

ORIGINAL ARTICLE

Sélection et Caractérisation d'Isolats de Levure à Aptitude Amylytique provenant du Malt de Maïs (*Zea mays* sp.)

Philippe Diakabana^{*a,b,d-f} / Michel Gadet Dzondo^{a,c} / Jean Paul Latran Ossoko^{a,g} / Michel Elenga^{a,f} / Cédric Mpory Ngampio^a / Claudia Bassoumba^{a,d} / Haïshat Mahoumi^a

Authors' Affiliation

^aInstitut National de Recherche en Sciences de l'Ingénieur et Innovation Technologique, Brazzaville.

^bInstitut Supérieur de Technologie Agroalimentaire et d'Agronomie, Université Libre du Congo, Brazzaville.

^cEcole Nationale Supérieure Polytechnique, Université Marien NGOUABI, Brazzaville.

^dEcole Supérieure de Technologie des Cataractes, Brazzaville.

^eInstitut d'Agronomie, Université Protestante de Brazzaville, Brazzaville.

^fFaculté des Sciences et Techniques, T2A, Université Marien NGOUABI, Brazzaville.

^gEcole Nationale Supérieure d'Agronomie et de Foresterie, Université Marien NGOUABI, Brazzaville.

Auteur correspondant

Philippe Diakabana

Email:

diakabanap@yahoo.fr

Funding source

None

Abstract

L'étude vise la sélection et la caractérisation d'isolats de levure à aptitude amylytique provenant du malt de maïs (*Zea mays* sp.). Moyennant l'utilisation de la méthode des quadrants, 17 isolats cultivés sur gélose de Sabouraud chloramphénicol en boîte de Pétri ont été prélevés, ensuite purifiés et soumis à une sélection sur la gélose 4 % d'amidon. Après repiquages successifs effectués sur gélose de Sabouraud en boîte de Pétri, l'identification des colonies sélectionnées a été réalisée. Toute chose égale par ailleurs, les colonies ont différé par leur taille, laquelle est moyenne pour l'isolat S7 et grande pour S8 et S9. La densité cellulaire de colonie, exprimée en 10⁶ cellules/ml, a également différé d'une souche à l'autre, notamment 11,5 pour S7, 14 pour S8 et 28,1 pour S9. La capacité de transformation d'amidon est relativement plus élevée pour S9 avec 7 ° Brix d'extrait soluble à 2 heures d'incubation par rapport à la valeur de 6 ° Brix pour S7 et S8. La valeur maximale pour S9 décroît ensuite de 7 à 5 ° Brix durant la période allant de 4 à 20 heures et reste stable à 5 ° Brix jusqu'à la fin d'incubation à 34 heures. Par contre elle reste stable à 6 ° Brix pour S7 et S8 durant la période de 2 à 34 heures. L'isolat amylytique S9 s'est révélé plus performant que les isolats S7 et S8.

Application Pratique

L'isolat S9 peut être utilisé pour réduire la charge polluante due à l'amidon résiduel du fonctionnement d'installation d'extraction d'amidon de racine de manioc et de moulins de fofou. La suppression d'amidon résiduel, moyennant l'utilisation de culture mixte d'isolat S9 avec une levure alcoogène dans le procédé de production du bioéthanol à base de rebuts industriels d'amylacés, peut conduire à l'assainissement de l'environnement et apporter de la valeur ajoutée à l'activité principale.

Mots clefs: Malt de maïs de la variété Accros, isolats de levure, souches sélectionnées de levure, densité cellulaire, aptitude amylytique.

1. Introduction

Les effets négatifs sur l'environnement sont nombreux, notamment par l'utilisation des produits issus des sources des énergies fossiles (Ganesan et Nellaippan, 2014) et la présence de

rebutés générés par les pratiques de certaines industries productrices des farines amylacées. Cela suscite l'intérêt d'explorer, d'une part des sources d'énergies renouvelables et d'autre part

la valorisation des rebuts notamment des minoteries et des moulins de fofou au Congo dans la production du bioéthanol (Diakabana *et al.*, 2016 ; 2020).

L'origine du procédé d'utilisation d'activités amylolytiques se perd dans l'histoire de l'humanité comme le témoignent les procédés de brassage du malt de céréales en brasserie, dans la production des eaux-de-vie d'Irlande, de Russie et de manioc dans le Bassin du Congo (Diakabana, 2020). A partir de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, les amylases sont beaucoup utilisées dans la bioindustrie.

L'intérêt pour les amylases fongiques a augmenté ces dernières années où plusieurs investigations sont menées sur les enzymes amylolytiques extracellulaires secrétées par les genres *Aspergillus*, *Rhizopus* (Ait-kaki, 2004; Ramashandran *et al.*, 2004), *Penicillium* (Nouadri, 2011), *Lipomyces* (Merabti, 2006) et celles produites en culture mixte fongique (Abu *et al.*, 2005).

Les levures ont des applications diversifiées et un impact spectaculaire dans le contexte industriel, biotechnologique, médical et environnemental dans toutes les civilisations (Fossi *et al.*, 2005 ; Bennamoun, 2017 ; Ghomrani et Boukerrou, 2021).

Les bouilleurs traditionnels de *lotoko* (eau-de-vie de manioc) utilisent du malt de maïs (Diakabana *et al.*, 2007 ; 2008) provenant d'une longue durée de phase d'étouffement du processus de maltage de maïs (Diakabana *et al.*, 2013 ; 2014). Le malt de maïs obtenu dans ces conditions est riche en densité cellulaire de levure et activité amyliasique nécessaires à la bonne efficacité du processus de saccharification-fermentation (Diakabana *et al.*, 2007; 2008) dans la

production de bioéthanol (Diakabana *et al.*, 2016; 2017).

Actuellement, diverses espèces de levure amylolytique sont connues, notamment *Saccharomyces diastaticus*, *Schwanniomyces occidentalis* (Walker, 2009), *Pichia pastoris* (Mizutani *et al.*, 2012), *Saccharomyces cerevisiae* (Martínez *et al.*, 2016), *Wickerhamomyces anomalus* (Yan *et al.*, 2019). L'utilisation de levures en biotechnologie ouvre la possibilité de biodégradation des déchets industriels, obtenant ainsi des produits à valeur ajoutée (Ghomrani et Boukerrou, 2021).

Dans le processus de production d'éthanol utilisant de matières premières amyliacées, il existe des démarches technologiques impliquant de processus de culture mixte mettant en œuvre l'action de microorganisme dégradant l'amidon couplée à la fermentation éthyliques de sucres simples (Abu *et al.*, 2005).

En vue d'amorcer le procédé de production industrielle du bioéthanol de manioc au Congo, il est nécessaire de procéder par le processus de saccharification fermentation contrôlés utilisant de souches de levure performante (Diakabana *et al.*, 2014).

Notre travail consiste d'isoler, sélectionner et caractériser sur la base des paramètres morphologiques, physiologiques et de la densité cellulaires des colonies d'isolats de levure provenant du malt de maïs et prouvant l'aptitude de transformer l'amidon.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Collection des échantillons de malt de maïs

Douze (12) échantillons du malt de maïs de variété locale nommée *Accros* (**Photo 1**) utilisés pour l'expérimentation ont été procurés auprès des marchandes rencontrées au niveau du marché d'Ouenzé, dans l'arrondissement V du département administratif de Brazzaville (République du Congo).



Photo1: 12 échantillons de malt de maïs contenus dans des sachets en plastique

L'enquête réalisée auprès des productrices traditionnelles et marchandes questionnées a révélé que la durée de la phase d'étouffement lors du processus du maltage de maïs est d'environ 4 à 6 jours (Diakabana *et al.*, 2013 ; 2014 ; 2017).

Ces 12 échantillons ont ensuite été transportés et stockés au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire de l'Institut National de Recherche en Sciences de l'Ingénieur et Innovation Technologique (INRSIIT). Ils ont été séchés dans un séchoir solaire pendant deux jours d'ensoleillement et stockés au laboratoire. Un mélange de ces 12 échantillons a été réalisé pour constituer un stock de travail conservé au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire de l'INRSIIT en attendant la suite de l'expérimentation.

2.1.2. Milieux de culture

Trois milieux de culture ont été utilisés, notamment le milieu sélectif gélose de Sabouraud 0,005 % chloramphicol 4 % glucose agar fourni par une société indienne HIMEDIA Laboratories pour l'isolement et purification d'isolats par repiquages successifs, la gélose à 4% d'amidon pour la sélection d'isolats de levure amylolytique et le bouillon synthétique à 4% amidon pour le test d'aptitude amylolytique d'isolats sélectionnés.

2.2. Méthodes

2.2.1. Isolement des souches de levure

2.2.1.1. Echantillonnage

A partir du stock de travail, pH évalué à 4,33, trois prélèvements de 10 g chacun ont été effectués à trois niveaux différents (Toumi, 2018), notamment en surface, au cœur et au fond du stock de travail; on a obtenu une quantité totale de 30 g qui ont été broyés.

2.2.1.2. Préparation de la suspension mère

Les manipulations sont effectuées dans des conditions aseptiques, en opérant près de la flamme du bec de Bunsen.

10 g de broyat de malt de maïs fraîchement obtenu ont été mis en suspension dans 90 ml d'eau enrichie d'extrait de levure. La solution a ensuite été homogénéisée manuellement pendant 3 minutes et laissée incubée pendant 24 h à température ambiante pour obtenir la solution mère.

2.2.1.3. Technique d'isolement des levures

L'isolement de souches de levure a été effectué en utilisant un milieu sélectif gélose de Sabouraud à 0,005% Chloramphénicol et 4 % glucose (Ameyapoh *et al.*, 2006).

10 ml de la suspension du broyat de malt de maïs provenant de la solution mère ont été prélevés stérilement et mis dans un tube à essai stérile, ensuite bouché avec du coton ouate. Les milieux de culture solides mis en œuvre ont étéensemencés en surface en vue de l'isolement de microorganismes.

La méthode des quadrants et sa variante ou technique par épuisement citée par [Nicolas et Daniel \(1998\)](#) ont été utilisées.

-Selon la méthode des quadrants, quatre quadrants de surfaces progressivement croissantes ont été tracés sur le fond de la boîte de Pétri contenant de la gélose; les surfaces des trois premiers quadrants ont été plus réduites et celle du quatrième plus grande. Le bouton stérile de la pipette Pasteur a été chargé avec la culture de levure et légèrement posée sur la gélose, à l'intersection de 1 et 2 près du bord de la boîte. A l'aide du bouton d'une pipette Pasteur stérile, des stries assez espacées ont été réalisées pour entraîner un peu de suspension laquelle a été étalée sur les deux premiers quadrants (1et 2). Cet instrument d'étalement a été flambé au bec de Bunsen et refroidi quelques instants. Le deuxième quadrant a ensuite été étalé par des stries sur le troisième quadrant. L'instrument a été flambé et refroidi. Le troisième quadrant a été étalé par des stries sur le quatrième quadrant. La culture réalisée a été incubée à 28-30°C pendant trois à cinq jours à l'étuve.

-Selon la technique par épuisement, la boucle en verre stérile de pipette Pasteur superficiellement trempée dans la suspension a été légèrement posée sur la gélose en boîte. Le prélèvement a été épuisé sur la demi-boîte 1, puis sur la demi-boîte 2, en réalisant des stries serrées ; on a refermé la boîte et laissé cultiver à 30 °C pendant 3 à 5 jours.

2.2.1.4. Purification

-Principe

La purification des colonies de levure isolée a été faite par repiquages successifs ([Larpen, 1991](#)). Une colonie suffisamment isolée a été repiquée sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol en boîtes de Pétri, ensuiteensemencée sur gélose en pente dans des tubes à hémolyse suivant la méthode d'épuisement par stries en zigzag.

-Mode opératoire

En vue d'une meilleure purification d'isolat de levure, les colonies répertoriées et suffisamment séparées des voisines (1cm au minimum) ont été repiquées deux à quatre fois sur milieu solide en pente par la méthode d'épuisement.

De la gélose (8-10 ml) en pente a été obtenue en gardant le tube à essais en position inclinée d'un angle de 30-40°C par rapport au plan horizontal, pendant le refroidissement. La technique à la pipette boutonnée stérile a été utilisée pour ensemenecer la gélose inclinée. Après avoir chargé le bouton stérile de la pipette Pasteur avec la culture de levure à repiquer en le trempant dans la suspension ; il a été introduit dans le tube jusqu'à la base de la gélose. Les cellules de levures ont été transférées aseptiquement sur la gélose en pente en faisant des stries serrées et remontant du fond vers l'extrémité du tube. Le milieu a été incubé à 28-30°C pendant 48-72 heures.

2.2.1.5. Conservation

Après purification, chaque isolat a été cultivé en stries sur gélose de Sabouraud en pente dans de tubes bouchés avec du coton ouate. En attendant leur utilisation ultérieures, notamment l'identification et le test sur la capacité de consommation d'amidon, les souches

amylolytiques ont été stockées au réfrigérateur à +4°C (Ulhaq *et al.*, 2002 ; Ghomrani et Boukerrou, 2021) afin qu'elles gardent toutes leurs caractéristiques liées à une bonne vitalité et de limiter les possibilités de variations.

2.2.1.6. Sélection des souches amylolytiques

La sélection des souches amylolytiques a été effectuée par test de culture sur la gélose à l'amidon enrichi d'extrait de levure et de sulfate d'ammonium (Soufleros et Bertrand, 1979 ; Marc, 1982) et la gélose au glucose comme un milieu témoin afin de mettre en évidence la capacité amylolytique.

Pour rechercher la capacité amylolytique des isolats, une culture test sur gélose à l'amidon comme seule source de carbone et d'énergie a été effectuée par incubation pendant 72 heures à 30 °C.

Chaque souche de levure isolée a été diluée dans 5 ml d'eau physiologique stérile et ensemencée sur la gélose à l'amidon, au même temps sur la gélose au glucose en utilisant la méthode d'ensemencement par épuisement.

Les boîtes ensemencées ont été incubées à 29 ± 1°C pendant 3 jours. Après incubation, les souches pouvant se développer sur la gélose à l'amidon ont été considérées comme positives. La valeur élevée du niveau de transformation d'amidon en bouillon synthétique a été prise en compte. Pour suivre l'évolution du profil de consommation d'amidon par les souches de levure à activité amylolytique sélectionnées.

2.2.1.7. Identification des souches précédemment sélectionnées à aptitude amylolytique

L'identification des souches précédemment sélectionnées à aptitude amylolytique a été basée sur les clefs de détermination de Barnett *et al.*

(2000) et Kreger-Van (1984). Ces souches ont été identifiées après une étude culturale en vue d'apprécier les caractéristiques macroscopiques, microscopiques et physiologiques (Ghomrani et Boukerrou, 2021).

2.2.1.7.1. Etude des caractères morphologiques et culturaux des souches sélectionnées à aptitude amylolytique

L'étude des caractères morphologiques et culturaux des souches sélectionnées à aptitude amylolytique a été scindée en deux étapes : l'examen macroscopique des colonies, selon la technique bactériologique citée par Nicolas et Daniel (1998) permettant d'effectuer une première caractérisation et l'examen microscopique des souches.

2.2.1.7.2. Examen macroscopique

L'étude macroscopique a été effectuée sur des isolats de souches amylolytiques pour faire une présélection basée essentiellement sur leurs caractéristiques morphologiques, notamment la description de la colonie en surface de gélose (aspect du contour, de la surface, du relief de la colonie par rapport à la surface de gélose ; la couleur et le caractère d'opacité). L'examen des cultures en boîtes de Pétri a été effectué quotidiennement.

2.2.1.7.3. Observation microscopique

L'étude des caractères morphologiques des souches isolées sélectionnées à aptitude amylolytique a consisté de faire une préparation microscopique à l'état frais, entre lame et lamelle d'une goutte issue de chaque échantillon de souche amylolytique pure de levure afin de déterminer la forme, le mode groupement, de reproduction et la mobilité cellulaires. L'observation au microscope optique a été faite au moyen d'un objectif 40X (Tsyoshi *et al.*,

2004) pour visualiser la forme, l'arrangement et le mode de division cellulaires.

2.2.1.8. Evaluation de la densité cellulaire par colonie des souches amylolytiques

La densité cellulaire par colonie a été réalisée par comptage sous microscope moyennant l'utilisation de la cellule de Malassez (Diakabana et al., 2017).

A partir d'un isolement récent d'isolat de levure sur gélose de Sabouraud, la colonie a été prélevée le plus complètement possible à l'anse et mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile ; laquelle suspension a été bien homogénéisée. C'est la suspension mère d'isolat de levure.

-Selon la méthode adaptée de Heineken (1986), i) prélever 0,1 ml de la suspension mère et la diluer dans 0,9 ml d'eau distillée, ii) prélever une goutte après homogénéisation, ii) ensuite la déposer sur la cellule de Malassez, puis la couvrir avec une lamelle spéciale. Prélever une goutte par homogénéisation, ensuite la déposée sur la cellule de Malassez, puis la couvrir avec une lamelle spéciale.

-Observer au microscope avec l'objectif 40x ;

-Compter le nombre de cellules de levure dans chacune des 5 zones, de A à E, comme suit :

A				D
		C		
B				E

-Déterminer le nombre de cellules de levure de la manière suivante:

$\text{Nombre de cellules de levure} = (A+B+C+D+E) \times k \text{ cellule/ml}$; Avec $k = 0,5 \times 10^6 \text{ cellule/ml}$ (coefficient donné par Heineken).

2.2.2. Capacité de consommation d'amidon des isolats testés positifs sur amidon

La capacité de consommation d'amidon des isolats purifiés de levure testés positifs sur amidon a été évaluée, en bouillon synthétique (4 g d'amidon /100 ml) à 28 ± 2 °C et contenu dans des bouteilles de forme cylindro-conique, par l'évolution de la mesure de l'extrait soluble exprimé en % Brix par réfractométrie au cours du test de processus d'amyolyse (Diakabana et al., 2013).

2.2.3. Analyse statistique des résultats

Toutes les expériences ont été exécutées en triple. Les valeurs de moyenne, d'écart-type, de coefficient de variation et d'intervalle de confiance déterminées par la méthode basée sur la loi en cloche de Gauss-Laplace (Larrieu, 1988) ont été utilisées en vue d'apprécier la répétitivité des mesures d'analyse et des opérations.

3. Résultats et discussion

3.1. Résultats

Les résultats d'isolement, de sélection, de caractérisation d'isolats de levure à activité amylolytique provenant du malt de maïs, ceux de la densité cellulaire des colonies et le profil de consommation d'amidon sont décrits.

3.1.1. Isolement des souches de levures

L'étalement d'un aliquote de suspension aqueuse d'échantillon du malt de maïs réalisé sur milieu gélosé Sabouraud chloramphénicol 0,005% en boîte de Pétri et incubation effectuée à une

température de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 48 heures, ont permis d'isoler 20 souches.

3.1.2. Purification

Après les repiquages successifs sur le milieu Sabouraud Chloramphénicol 0,005% en boîtes de Pétri, dix-sept (17) souches pures de levure désignées respectivement de S1 à S17 ont été cultivées, ensuite ensemencés respectivement en tubes sur gélose en pente pendant 72 heures d'incubation.

3.1.3. Conservation

Les dix-sept (17) souches de levure purifiées par repiquages successifs et cultivées sur la gélose en pente ont été conservées au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}\text{C}$ (Figure 1), en attendant leurs utilisations ultérieures, notamment le test amylolytique.



Figure 1: Dix-sept (17) souches de levure purifiées après repiquages successifs et cultivées sur gélose de Sabouraud en pente dans tubes, après 72 heures d'incubation à $29\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.1.4. Sélection des souches amylolytiques

Pour la mise en évidence de l'activité amyliasique sur les dix-sept isolats, une culture test sur gélose à l'amidon comme seule source de carbone et d'énergie a été effectuée selon la méthode d'ensemencement par épuisement en boîtes de Pétri, ensuite incubation pendant 72 heures à 30°C .

Parmi les dix-sept souches testées sur la gélose à l'amidon, seules trois souches ont poussé notamment S7, S8 et S9 (Figure 2).



Figure 2 : Trois souches de levures amylolytiques sélectionnées S7, S8 et S9 ayant cultivé sur gélose à l'amidon après 72 heures d'incubation à 30°C .

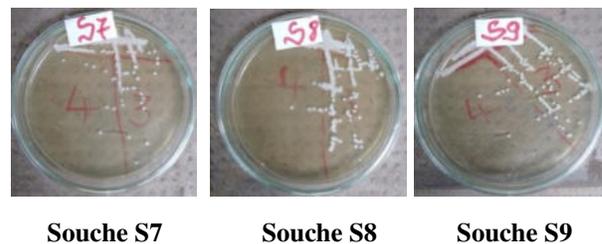


Figure 3: Trois souches amylolytiques (S7, S8, S9) repiquées sur gélose de Sabouraud après 72 heures d'incubation à $29\pm 1^{\circ}\text{C}$.



Figure 4 : Les trois souches de levures amylolytiques sélectionnées S7, S8 et S9 repiquées sur gélose de Sabouraud en pente pendant 72 heures d'incubation.

3.1.5. Repiquage des souches amylolytiques sur gélose Sabouraud en boîte de Pétris

Pour une bonne visibilité des colonies, chaque isolat a été repiqué sur la gélose Sabouraud Chloramphénicol.

Les trois souches amylolytiques sélectionnées ont été ensuite repiquées sur gélose Sabouraud en boîte de Pétri suivant la méthode des quadrants (Figure 3).

3.1.6. Repiquage des souches amylolytiques sur gélose Sabouraud en pente pour une conservation

En vue de leur conservation au réfrigérateur + 4 °C, les trois souches de levures amylolytiques sélectionnées ont été repiquées sur la gélose en pente (Figure 4) en attendant leurs utilisations, notamment pour leur identification.

3.1.7. Identification

En vue d'assurer l'identification des isolats à aptitude amylolytique testées, une étude culturale relative à l'appréciation des caractères morphologiques (macroscopique, microscopique, de reproduction et de densité cellulaire) afférente a été effectuée.

3.1.7.1. Caractères macroscopiques

Après incubation pendant trois jours à 28±2°C, les colonies isolées ont subi une observation macroscopique. Les caractéristiques principales de ces trois souches de levures sélectionnées sont récapitulées (Tableau 1).

Les trois souches de levure amylolytiques présentent des caractères communs en ce qui concerne l'allure du contour régulier, le relief bombé, l'aspect de la surface lisse et brillante, la couleur blanche, la forme ronde, la consistance crémeuse et l'aspect opaque.

La différence a été observée au niveau de la taille. Celle des souches S8 et S9 est grande, tandis que celle de la souche S7 est moyenne.

Tableau1 : Appréciation des caractères macroscopiques des souches de levure sélectionnées*

Isolat	Caractéristiques macroscopiques des colonies examinées							
	Taille	Forme	Contour	Relief	Aspect	Couleur	Consistance	Opacité
S7	Moyenne	Ronde	Régulier	Bombé	Lisse, Brillante	Blanche	Crémeuse	Opaque
S8	Grande	Ronde	Régulier	Bombé	Lisse, Brillante	Blanche	Crémeuse	Opaque
S9	Grande	Ronde	Régulier	Bombé	Lisses, Brillante	Blanche	Crémeuse	Opaque

*Trois souches de levure amylolytiques ont cultivé à 30 °C sur gélose de Sabouraud pendant 72 h, les colonies ont été caractérisées par rapport à la forme, le contour, le relief, la surface, la couleur, la consistance et l'opacité.

3.1.7.2. Caractères microscopiques

Les résultats de l'observation microscopique à l'état frais montrent que les trois souches de levure possèdent le même mode de reproduction, le même mode de groupement cellulaire.

Les résultats obtenus montrent que les trois souches de levure possèdent le même mode de reproduction, le même mode de groupement cellulaire et sont toutes immobiles ; la différence est observée au niveau de la forme (Tableau 2).

En ce qui concerne la forme, les cellules des souches S7 et S8 sont rondes et ovoïdes, quant à la souche S9 ses cellules sont ovoïdes et allongées.

Tableau 2: Appréciation des caractères microscopiques des souches de levure sélectionnées*

Souches	Caractéristiques microscopiques des souches			Mobilité des cellules
	Forme des cellules	Mode de reproduction	Mode de groupement des cellules	
S7	Rondes et ovoïdes	Bourgeonnement mono latéral	Isolées et diplo	Immoble
S8	Rondes et ovoïdes	Bourgeonnement mono latéral	Isolées et diplo	Immoble
S9	Ovoïdes et allongées	Bourgeonnement mono latéral	Isolées et diplo	Immoble

*Trois souches (S7, S8 et S9) de levure ayant cultivé à 30 °C sur gélose de Sabouraud pendant 72 h, les colonies ont été caractérisées. L'observation microscopique à l'objectif X40 permet d'apprécier la forme, le mode de reproduction, de groupement et la mobilité cellulaires.

3.1.7.3. Evaluation de la densité cellulaire de chaque souche amylolytique

Les résultats de la concentration cellulaire dans la colonie de chaque souche amylolytique, effectuée à l'aide d'une cellule de Malassez sont variés (Figure 5).

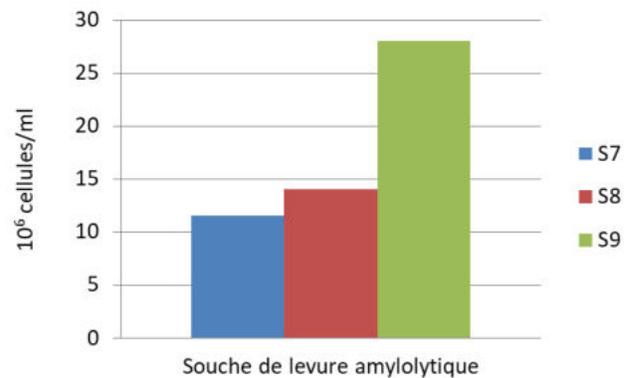


Figure 5 : Concentration cellulaire de la colonie de chaque souche de levure amylolytique

La concentration cellulaire est plus élevée pour la colonie de l'isolat S9 évaluée à 28 x 10⁶ cellules/ ml par rapport à celles pour S8 et S7 évaluées respectivement à 14 et 11,5 x 10⁶ cellules/ ml.

3.1.8. Evolution du profil de consommation d'amidon par les souches sélectionnées

Les résultats de l'expérimentation révèlent l'évolution de l'extrait soluble, en % Brix, relatif à la consommation de l'amidon au cours de la culture en bouillon synthétique des souches amylolytiques testées (Figure 6).

Le profil du métabolisme de l'isolat S9 sur amidon est différent par rapport à celui de deux autres testés. Il est caractérisé par une dégradation rapide de l'amidon évaluée à un

maximum de 7 % Brix d'extrait soluble généré durant 2 et 4 heures d'incubation. Ensuite, il décroît progressivement et révèle une diminution de l'extrait soluble à 5 % Brix, de 4 à 21 heures ; cette valeur se stabilise finalement le reste de temps d'incubation.

Par contre, le profil de la valeur de l'extrait soluble dans le bouillon synthétique à l'amidon, au cours d'incubation avec les isolats S7 et S8, est presque le même ; il est stable à 6% Brix durant tout le temps de culture (de 2 à 34 heures).

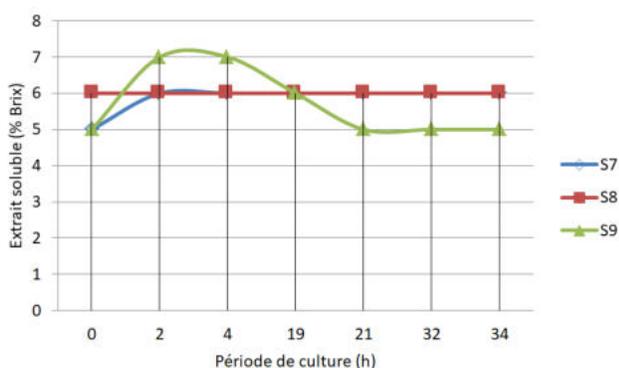


Figure 6: Evolution de l'extrait soluble (en % Brix) au cours de la culture des souches (S7, S8 et S9) de levure en bouillon synthétique à 4% d'amidon.

3.2. Discussion

Le pH du malt, relativement acide (pH 4.33), favorise la prolifération des levures (Allen et Ahearn, 1987 ; Larpent et Larpent-Gaugaud, 1997). Cette valeur de pH relativement basse serait due à la longue durée de la phase d'étouffement lors du processus du maltage laquelle favorise la capacité amylolytique du malt de maïs qui croît avec la population de levure (Diakabana *et al.*, 2017).

Parmi les activités amylolytiques provenant du malt de maïs, figurent celles qui sont d'origine

enzymatique développées dans le grain au cours du processus de germination (Diakabana *et al.*, 2013 ; 2014), et celles développées par les microorganismes contaminant les grains de maïs (Diakabana *et al.*, 2017) recherchées empiriquement par les bouilleurs de *lotoko* dans le Bassin du Congo (Diakabana *et al.*, 2007 ; 2016). Les échantillons de malt de maïs utilisés comme source de ferments amylolytiques renferment donc un nombre important de souches levuriennes (Ganesan et Nellaiappan, 2014).

Trois souches, nommées S7, S8 et S9 ayant cultivé sur la gélose à l'amidon enrichie d'extrait de levure et de sulfate d'ammonium sont à caractère amylolytique (Soufleros et Bertrand, 1979 ; Marc, 1982).

L'utilisation de bouteille en position cylindro-conique, en guise de fermenteur, a permis d'assurer une auto-agitation naturelle de la culture gazogène de levure nécessaire pour uniformiser l'environnement physique, chimique et biologique, notamment pour homogénéiser la température, le pH, l'aération, le substrat, le produit et la biomasse microbienne mise en œuvre en vue de la modélisation du processus de fermentation (Engasser, 1988 ; Lagzouli *et al.*, 2007).

La capacité de cultiver dans des conditions d'expérimentation à base d'amidon explique que ces trois souches S7, S8 et S9 sont aptes d'hydrolyser l'amidon seule source de carbone (Lagzouli *et al.*, 2007 ; Tumi, 2018 ; Ghomrani et Boukerrou, 2021).

Ces trois souches de levure sélectionnées ont à la fois l'aptitude glycolytique et amylolytique car elles cultivent sur gélose à glucose d'une part et, d'autre part sur gélose à amidon comme c'est le

cas des espèces de levure amylolytique connues de nos jours, notamment *Saccharomyces diastaticus*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* (Walker, 2009 ; Mizutani *et al.*, 2012 ; Martínez *et al.*, 2016 ; Yan *et al.*, 2019).

L'utilisation de ces souches de levure sélectionnées S7, S8 et S9 donne la possibilité de biodégradation des déchets industriels amylacés, conduisant ainsi à l'obtention des produits à valeur ajoutée (Ghomrani et Boukerrou, 2021).

Au cours de test d'expérimentation, la diminution de l'extrait soluble relatifs aux produits d'amyolyse en bouillon synthétique sur amidon, allant de 7 à 5 °Brix, indique une consommation notable de sucres simples par la souche amylolytique sélectionnée S9 révélant une possession d'activité glycolytique (Diakabana *et al.*, 2013).

La stabilité de l'extrait soluble évaluée à 5 °Brix par S9 indique un arrêt de consommation de sucres simples générés au cours de l'hydrolyse d'amidon (Scriban, 1988), probablement dû à la limite de son activité débranchante.

La stabilité de l'extrait soluble évaluée à 6 °Brix et engendrée par les isolats amylolytiques sélectionnés S7 et S8 correspond à une plus faible activité amylolytique due à leur plus faible activité débranchante aboutissant à une plus grande valeur d'extrait soluble limite par rapport à celle avec l'isolat S9.

L'extrait soluble limite présent en bouillon synthétique sur amidon peut être levé par l'addition d'une préparation enzymatique

exogène adéquate, notamment la glucoamylase (Anto *et al.*, 2006 ; Lagzouli *et al.*, 2007).

Le management des potentialités de la souche S9 pour la suppression d'amidon des effluents industriels et la consommation d'extrait soluble généré est intéressant dans le contexte d'une fermentation mixte avec une autre souche de levure, notamment *Candida utilis* aboutissant à la conversion de rebuts amylacés en protéine spécifique de cellule microbienne (Manilal *et al.*, 1991) utilisable en alimentation animale riche en protéine ou de levure alcoogène conduisant à la production de bioéthanol (Diakabana *et al.*, 2016) économiquement rentable.

L'identification par des tests culturaux (macroscopiques) et morphologiques (microscopique), les résultats de la littérature (Kreger-Van, 1984 ; Barnett, 2000) et des tests biochimiques montrent que ces souches appartiennent au genre *Candida lusitaniae* pour S7, *Rhodoturala* pour S8 et *Candida glabrata* pour S9.

4. Conclusion

Trois souches de levure testées amylolytiques possèdent également une activité glycolytique révélée par leur capacité de cultiver sur la gélose au glucose. Elles peuvent être prises en compte pour le processus de fermentation industriel à base de produits amylacés. L'étude cinétique de la consommation d'amidon en bouillon synthétique révèle que la souche S9 est plus performante par rapport à S7 et S8 dans le contexte de la transformation de ce polysaccharide. Ces souches à aptitude amylolytique pourront permettre de valoriser les rebuts des minoteries et moulins de fofou installés dans les pays de Bassin du Congo.

Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont nulle part de conflit d'intérêt pendant la soumission de l'article.

Ethique

Cette étude n'implique pas des tests sur humains et animaux.

Remerciements

Les auteurs remercient M. Loïc Jean Philléons Diakabana Kiyindou, diplômé de l'EAD (Ecole Africaine de Développement) de Brazzaville, pour sa participation aux illustrations du texte.

References

- Abu, E.A., Ado, S.A., & James, D.B. (2005). Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* on sorghum pomace. *African Journal of Biotechnology*, 3(8) : 785-790.
- Allen, N.H. & Ahearn, D.G. (1987). Ecology and aquatic yeasts. In : Rose AH, and Harisson JS (Eds). The yeasts, Vol.1, Biology of yeast, 2nd Ed. London : Academic Press : pp 27.
- Ameyapoh, Y., Workpor, K. & De Souza, C. (2006). Identification and selection of yeast strains for the efficient production of alcohol. *Journal of Science*, 6 (1): 30-40.
- Anto, H., Trivedi, U. & Patel, K. (2006). Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. *Bioresource Technology*, 10:1161-1166.
- Barnett J.A., Payne R.W. & Yarrow D. (2000). Yeast : Characteristics and identification, 3rd Ed. Cambridge University Press.
- Bennamoun, L. (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens. Purification et caractérisation enzymatique. Thèse Doctorat, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Algérie.
- Diakabana, P., Louembé, D. & Kobawila, S.C. (2007). Physico-chemical and biochemical characteristics of the fermentation of Boganda, a brandy of Congo. *Research Journal of Biotechnology*, 2: 18-25.
- Diakabana, P., Nyanga-Koumou, C.A., Kobawila, S.C., Louembé, D. & Derdelinckx, G. (2008). Study of characteristic parameters of traditional process in the production of Boganda, a brandy of Congo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2 (3): 258-271.
- Diakabana, P., Mvoula-Tsiéri, M., Dhellot, J., Kobawila, S.C. & Louembé, D. (2013). Physico-chemical characterization of brew during the brewing corn malt in the production of maize beer in Congo. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(6): 671- 677.
- Diakabana, P., Dinga, B.S., Mvila, A.C., Kobawila S.C. & Louembe, D. (2014). Isolation and screening of yeast strains involved in performing of traditional production process of cassava bioethanol. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3 (6): 671-684.
- Diakabana, P., Matondo, A., Ngaka, A. & Cendrine N.(2013-2014). Influence du mode de trempage du grain de maïs sur le déroulement du processus traditionnel du maltage de maïs dans la production du Boganda, une eau-de-vie du Congo. *Annales de l'Université Marien NGOUABI*, 13-14 (4): 1-12.
- Diakabana, P., Kobawila, S.C. & Louembé, D. (2016). Correlation between initial content of starch of the mash of cassava (*Manihot esculenta* L) in fermentation and temperature of distillation of alcoholic fermented wort in the course of the production of bioethanol in Congo. *Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(10): 997-1009.
- Diakabana, P., Dzondo, M.G, Moussounga, J.E., Sompila, T.A.W.G., Madiélé Mabika, A.B., Messo, L., Kobawila S.C. & Louembé D. (2017). Behavior of grains in the course of the smothering phase of the traditional process of malting of corn (*Zea mays*

- sp.) in the production of lotoko, a brandy of the Basin of Congo. *Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11): 3541-3551.
- Diakabana, P. (2020). Discussion générale. In *Développement et expansion des Bioindustries : Pratiques des Biotechnologies dans le Bassin du Congo* : pp 235-247.
- Engasser, J.M. (1988). Modélisation des processus de fermentation. In: *Biotechnology*, Scriban R. coordonnateur; Technique et Documentation-Lavoisier, Troisième Edition, Paris, pp 301- 325.
- 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.
- Ganesan, S. & Nellaiappan, O.G. (2014). Exploration of wild yeast strains for thermotolerance and ethanol production. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 18 (1): 14-22.
- Ghomrani, S.D.E. & Boukerrou, F.Z.S. (2021). Etude de la production d' α -amylase levurienne avec des nouvelles propriétés à intérêt industriel. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine 1 : p108.
- Heineken, (1986). Instructions for controlling the manufacturing. Amsterdam, Holland.
- Kreger-van, R.N.J.W. (1984). The yeast, a taxonomic study, Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam.
- Lagzouli, M., Charouf, R., El, Y.M., Ouhssine, M., Berny, E.H. & Jadal, M. (2007). Optimisation de la croissance et de la production de glucoamylase extracellulaire par *Candida guilliermondii*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 146: 251-270.
- Larpent, J.P. (1991). *Biotechnologie des levures*. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris : pp 97-127.
- Larpent L.P. et Larpent- Gaurgaud M. (1997). *Memento technique de microbiologie*, 8^{ème} édit. Paris : Edition Techniques et Documentation-Lavoisier.
- Larrieu, J. (1988). Utilisation de la statistique en gestion de qualité. In: *Biotechnology*, Scriban R. coordonnateur; Technique et Documentation-Lavoisier, Troisième Edition, Paris, pp 661-679.
- Manilal, V.B., Narayanan, C.S. & Balagopalan, C. (1991). Cassava starch effluent treatment with concomitant SCP production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(2): 185-190.
- Marc, I. (1982). Yeast fermentation: *Bibliographic study*. *Bio*, 13 (10): 45-58.
- Martínez, J.L., Meza, E., Petranovic, D. & Nielsen, J. (2016). The impact of respiration and oxidative stress response on recombinant α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*. 3, 205-210.
<https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.06.003>
- Njcolas, M. & Daniel, C. (1998). Techniques d'isolement ; In : *Activités Technologiques en Microbiologie 1*, sous la direction de Figarella J. et Leyla G., Techniques de base et Méthodologie, Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, pp 39-68,
- Njcolas, M. & Daniel, C. (1998). Caractères culturels et cultures des bactéries aérobies ; Applications à l'identification. In : *Activités Technologiques en Microbiologie 1*, sous la direction de Figarella J. et Leyla G., Techniques de base et Méthodologie, Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, pp 69-79,
- Scriban, R. (1988). Cas des industries de l'amidon. In: *Biotechnology*, Scriban R. coordonnateur; Technique et Documentation-Lavoisier, Troisième Edition, Paris, pp 461-468.
- Soufleros, E. & Bertrand, E.C. (1979). Role of the yeast strain in the production of volatile substances during the fermentation of grappe juice. *Connaissance Vigne et Vin* (13): 181-189.
- Tsuyoshi, N., Fudou, R., Yamanaka, S., Kozaki, M., Tamang, N., Thapa, S. & Tamang, J.P. (2004). Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amyolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 135-146.

- Tumi, S. (2018). Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices d'amylase à partir de sol saharien Algérien et cultivée sur un milieu à base de lactosérum. Thèse de Doctorat, Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbes : 129p
- Ulhaq, I., Roheena, A., Ashraf, H. & Shah, A.H. (2002). Isolation and Screening of fungi for the biosynthesis of Alpha Amylase. *Biotechnology*, 1 (2-4): 61-66.
- Walker, G.M. (2009). Yeasts. In M. Schaechter (Ed.), Desk encyclopedia of microbiology (2nd ed., pp. 1174-1187). Academic Press/Elsevier.
- Yan, S., Xiangsong, C. & Xiang, X. (2019). Improvement of the aroma of lily rice wine by using aroma-producing yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* HN006. *AMB Express*, 9(1), 89.
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0811-8>

Cite this paper as: Diakabana, P., Dzondo, G.M., Ossoko, L.P.J., Elenga, M., Ngampio, M.C., Bassoumba, C. & Mahoumi, H. (2023). Sélection et caractérisation d'isolats de levure à aptitude amylolytique provenant du malt de maïs (*Zea mays* sp.) *Journal of Food Stability*, 6 (1), 28-34.

DOI: [10.36400/J.Food.Stab.6.1.2023-0015](https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.6.1.2023-0015)