 30 min à 37°C. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 300  $\mu\text{L}$  d'une solution de DNS. Le milieu est ensuite homogénéisé et chauffé au bain-marie bouillant pendant 5 min puis refroidi pendant 10 min à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 540 nm au spectrophotomètre contre un témoin (contenant tous les produits excepté l'extrait brut enzymatique) après ajout de 2 mL d'eau distillée. Une unité (U) de l'amylasea étédéfinie comme étant la quantité d'enzyme capable de libérer une micromole ( $\mu\text{mol}$ ) de glucose/min dans le milieu réactionnel dans les conditions sus-décrites.

### **Traitements statistiques**

L'analyse de variance à un facteur (ANOVA) et le test de Duncan ont été effectués avec le logiciel STATISTICA, 99<sup>ème</sup> Edition pour comparer les

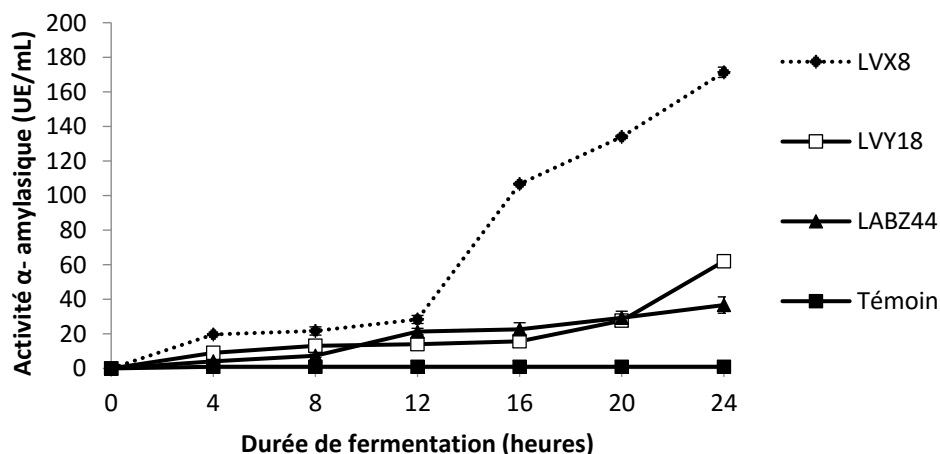
variables analysées sur les différents isolats sélectionnés. Les différences sont considérées comme significatives pour des valeurs de  $P < 0,05$ . Ce logiciel a permis également de calculer les moyennes et les écarts types des paramètres analysés. Cependant les calculs et les figures ont été effectués à l'aide d'EXCEL 2003 (XP - Microsoft Corp.)

## Résultats et Discussion

### Excrétion constitutive des $\alpha$ -amylases

Quarante deux (42) souches de microorganismes identifiées (bactéries lactiques, levures, moisissures et *Bacillus* sp.) ont été sélectionnées sur la base de leur capacité à hydrolyser l'amidon. Afin de déterminer les conditions de culture pour une production optimale de l'  $\alpha$  amylase responsables de l'hydrolyse de l'amidon, une étude cinétique d'excrétion a été réalisée. L'analyse de l'évolution des activités amylolytiques en fonction de la durée de culture a montré que la quantité des  $\alpha$  amylases excrétées augmente de façon continue pendant toute la durée des monocultures de trois (soit 7,14%) des microorganismes présélectionnés. Il s'agit de *Lactobacillus casei* LABZ44, *Candida tropicalis* LVX8 et *Candida krusei* LVY18. Ce type de cinétique traduit une excrétion constitutive de l'enzyme (Figure 1). Le temps d'adaptation ou d'induction nécessaire de *Candida tropicalis* LVX8 pour une excrétion active de l'enzyme est plus court (8 heures) que celui de *Candida krusei* LVY18 qui est de 16 heures. Ainsi, en 24 heures de monoculture, la quantité d' $\alpha$  amylase excrétée par *Candida tropicalis* LVX8 ( $171,33 \pm 3$  UE/mL) est trois fois plus élevée que celle de *Candida krusei* LVY18 et 5 fois plus que les  $36,66 \pm 4,7$  UE/mL excrétées par *Lactobacillus casei* LABZ44 (Figure 1).

Figure 1 : Excrétion constitutive d' $\alpha$  amylase : *Candida tropicalis* LVX8 ; *Candida krusei* LVY18 ; *Lactobacillus casei* LABZ44



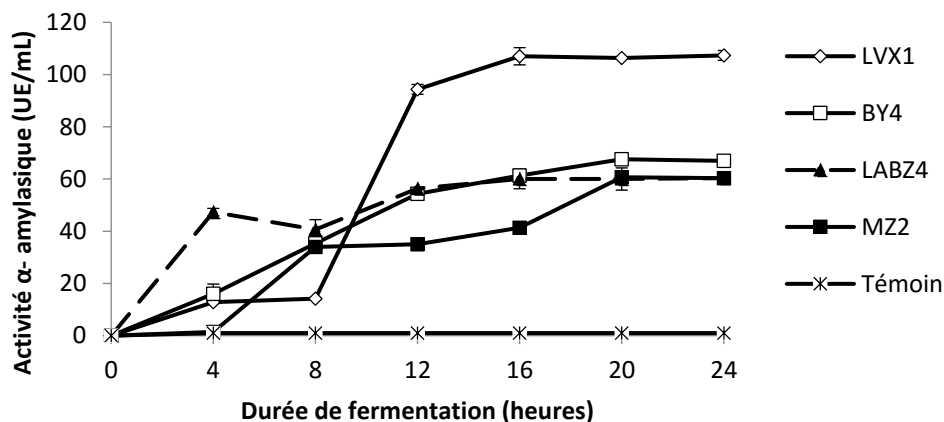
En effet l'activité  $\alpha$ -amylasique est très faible dans le milieu de culture de 25 souches. Les activités maximales obtenues pendant les 24 heures de monoculture vont de 0 UE/mL à  $50 \pm 4,7$  UE/mL. Par contre dans le milieu de culture de 17 souches, soit (40,47%), les activités maximales obtenues en 16 à 20 heures de monoculture varient de  $60 \pm 3,77$  UE/mL à  $171,33 \pm 3$  UE/mL. Cette faible proportion des microorganismes qui sécrètent activement l' $\alpha$  amylase est conforme aux données de la littérature. En effet, l' $\alpha$  amylase est une exoenzyme qui est chez la plus par des microorganismes, associée à la membrane cellulaire et n'est pas excrétée dans le milieu de culture (Mntsflil et Zalkin, 1979 ; Bause et *al.*, 1986, Dannawansa et *al.*, 2002). Les vieilles cellules peuvent libérer de faibles quantités d'enzyme membranaire. Les 25 souches sélectionnées qui hydrolysent l'amidon en culture sur gélose mais dont l'activité amylolytique du milieu de cultures n'est pas détectable ou est faible, seraient des souches dont l' $\alpha$  amylase est associée à la membrane plasmique. Parmi les 17 souches qui ont excrété plus de  $60 \pm 3,77$  UE/mL, une espèce (*Candida tropicalis* LVX8) sécrète constitutivement l' $\alpha$  amylase (figure 1). La souche de *Candida tropicalis* LVX8 qui produit l' $\alpha$  amylase de façon constitutive serait une souche portant une mutation au niveau du gène régulateur. Tamura (1983) a isolé à partir d'une souche sauvage, deux souches de *Bacilluslicheniformis* mutantes qui produisent constitutivement l' $\alpha$  amylase. Henkin et *al.* (1991) ont montré qu'une mutation par insertion d'un transposon supprime chez *Bacillus subtilis* la régulation catabolique par l'intermédiaire du glucose. Les cinétiques des 16 autres sont caractéristiques d'une régulation par répression catabolique.

### Régulation de l'excrétion des $\alpha$ amylases par répression

Le mécanisme de régulation d'excrétion d'exoenzymes par répression est caractérisée par une augmentation de l'activité enzymatique dans le milieu de culture jusqu'à une valeur maximale, au delà de laquelle l'augmentation est ralentie ou arrêtée. L'activité enzymatique demeure donc constante ou augmente faiblement lorsque la fermentation est prolongée au delà de la durée optimale. Les 16 souches dont la sécrétion de l' $\alpha$  amylase est régulée par répression catabolique se subdivisent en deux groupes. Le premier groupe, comprenant 11 souches, est caractérisé par une activité  $\alpha$ -amylasique maximale qui demeure constante lorsque la culture est prolongée au delà de la durée optimale. Un exemple de cinétiques obtenues avec *Lactobacillus casei* LABZ4, *Bacillus amyloliquefaciens* BY4, *Candida tropicalis* LVX1 et *Geotrichum* spMZ2 est présenté dans la figure 2. La durée des phases d'adaptations et les vitesses de sécrétion diffèrent d'une espèce à l'autre. L'induction est rapide chez *Lactobacillus casei* LABZ4. En effet cette souche sécrète en 4 heures de culture,  $47,3 \pm 1,41$  UE/mL correspondant à 78% de la quantité maximale produite pendant 16 heures de

fermentation. Chez *Geotrichum* sp MZ2 par contre, l'induction est lente et pendant 4 heures de culture aucune activité  $\alpha$ -amylasique n'a été détectable dans le milieu (Figure 2).

Figure 2 : Excrétion d' $\alpha$ -amylases régulée par répression (*Lactobacillus casei* LABZ4, *Bacillus amyloliquefaciens* BY4, *Candida tropicalis* LVX1.; *Geotrichum* sp MZ2)



Les durées de culture optimales et les quantités maximales d' $\alpha$  amylase excrétée par chacune de ces souches analysées, sont résumées dans le tableau 1. Alors que les souches de levures et moisissures ont chacune excrété pendant 12 à 20 heures de culture des quantités d' $\alpha$ -amylase comprises entre  $60 \pm 3,7$  UE/mL et  $106 \pm 1,3$  UE/mL, une seule souche de *Lactobacillus* sur 4 et 3 souches de moisissures sur 6 ont pu produire dans les mêmes conditions des quantités d'enzyme équivalentes à  $60 \pm 3,7$  UE/mL (Tableau 1).

Tableau 1 : Durée optimale de sécrétion d' $\alpha$  amylases régulée par répression

Code souche	Espèce	Durée optimale de culture (heure)	Activité maximale (UE/mL)
LABX11	<i>Leuconostoc mes.spp mesenteroide/dextranicum</i>	12	$30,33 \pm 4,24$
LABZ7	<i>Leuconostoc.mes.spp mesenteroide/dextranicum</i>	8	$22,4 \pm 0,3$
LABZ4	<i>Lactobacillus casei</i>	16	$60 \pm 3,77$
LABY38	<i>Lactobacillus fermentum</i>	24	$28 \pm 2,8$
BX5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12	$60,33 \pm 0,47$
BZ5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24	$22,66 \pm 3,8$
BY9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24	$42 \pm 3,3$
BY11	<i>Bacillus cereus</i>	4	$27 \pm 0,47$
BY4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	20	$67,66 \pm 1,27$
BZ15	<i>Bacillus subtilis</i>	16	$62 \pm 4,7$
LVX1	<i>Candida tropicalis</i>	16	$106 \pm 3,3$
LVZ19	<i>Candida krusei</i>	16	$69,3 \pm 3$
LVY16	<i>Candida krusei</i>	12	$67 \pm 4,24$
LVZ1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	$82,33 \pm 0,94$
MZ2	<i>Geotrichum</i> sp	16	$103 \pm 1,88$
MZ1	<i>Absida</i> sp	20	$60,6 \pm 0,9$
MY2	<i>Apergillus oryzae</i>	20	$60,66 \pm 0,47$

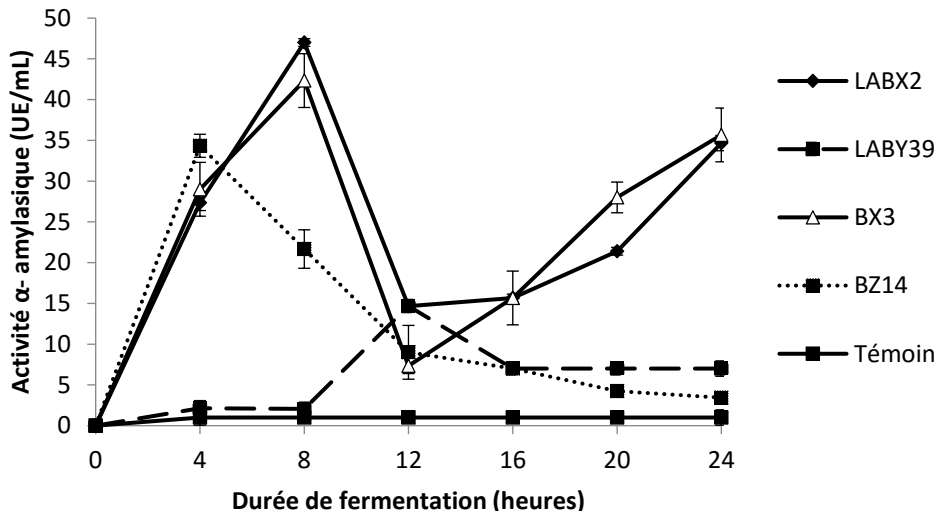


Chez les levures comme chez les bactéries, la transcription de l' $\alpha$ -amylase est induite indirectement par des polysaccharides comme l'amidon et le système de synthèse - sécrétion est régulé par le glucose et les disaccharides comme le maltose ou le tréhalose. Le maltose et le glucose sont les produits d'hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$  amylase. Le maltose est un inducteur catabolique et le glucose est le catabolique intermédiaire du répresseur (Yamana 1980, Henkin et *al.*, 1991.). Les différentes cinétiques obtenues ont montré que la durée d'adaptation pour une induction et une sécrétion active de l' $\alpha$ -amylase varie selon les souches. La durée de culture nécessaire pour obtenir la quantité maximale d'enzyme que peut excréter une souche varie de 8 à 20 heures. Cette évolution de l'activité  $\alpha$ -amylasique en fonction de la durée de culture montre clairement qu'après la répression catabolique, la totalité de l'enzyme déjà excrétée reste stable et active pendant toute la durée de l'expérimentation. Le deuxième groupe, constitué de trois souches de *Candida tropicalis* et de deux souches de *Rhizopus oryzae* est caractérisé par une diminution de l'activité maximale lorsque la culture est prolongée au delà de la durée optimale.

### **Modulation de l'activité des $\alpha$ -amylases par inactivation**

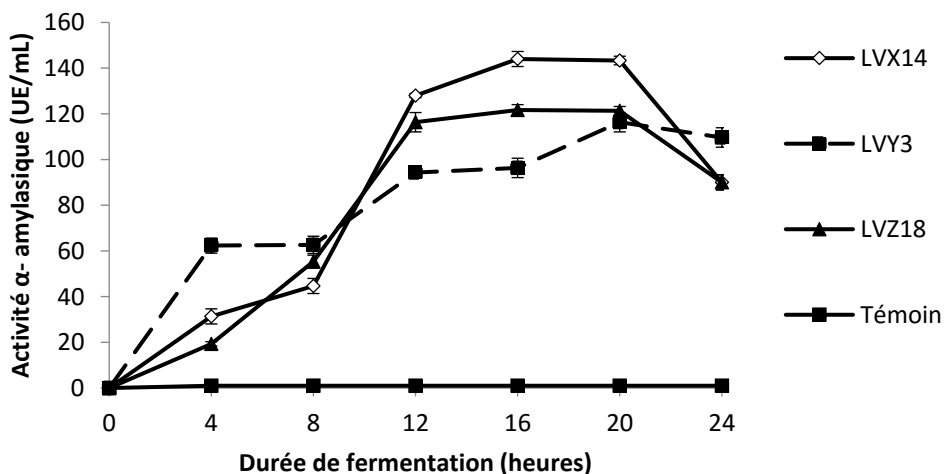
Dans certains milieux de culture, des baisses d'activité maximale traduisant l'inactivation d'une proportion de l'enzyme excrétée ont été observées. Ce type de cinétique a été mis en évidence dans les monocultures de quatorze souches soit 33,3% des microorganismes présélectionnés. Quelques exemples de cinétiques caractéristiques de ce mécanisme de modulation sont présentés dans les figures 3 et figures 4. Le titre enzymatique seuil conduisant à l'inactivation d'une proportion de l'enzyme sécrétée varie selon la souche microbienne. Chez les bactéries lactiques et *Bacillus*, il est faible et compris entre  $47 \pm 0,47$  UE/mL (*Leuconostoc mes.spp mesenteroide/dextranicum* LABX2) et  $14,66 \pm 1,88$  UE/mL (*Lactobacillus fermentum* LABY39) pour des durées de culture variant entre 8 heures et 16 heures. De même chez les moisissures, les quantités d'enzyme seuil conduisant à l'inactivation sont plus faibles ; elles sont comprises entre  $25 \pm 0,14$  UE/mL et  $72,66 \pm 0,5$  UE/mL et sont atteintes en générale en 4 heures de culture (Figure 3).

Figure 3: Evolution de l'activité  $\alpha$ -amylasique excretées par quelques *Lactobacillus* et *Bacillus* présélectionnées (*Leuconostoc mes.spp mesenteroide/dextranicum* LABX2, *Lactobacillus fermentum* LABY39, *Bacillus cereus* BX3 et *Bacillus subtilis* BZ14) modulée par inactivation.



Par contre, pour les trois souches de levures à savoir *Candida tropicalis* LVX14, LVY3 et LVZ18 appartenant à ce groupe, les titres enzymatiques seuils sont respectivement de  $144 \pm 0,47$  UE/mL,  $116,33 \pm 4,24$  UE/mL, et  $121,66 \pm 2,35$  UE/mL ; l'inactivation est observée à partir de 16 heures de culture (Figure 4).

Figure 4 : Activité  $\alpha$ -amylasique excretées par des levures présélectionnées (*Candida tropicalis* LVX14, *Candida tropicalis* LVY3 et *Candida tropicalis* LVZ18) modulée par inactivation



En effet la réduction de l'activité enzymatique peut s'expliquer par une instabilité de l'enzyme ou la modulation de l'activité par une inactivation réversible d'une proportion de l'enzyme excrétée. L'explication la plus possible est la modulation de l'activité enzymatique par inactivation partielle. En effet, Nazir et *al.* (2009) ont montré qu'une des formes des  $\beta$  glucosidases excrétées par *Aspergillus terreus*, est inhibée par le glucose et le cellobiose qui sont les produits d'hydrolyse de l'enzyme. Il en serait de même pour les formes d' $\alpha$  amylase produites par ces 5 souches de levures et moisissures. De toutes les souches sélectionnées, *Candida tropicalis* LVX8 a donné l'activité maximale la plus élevée ( $171,33 \pm 3$  UE/mL en 24 heures) mais les meilleures rendements ont été obtenues avec *Candida tropicalis* LVX14, *Candida tropicalis* LUY3 et *Candida tropicalis* LVZ18 qui ont produit en 16 à 20 heures  $144 \pm 0,47$  UE/mL,  $116,33 \pm 4,24$  UE/mL, et  $121,66 \pm 2,35$  UE/mL respectivement. L'utilisation des starters *Candida tropicalis* LVX14, *Candida tropicalis* LUY3 et *Candida tropicalis* LVZ18 va non seulement améliorer le contrôle et l'optimisation du processus de fermentation mais aussi contribuerait à la production rapide et importante d'acides organiques et de composés volatiles nécessaires à la production d'arôme et de flaveur pour reconstituer chaque type d'*attiéké* (Djeni, 2009)

## Conclusion

L'analyse de l'évolution l'activité  $\alpha$ -amylasique en fonction de la durée de culture a permis d'identifier parmi les espèces de microorganismes présélectionnées des ferments, celles qui excrètent rapidement l' $\alpha$ -amylase. La durée optimale des cultures a été déterminée pour chacune des souches étudiées ; elle varie de 12 à 24 heures dans les conditions de ce travail. Des trois espèces qui sécrètent constitutivement l' $\alpha$  amylase, c'est *Candida tropicalis* LVX8 qui est la plus performante et la durée optimale de culture est de 24 heures dans les conditions de l'expérience. Parmi les souches présélectionnées dont l'excrétion de l' $\alpha$  amylase est régulée par un mécanisme de répression, une espèce de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* LABZ4), trois espèces de *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens* BX5, *Bacillus amyloliquefaciens* BY4 et *Bacillus subtilis* BZ15), quatre espèces de levures (*Candida tropicalis* LVX1, *Candida krusei* LVZ19, *Candida kresei*, LUY16 et *Saccharomyces cerevisiae* LVZ1 ) et trois espèces de moisissures (*Geotrichum* sp MZ2, *Absida* sp MZ1 et *Apergillus oryzae* MY2 ) sont les plus performantes et sécrètent, dans les mêmes conditions, des quantités équivalentes d' $\alpha$  amylase. Pour ce qui concerne les souches dont l'activité de l' $\alpha$  amylase sécrétée est modulée par inactivation partielle, trois souches de *Candida tropicalis* (*Candida tropicalis* LVX14, *Candida tropicalis* LUY3 et *Candida tropicalis* LVZ18) et la souche *Rhizopus oryzae* MX4 ont donné les

meilleurs rendements. En somme, ces souches de microorganismes sélectionnés possèdent la plupart des critères recherchés pour un starter destiné à la bioconversion de la pâte de manioc à savoir l'excrétion rapide de l' $\alpha$  amylase, la capacité à métaboliser l'amidon pour accélérer le processus de fermentation. Par conséquent, pour évaluer les performances de ces souches afin d'établir une base scientifique en tant que ferments de manioc dominants pour la fermentation des produits alimentaires, et de valider si ces caractéristiques biochimiques sont bien exprimés, ces souches doivent être mises à contribution pour la conduite de la fermentation de la pâte de manioc pour la production de l'*attiéké*.

### Remerciements

Les auteurs adressent leurs sincères remerciements à toutes les productrices des ferments traditionnels de manioc en Côte d'Ivoire pour leur disponibilité et leur intérêt à participer à cette étude.

### References:

- Aboua, F., Kossa, A., Konan, K., Mosso, K., Angbo, S. et Kamenan, A., 1990. Analyse de quelques constituants du manioc au cours de la préparation de l'*attiéké*. In K. Foua Bi & B.J.R. Philomène (Eds.), *La post-récolte en Afrique : Séminaire International* Abidjan, Côte d'Ivoire, Montmagny QC Marquis Publishers, (pp. 217– 221).
- Abu, E. A ., Ado, S . A and James, D . B., 2005. Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *African Journal of Biotechnology*. 4 (8), p : 785-790.
- Ait, K. A., 2004. Isolement de la moisissure *Rhizopus oryzae* et optimisation d'un milieu à base de lactosérum pour la production de l' $\alpha$ -amylase. Thèse de Magister. Faculté des Sciences, Université Mentouri de Constantine.
- Aka, S., 2009. Fermentation spontanée durant la production d'une bière traditionnelle africaine (*tchapalo*): physico-chimie, microbiologie et biotechnologie. Thèse unique de Doctorat, Université Abobo-Adjame, 64 p.
- Akely, P. M. T., Amani N.G., Azouma, O., Nindjin, C., 2007. Effet de la force de pressage de la pâte de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) fermentée sur les qualités physico-chimiques et sensorielles de l'*attiéké*, in Amani G., Nindjin C., N'Zué B., Tschannen A., et Aka D. (eds), *Potentialités à la transformation du manioc ( Manihot esculenta Crantz) en Afrique de l'Ouest*. Actes de l'atelier international UAA-CSRS-CNRA-I2T, 4-7 juin 2007: Abidjan, CSRS, p. 153-157.
- Assanvo, J. B., Agbo N. G., Behi, N., Farah, Z., 2000. Enquêtes de consommation et de production d'*attiéké* réalisées à Abidjan, Dabou et à

- Jacquerville. Rapport LABSA (Université de Cocody, Côte d'Ivoire)/CSRS/ETHZ, 6 p.
- Bause, E., Erkens, R., Schweden, J and Jaenicke, L., 1986. Purification and characterization of trimming glucosidase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 206, 208–212.
- Bouatenin, K. M. J-P., Djéni, N. T., Aka, S., Brou K., and Djé, K. M., 2012. The Contribution of Microorganisms to the Fermentation of Cassava Dough during *Attieké* Processing in Côte d'Ivoire. *Food* 6 (1), 54-68.
- Dannawansa, R., Faridmoayer, A., Merwe, G. V. D., Li Y. X and Scaman, C. H., 2002. Overexpression, purification, and partial characterization of *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha glucosidase. *Glycobiology* 12 (3): 229-234.
- Diop, A., 1992. *L'attieké dans la région d'Abidjan, analyse économique de la filière traditionnelle à travers quelques types d'organisation (Adjoukrou, Ebrié, Attié)*. Thèse de troisième cycle en Economie rurale, Université de Cocody, Abidjan – Côte d'Ivoire, 146 p.
- Djéni, N. T., N'guessan, K. F., Toka, D. M., Kouame, K. A., Djé, K. M., 2011. Quality of attieke (a fermented cassava product) from the three main processing zones in Côte d'Ivoire. *Food Research International*, 44, 410–416.
- Djéni, N. T., 2009. Typologie de *l'attieké* de trois zones de production de Côte d'Ivoire et analyse des propriétés des levains traditionnels utilisés pour sa préparation. Thèse unique de Doctorat, Université d'Abobo-Adjamé, 170 p.
- Djéni, N.T., Bouatenin, K. M. J-P., Assouhoun, N. M. C., Toka, D. M., Menan, E. H., Dousset, X., Djé, K., 2015. Biochemical and microbial characterization of cassava inocula from three main attieke production zones in Côte d'Ivoire. *Food Control*, 50, 133-140.
- Dubey, A. K., Suresh, C., Kavitha, R., Karanth, N. G., Umesh-Kumar, S., 2000. Evidence that the glucoamylases and  $\alpha$ -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. - *FEBS Letters*, 471(2), 251-255.
- Fossi, B. T., Tavea, F., Ndjouenkeu, R., 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 14-18.
- Haq, I. U., Rani S., Ashraf, H., Qadeer, M. A., 2002. Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Science*, 2(2), 73-75.
- Henkin, T. M., Grundy, F. J., Nicholson, W. L, Chambliss, G. H., 1991. Catabolite repression of  $\alpha$  amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* lacI and galR repressors. *Molecular Microbiology*, 5, (3), 575–584.

- Kouadio, N. A., Mosso, K., Kouakou, K., Angbo, S. F., 1991. Etude comparative des méthodes traditionnelles de la préparation de l'attiéké dans le Sud de la Côte d'Ivoire. *Cahiers de la recherche scientifique et technique*, 108, 703-706.
- Mntsflii, P and Zalkin, H., 1979. Membrane-bound and soluble extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *J.Biol. Chem.* 254:8540-8547.
- Nazir, A., Rohit, S., Saini, H. S., Manhas, R. K. and Chadha, B. S., 2009. Regulation of expression of multiple  $\beta$  glucosidase of *Aspergillus terreus* and their purification and characterization. *Bioresources* 4 (1), 155-171.
- ONU.DI., 1990. *Formation d'une stratégie d'un plan d'action pour le développement de la filière agro-alimentaire en Côte d'Ivoire ; Filière féculents*. Rapport intermédiaire Août 1990, 105 p.
- Prescott, S. C., Dunn, C. G., Reed G., 1987. *Prescott & Dunn's industrial microbiology*. 4th ed. New Delhi, India: CBS Publishers and Distributors, p. 550-565 (XII, 883 p.).
- Ramachandran, S., Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C. R and Pandey A., 2004. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Braz. arch. biol. Technol* 47 (2), 309-317
- Scriban, R., 1999. *Biotechnologie*. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.), pp 401-409.
- Tamura and Takeichi K. Y., Ootzai, K., Yamasaki, M., Yamazaki, G. H., Ohmura, K. A., Nakayama Y., 1983. Alpha-amylase genes (amyR2 and amyE+) from an alpha-amylase-hyperproducing *Bacillus subtilis* strain : nucleotide sequences and. molecular cloning *J. Bacteriol.*, 156 (1): 327.
- Vazquez, F., Vallejo Herrera M. D., C. de Figueroa, L.I., Toro M. E., 2004. Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts. In: Spencer, J.F.T., de Spencer, A.L.R. (Eds.), *Environmental Microbiology. Methods and Protocols*, vol. 16. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 285–299 (chapter 30).
- Yamane, K., 1980. Regulation of extracellular  $\alpha$ -amylase production and cloning of  $\alpha$ -amylase genes of *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 54:877-883.