Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de camembert. I. ESSAIS PRELIMINAIRES

J. L. Schmidt, Christine Graffard, J. Lenoir, Michèle Schmidt

▶ **To cite this version:**

J. L. Schmidt, Christine Graffard, J. Lenoir, Michèle Schmidt. Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de camembert. I. ESSAIS PRELIMINAIRES. Le Lait, 1979, 59 (583_584), pp.142-163. hal-00928819

HAL Id: hal-00928819
https://hal.science/hal-00928819

Submitted on 11 May 2020

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

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

Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de camembert

I. ESSAIS PRELIMINAIRES

par

J. L. SCHMIDT, Christine GRAFFARD et J. LENOIR

(avec la collaboration technique de Michèle SCHMIDT)

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Technologie (I.N.R.A.)
Institut National Agronomique Paris-Grignon - Centre de Grignon
78850 Thiverval-Grignon

INTRODUCTION

De nombreuses espèces de levures ont été identifiées dans différents types de fromages, les bleus (Kanauchi *et al.*, 1962), le Saint-Paulin (Ducastelle et Lenoir, 1965), le Roquefort (Devoyod et Sponem, 1970), le Saint-Nectaire (Dale, 1972 ; Vergeade, 1975), le Cantal (Millet *et al.*, 1974). Une étude récente, effectuée sur des fromages de Camembert d'origine normande, nous a permis de mettre en évidence la diversité de cette flore et d'apprécier la variabilité de l'importance relative des différentes espèces selon les fabrications (Schmidt et Lenoir, 1978). On sait également que les levures sont présentes à tous les stades de l'élaboration du fromage et qu'elles se développent activement, surtout en surface, au cours des 10 premiers jours de maturation. Ces microorganismes peuvent donc participer aux transformations qui s'opèrent au cours de l'affinage ; ils peuvent notamment produire des enzymes capables de dégrader les constituants du caillé et permettre ainsi une modification de la texture de la pâte et le développement de la saveur et de l'arôme (Kosikowski et Mocquot, 1958 ; Jacquet et Lenoir, 1969).

La transformation du lactose par les levures peut s'effectuer au cours de l'égouttage et pendant les premiers jours de la maturation.

Le gaz carbonique formé est à l'origine des petites ouvertures au sein du caillé. Celles-ci peuvent être utiles ; ainsi, dans le Roquefort, elles favorisent l'implantation de *Penicillium roqueforti* (Devoyod et Sponem, 1970). En revanche, si la production de gaz est trop importante, l'ouverture devient exagérée et, à la limite, elle correspond à un accident de gonflement précoce (Galesloot, 1947). Dans le fromage de Roquefort, ce type d'accident est peu fréquent ; il semble en effet, que le développement des levures se trouve limité par l'intervention de divers facteurs physico-chimiques ou microbiens de telle sorte que la production de gaz carbonique reste assez faible (Devoyod et Sponem, 1970).

Les levures peuvent aussi transformer les produits de dégradation du lactose. Ainsi, les souches de *Hansenula anomala, Pichia membranefaciens* et *Debaryomyces subglobosus,* qui se développent à la surface du fromage de Roquefort (Devoyod et Sponem, 1970), sont capables de consommer, par voie oxydative, l'acide lactique et de provoquer une augmentation du pH qui permettra la croissance des bactéries acido-sensibles. Une telle action désacidifiante se produit également à la surface des fromages à pâte molle et à croûte lavée des types Limbourg (Kelly, 1937) et Brick (Langhus *et al.*, 1945).

Les levures peuvent participer à la dégradation des lipides par production de lipases. Sur vingt souches de levures appartenant à huit espèces différentes (*Torulopsis sphaerica, T. pinus, T. dattila, T. holmii, T. candida, Candida mycoderma, Debaryomyces kloeckeri, Rhodotorula mucilaginosa*) isolées de fromages de Taleggio, Carini et Volonterio (1969) ont relevé une activité lipolytique intracellulaire maximale à pH 8,0 et à 15° C. Carini et Lodi (1975) ont confirmé cette activité en montrant que des levures des genres *Candida, Torulopsis, Debaryomyces, Crytococcus,* isolées de divers fromages italiens, étaient capables de libérer des acides gras volatils et non volatils, qui peuvent jouer un rôle important dans la formation de la saveur et de l'arôme.

Hosono et Tokita (1970) ont isolé à partir d'un fromage de Limbourg les espèces *Candida mycoderma* et *Debaryomyces kloeckeri.* L'une et l'autre possèdent une activité lipasique de pH optimal 4,5, *Candida mycoderma* libérant plus d'acide laurique et d'acide myristique mais moins d'acide stéarique que *Debaryomyces kloeckeri.* Parmi les levures, *Candida lipolytica* est généralement reconnue comme l'espèce dotée de l'activité lipolytique la plus importante. Ajoutée au levain du fromage de Cheddar, elle permettrait de réduire la durée de l'affinage et de libérer des produits aromatiques favorables à la qualité du fromage (Forss, 1969). On peut cependant noter que, dans une étude récente, Alifax (1978) a mis en évidence, chez *Trichosporum cutaneum,* une activité lipolytique au moins aussi importante que chez *C. lipolytica.*

Les levures ne sont pas non plus sans action sur les protéines. Szumski et Cone (1962) ont observé chez des levures des genres

Trichosporon et *Debaryomyces,* isolées de fromages de type Trappiste, un pouvoir protéolytique important. Ces microorganismes produisent des protéases endocellulaires actives sur la caséine de pH optimal 5,8. Ducastelle et Lenoir (1969) ont également mis en évidence des protéases endocellulaires chez deux souches de *Kluyveromyces* et une souche de *Candida* isolées à partir du fromage de Saint-Paulin, les pH optimaux d'activité étant 6,3 pour *Candida* et 7,5 pour *Kluyveromyces.* Carini et Cabrini (1975) ont étudié l'activité caséolytique de cent vingt souches de levures isolées à partir du lait et de différents fromages ; plus de la moitié des souches possède des protéases endocellulaires et une seule souche possède une protéase exocellulaire. Tsugo et Chang (1970) ont utilisé comme levain, en association avec les bactéries lactiques, vingt souches de levures pour la fabrication de fromages à pâte pressée. Les espèces *Kluyveromyces fragilis* et *Candida pseudotropicalis* se sont révélées être les plus protéolytiques. Les souches de *Kluyveromyces fragilis* donnent les meilleurs résultats en fabrication et, après 3 semaines d'affinage, les fromages ensemencés avec cette levure contiennent davantage d'acides aminés libres que les fromages témoins. L'espèce semble produire trois protéases. Les protéases I et II ont une activité optimale à pH 9 mais elles gardent encore plus de 50 p. 100 de cette activité au pH des pâtes fromagères (5,5-6,5) ; la protéase III a son activité optimale à pH 3 et elle conserve plus de 70 p. 100 de ses capacités d'action au pH du fromage.

Par ces diverses actions, les levures doivent participer à la formation de composants d'arôme et par là, au développement des qualités organoleptiques des fromages.

Chang et Tsugo (1972) ont constaté que la présence de *Kluyveromyces fragilis* dans les fromages à pâte pressée augmente la production de composants volatils neutres, particulièrement éthanol, alcool isoamylique et acétate d'éthyle, qui sont considérés comme contribuant à la flaveur caractéristique de ces types de fromages. Devoyod et Sponem (1970) ont remarqué que les levures fermentant le lactose produisent, outre l'éthanol, de l'acétaldéhyde et des esters d'acides gras, qui concourent au développement de l'arôme du fromage de Roquefort.

Le rôle des levures dans l'affinage de certains fromages paraît donc être complexe et significatif. Il pourrait l'être particulièrement dans le cas du fromage de Camembert. Aussi, tenant compte de la diversité de la flore et des variations possibles de l'équipement enzymatique d'une espèce à l'autre, voire d'une souche à l'autre, nous a-t-il paru intéressant de procéder à une étude systématique des aptitudes biochimiques de différentes souches de levures isolées à partir de ce type de fromage. Dans une première approche il a été procédé à un essai d'identification des enzymes et à une estimation de leur niveau d'activité par la mise en œuvre d'une technique permettant une discrimination rapide.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1. Souches de levures étudiées (tab. 1)

Quatre vingt six souches appartenant à treize espèces ont été étudiées. Ces souches proviennent de trois fabrications différentes de fromage de Camembert (Schmidt et Lenoir, 1978).

Le nombre de souches retenues pour chaque espèce tient compte de son importance relative au sein de la flore levure du fromage.

Chaque souche est ensemencée sur une gélose « mycophil » Mérieux (Glucose, 10 g ; Phytone, 10 g ; Gélose, 16 g ; Eau distillée, q.s.p. 1 000 ml ; pH 7,0).

TABLEAU 1

Liste des souches éprouvées avec le système API ZYM

Espèces	Nombre de souches
Kluyveromyces lactis	15
Torulopsis sphaerica	14
Kluyveromyces fragilis	16
Candida pseudotropicalis	8
Debaryomyces hansenii	10
Torulopsis candida	1
Saccharomyces cerevisiae	10
Torulopsis versatilis	4
Candida sake	2
Saccharomyces italicus	1
Pichia bovis	1
Saccharomyces rouxii	1
Torulopsis mogii	3

2. Méthode « d'analyse enzymatique » : le système API ZYM*

2.1. Description

Le système API ZYM est une microméthode semi-quantitative de recherche d'activités enzymatiques applicable à divers milieux, tissus, cellules, liquides biologiques, micro-organismes... (Laviolette, 1977).

Le dispositif se présente sous la forme d'une galerie de vingt micro-cuves ou cupules de 9 mm de diamètre et 3 mm de hauteur dont le fond est constitué d'un support spécialement préparé contenant le substrat approprié en solution tamponnée (Tris-maléate 0,05 M pour pH 5,4 ; Tris-HCl 0,05 M pour pH 7,5 et 8,5). Les fibres du support assurent une répartition homogène des molécules insolubles ou peu solubles en milieu aqueux.

L'activité enzymatique est décelée par le développement d'une coloration.

La miniaturisation et la simplicité du dispositif permettent d'effectuer de nombreux tests en un temps court et il est possible d'étudier un nombre important de souches.

Aucune précaution d'aseptie n'est nécessaire car le temps d'incubation est limité et la charge en cellules microbiennes, inoculées par cupule, doit être importante.

La galerie utilisée permet la recherche de dix-neuf systèmes enzymatiques (tab. 2).

2.2. Mode opératoire

Une suspension de cellules de chaque souche, de densité optique 5-6 de l'échelle de Mc Farland**, est répartie à la pipette Pasteur, à raison de deux gouttes de suspension par cupule. Chaque galerie a été préalablement placée dans une boîte d'incubation contenant environ 5 ml d'eau pour empêcher la déshydratation à l'étuve. Les boîtes fermées sont mises à incuber 6 h à 37° C.

Les essais préliminaires ont montré que les meilleurs résultats étaient obtenus avec des suspensions microbiennes dans l'eau distillée.

Le choc osmotique, lors de la mise en suspension, pourrait provoquer une libération des enzymes et les mettre au contact des réactifs, (Monget, 1975).

En fin d'incubation, sont introduites, dans chaque cupule, à l'abri de la lumière directe, une goutte de réactif A (Tris hydroxyméthyl aminométhane, 250 g ; Acide chlorhydrique 37 p. 100, 110 ml ; Lauryl sulfate, 100 g ; Eau distillée, q.s.p. 1 000 ml ; pH 7,6 - 7,8) puis une goutte de réactif B (Fast Blue B.B. Sigma, 3,5 g ; 2-Méthoxy éthanol, q.s.p. 1 000 ml). Ces réactifs amènent le pH à 7,8 et libèrent du sup-

* API System : La Balme-les-Grottes - 38390 Montalieu-Vercieu (France).

** cf. p. 147 et 148.

TABLEAU 2. — La galerie API ZYM

N°	Enzyme recherchée	Substrat
1	Témoin	
2	Phosphatase alcaline	2-naphtyl phosphate (pH : 8,5)
3	Estérase (C 4)	2-naphtyl butyrate
4	Estérase Lipase (C 8)	2-naphtyl caprylate
5	Lipase (C 14)	2-naphtyl myristate
6	Leucine aminopeptidase	L-Leucyl-2-naphtylamide
7	Valine aminopeptidase	L-valyl-2-naphtylamide
8	Cystine aminopeptidase	L-cystyl-2-naphtylamide
9	Trypsine	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide
10	Chymotrypsine	N-benzoyl-DL-phenyl-alanine-2-naphtylamide
11	Phosphatase acide	2-naphtyl phosphate (pH : 5,4)
12	Phosphoamidase	Naphtol-AS-BI-phosphodiamide
13	α galactosidase	6-Br-2-naphtyl-αD-galactopyranoside
14	β galactosidase	2-naphtyl-βD-galactopyranoside
15	β glucuronidase	Naphtol-AS-BI-βD-glucuronate
16	α glucosidase	2-naphtyl-αD-glucopyranoside
17	β glucosidase	6-Br-2-naphtyl-βD-glucopyranoside
18	β glucosaminidase	1-naphtyl-N-acetyl-βD-glucosaminide
19	α mannosidase	6-Br-2-naphtyl-αD-mannopyranoside
20	α fucosidase	2-napthyl-αL-fucopyranoside

port le produit de la réaction (naphtol ou dérivé) ; en outre, ils solubilisent le complexe azoïque et renforcent les colorations.

Les colorations sont laissées se développer pendant 5 mn, puis les galeries sont exposées pendant environ 10 s au rayonnement d'une lampe très puissante, (1 000 watts) pour éliminer l'excès de Fast Blue B.B. qui n'a pas réagi et rendre ainsi les réactions négatives incolores.

Les lectures sont effectuées à l'aide de la gamme de coloration API et les résultats notés de 0 (réaction négative) à 5 (réaction d'intensité maximale).

2.3. Reproductibilité des résultats

Des essais de reproductibilité ont été réalisés à partir de plusieurs subcultures de souches de levures d'espèces différentes, ces cultures étant chacune éprouvée sur galerie API ZYM. Dans tous les cas, la reproductibilité des résultats s'est avérée satisfaisante (tab. 3).

Préparation de l'échelle étalon de Mc Farland

L'échelle de Mc Farland est préparée en introduisant différentes quantités de chlorure de baryum à 1 p. 100 et d'acide sulfurique à

TABLEAU 3

Reproductibilité des résultats (résultats notés de 0 à 5)

N°	Enzyme recherchée	Notes moyennes et intervalles de variation	
1	Témoin	0	
2	Phosphatase alcaline	4	(4 - 4)
3	Estérase (C 4)	5	
4	Estérase Lipase (C 8)	3,8	(3 - 4)
5	Lipase (C 14)	0	
6	Leucine aminopeptidase	5	
7	Valine aminopeptidase	2,8	(2 - 3)
8	Cystine aminopeptidase	1,2	(1 - 2)
9	Trypsine	0	
10	Chymotrypsine	0	
11	Phosphatase acide	5	
12	Phosphoamidase	3,7	(3 - 4)
13	α galactosidase	0	
14	β galactosidase	5	
15	β glucuronidase	0	
16	α glucosidase	0	
17	β glucosidase	2,75	(1,5 - 3)
18	β glucosaminidase	0	
19	α mannosidase,	0	
20	α fucosidase	0	

1 p. 100 dans 10 tubes à essai de diamètre uniforme. Le tube 1 reçoit 0,1 ml de la solution de chlorure de baryum, le tube n° 2, 0,2 ml..., le tube n° 10, 1 ml. Le volume, dans chaque tube, est amené à 10 ml par addition d'acide sulfurique. Les tubes, avant emploi, sont agités et la suspension microbienne à mesurer est placée dans un tube de même diamètre pour faire la comparaison.

RESULTATS

Les résultats concernant les différentes espèces éprouvées sont présentés dans les tableaux 4 à 12 et les histogrammes (fig. 1 à 6).

Dans ces tableaux, les résultats sont notés de 0 à 5 ; les activités non mentionnées sont nulles, les chiffres des moyennes et des écarts-types sont arrondis à la décimale la plus proche.

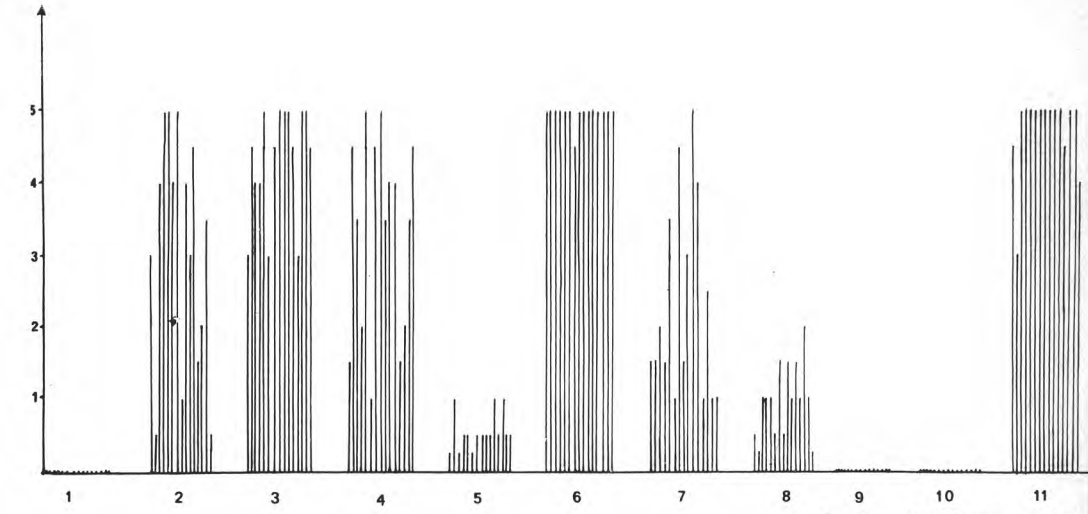


fig. 1. — Profil enzymatiqu

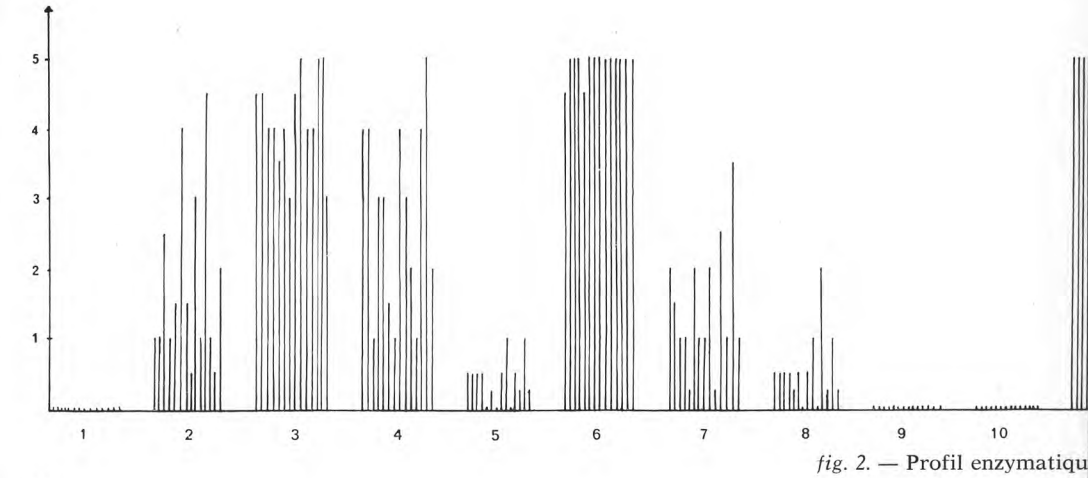


fig. 2. — Profil enzymatiqu

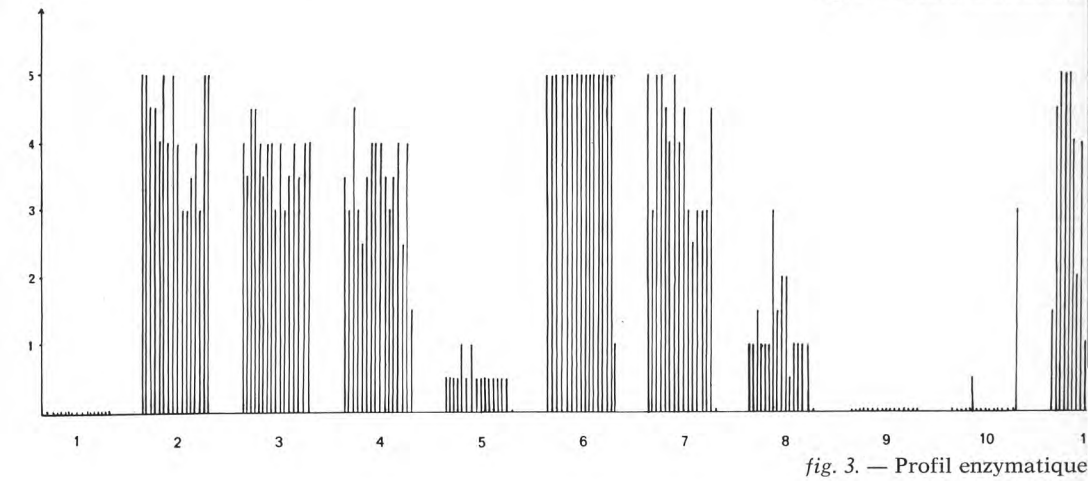
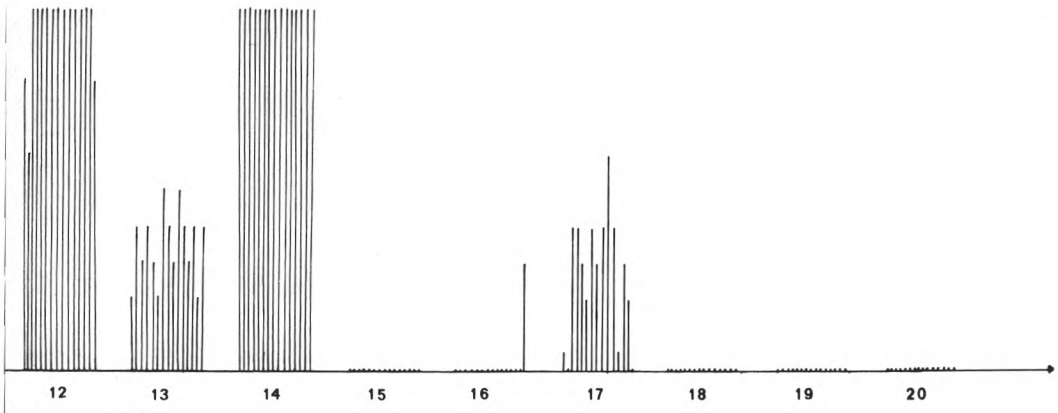
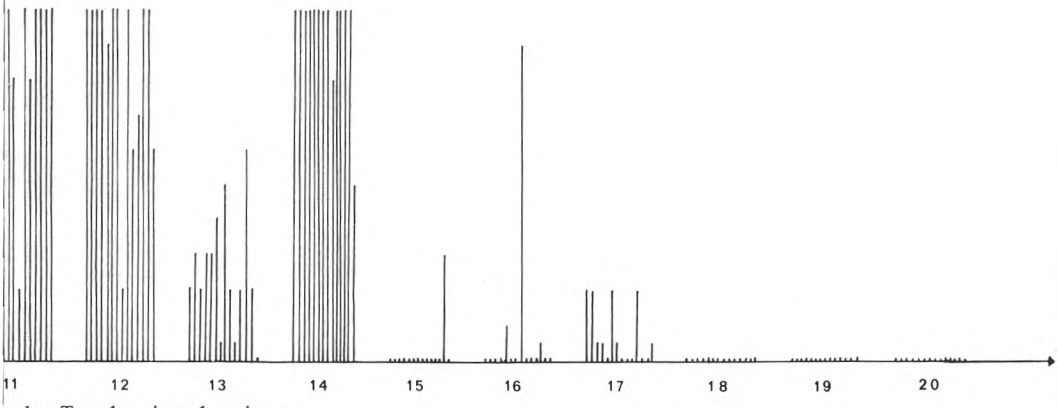


fig. 3. — Profil enzymatique

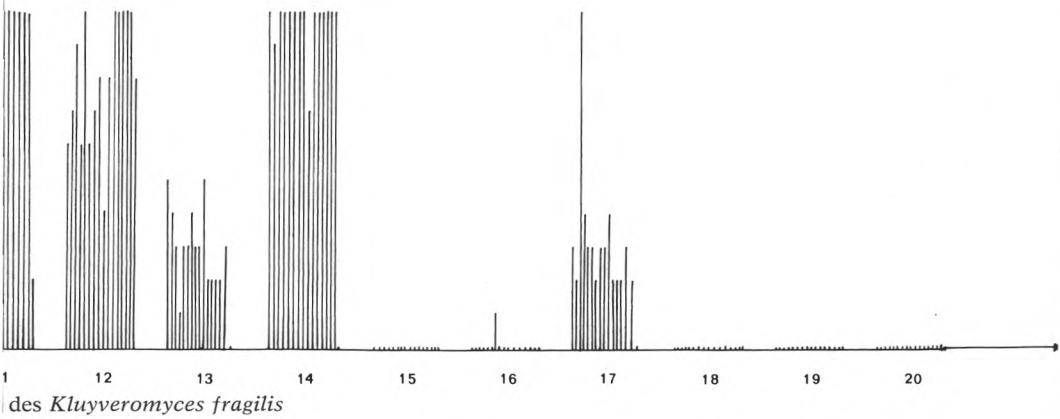
1 : Témoin.
2 : Phosphatase alcaline.
3 : Estérase.
4 : Estérase lipase.
5 : Lipase.
6 : Leucine aminopeptidase.
7 : Valine aminopeptidase.
8 : Cystine aminopeptidase.
9 : Trypsine.
10 : Chymotr
11 : Phosphat
12 : Phospho



des *Kluyveromyces lactis*



e des *Torulopsis sphaerica*



des *Kluyveromyces fragilis*

ypsine.
ase acide.
midase.

13 : α galactosidase.
14 : β galactosidase.
15 : β glucuronidase.

16 : α glucosidase.
17 : β glucosidase.
18 : β glucosaminidase.

19 : α mannosidase.
20 : α fucosidase.

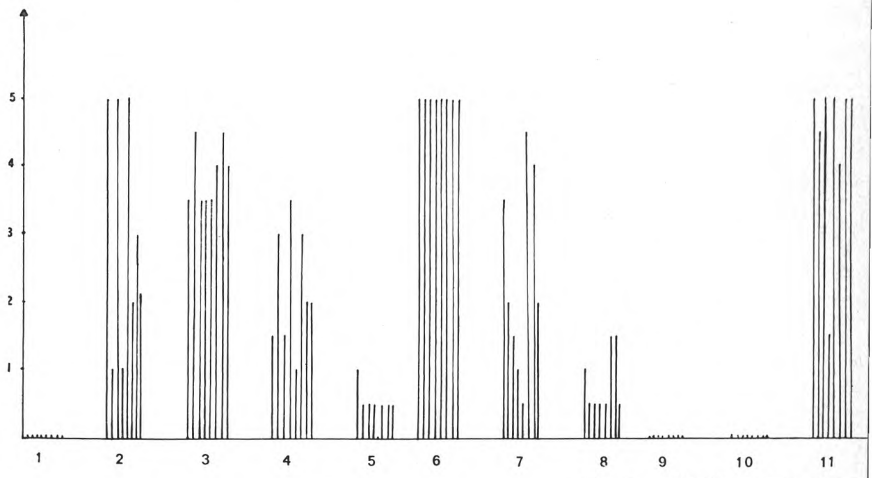


fig. 4. — Profil enzymatique

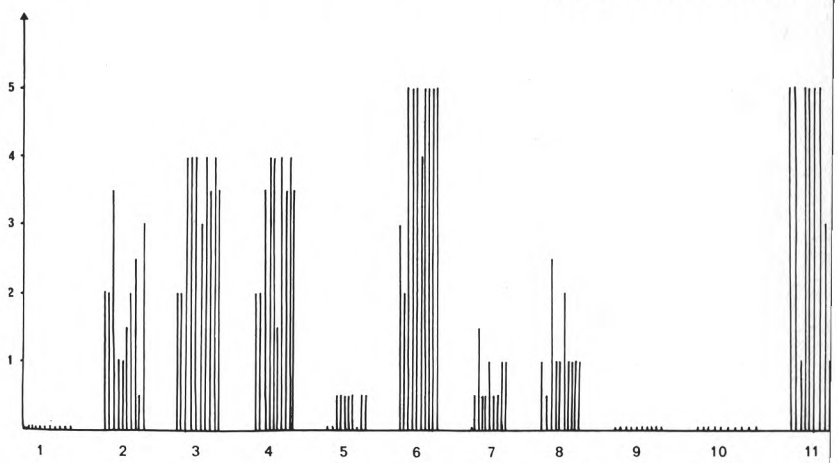


fig. 5. — Profil enzymatiqu

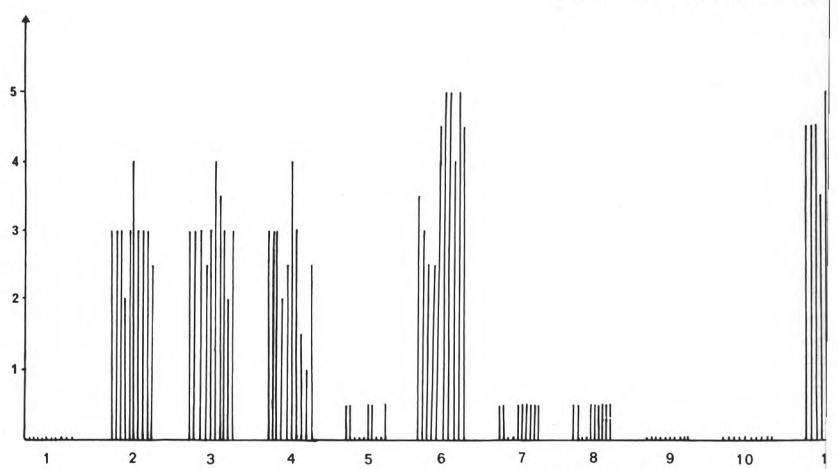
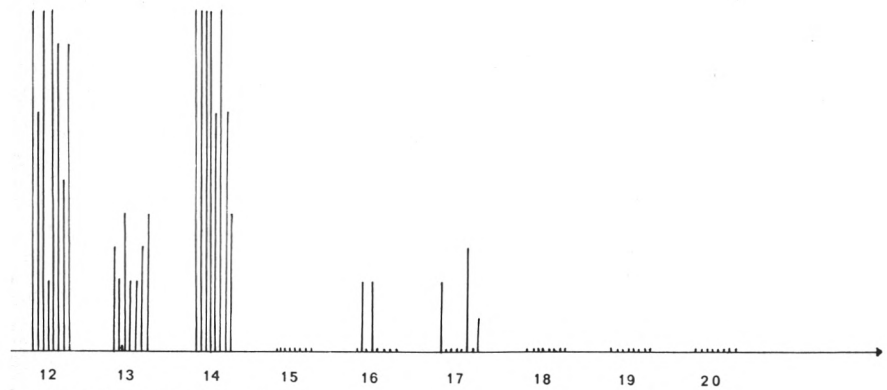
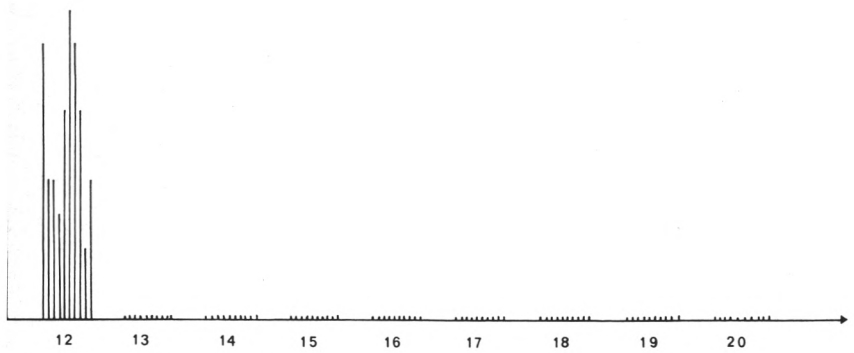


fig. 6. — Profil enzymatique

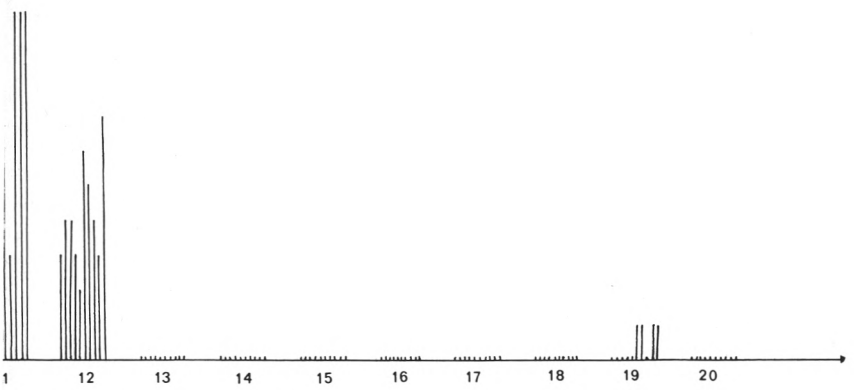
1 : Témoin.
2 : Phosphatase alcaline.
3 : Estérase.
4 : Estérase lipase.
5 : Lipase.
6 : Leucine aminopeptidase.
7 : Valine aminopeptidase.
8 : Cystine aminopeptidase.
9 : T
10 : C
11 : P
12 : P



des *Candida pseudotropicalis*



des *Debaryomyces hansenii*



des *Saccharomyces cerevisiae*

rypsine.
hymotrypsine.
hosphatase acide.
hosphoamidase.

13 : α galactosidase.
14 : β galactosidase.
15 : β glucuronidase.
16 : α glucosidase.

17 : β glucosidase.
18 : β glucosaminidase.
19 : α mannosidase.
20 : α fucosidase.

1. Etude de Kluyveromyces lactis et Torulopsis sphaerica

Chez *Kluyveromyces lactis*, les coefficients de variation de certaines activités enzymatiques entre les différentes souches sont très importants (tab. 4). Il en est ainsi notamment pour la phosphatase alcaline (53 p. 100), l'estérase lipase (41 p. 100), la lipase (35 p. 100), la valine aminopeptidase (57 p. 100), la cystine aminopeptidase (45 p. 100), l'α galactosidase (29 p. 100), la β glucosidase (62 p. 100). Avec les autres systèmes enzymatiques, on trouve, d'une souche à l'autre, des résultats en assez bonne concordance, les coefficients de variation présentant des valeurs comprises entre 0 et 18 p. 100. Ces différences sont illustrées sur l'histogramme de la figure 1.

En ce qui concerne la forme imparfaite, *Torulopsis sphaerica*, la variabilité mentionnée pour quelques enzymes chez *Kluyveromyces lactis* se retrouve souvent à un seuil encore plus élevé (tab. 5), exemples la lipase (69 p. 100), la cystine aminopeptidase (82 p. 100), l'α galactosidase (63 p. 100) et la β glucosidase (80 p. 100). Ces différences sont représentées sur la figure 2. Les profils enzymatiques des deux espèces restent cependant très proches bien que l'on observe chez la forme non sporogène, une faible diminution des activités phosphatase alcaline, valine aminopeptidase et β glucosidase. Il est également à noter qu'une souche de *Torulopsis sphaerica* présente des niveaux d'activité phosphatase acide et α glucosidase qui la distinguent nettement des autres souches. Cette souche correspond cependant parfaitement à l'espèce type décrite par Lodder (1971).

2. Etude de Kluyveromyces fragilis et Candida pseudotropicalis

Les souches de *Kluyveromyces fragilis* étudiées présentent des variations d'activité voisines de celles enregistrées chez *Kluyveromyces lactis* (tab. 6). On retrouve, en effet, des coefficients de variation importants pour la lipase (31 p. 100), la cystine aminopeptidase (48 p. 100), la phosphatase acide (34 p. 100), l'α galactosidase (38 p. 100) et la β glucosidase (63 p. 100), les autres systèmes enzymatiques présentant une variabilité comprise entre 0 et 25 p. 100.

L'histogramme qui concrétise ces résultats (fig. 3), montre que la souche qui, pour chaque caractère est représentée la dernière, possède un équipement enzymatique très différent de celui des autres souches. Il en est ainsi, notamment pour les activités lipasique, valine aminopeptidase, cystine aminopeptidase, α galactosidase et β glucosidase qui sont nulles alors que l'activité chymotrypsine semble particulièrement élevée. Cette souche présente bien cependant les caractères de l'espèce type *Kluyveromyces fragilis* décrite par Lodder (1971).

Chez *Candida pseudotropicalis* (tab. 7), on rencontre également une variabilité importante, plus élevée que chez *Kluyveromyces fragilis* ; ceci est particulièrement net pour les activités estérase (59 p. 100), estérase lipase (40 p. 100), lipase (53 p. 100), valine aminopeptidase (61 p. 100), α galactosidase (59 p. 100) et β galactosidase (27 p. 100). L'histogramme de la figure 4 illustre les différences observées sur les différentes souches.

TABLEAU 4

Equipement enzymatique des souches de *Kluyveromyces lactis* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation en p. 100	Moyenne probable t (95 p. 100)
Phosphatase alcaline	3,1	1,6	53	2,15 - 4,05
Estérase (C 4)	4,3	0,8	18	3,88 - 4,78
Estérase Lipase (C 8)	3,3	1,8	41	2,53 - 4,13
Lipase (C 14)	0,6	0,2	35	0,47 - 0,73
Leucine aminopeptidase	5,0	0,1	3	4,91 - 5,00
Valine aminopeptidase	2,5	1,4	57	1,71 - 3,35
Cystine aminopeptidase	1,0	0,5	46	0,74 - 1,26
Phosphatase acide	4,7	0,6	12	4,41 - 5,00
Phosphoamidase	4,7	0,6	12	4,39 - 5,00
α galactosidase	1,7	0,5	29	1,45 - 2,01
β galactosidase	5	0	0	5,00
α glucosidase	0,1	0,4		
β glucosidase	1,4	0,8	62	0,88 - 1,86

TABLEAU 5

Equipement enzymatique des souches de *Torulopsis sphaerica* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation en p. 100	Moyenne probable t (95 p. 100)
Phosphatase alcaline	1,9	1,3	67	1,09 - 2,67
Estérase (C 4)	4,1	0,6	15	3,75 - 4,55
Estérase Lipase (C 8)	2,6	1,3	51	1,81 - 3,49
Lipase (C 14)	0,5	0,3	69	0,26 - 0,66
Leucine aminopeptidase	4,9	0,2	4	4,80 - 5,00
Valine aminopeptidase	1,5	0,9	58	0,95 - 2,05
Cystine aminopeptidase	0,6	0,5	82	0,30 - 0,94
Phosphatase acide	4,8	0,4	8	4,61 - 5,00
Phosphoamidase	4,5	0,8	18	4,04 - 5,00
α galactosidase	1,2	0,7	63	0,72 - 1,66
β galactosidase	4,7	0,7	15	4,27 - 5,00
β glucuronidase	0,1	0,5		
α glucosidase	0,1	0,2		
β glucosidase	0,5	0,4	80	0,27 - 0,80

TABLEAU 6

Equipement enzymatique des souches de *Kluyveromyces fragilis* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation en p. 100	Moyenne probable t (95 p. 100)
Phosphatase alcaline	4,2	0,8	19	3,73 - 4,61
Estérase (C 4)	3,8	0,5	12	3,54 - 4,06
Estérase Lipase (C 8)	3,5	0,6	17	3,16 - 3,84
Lipase (C 14)	0,6	0,2	31	0,47 - 0,67
Leucine aminopeptidase	5,0	0	0	5,00
Valine aminopeptidase	3,9	0,9	23	3,40 - 4,46
Cystine aminopeptidase	1,3	0,6	48	0,94 - 1,66
Chymotrypsine	0	0,1		
Phosphatase acide	4,1	1,4	34	3,31 - 4,95
Phosphoamidase	4,0	1,0	25	3,46 - 4,60
α galactosidase	1,5	0,6	38	1,17 - 1,83
β galactosidase	4,9	0,4	8	4,64 - 5,00
α glucosidase	0	0,1		
β glucosidase	1,6	1,0	63	1,03 - 2,17

TABLEAU 7

Equipement enzymatique des souches de *Candida pseudotropicalis* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation en p. 100	Moyenne probable t (95 p. 100)
Phosphatase alcaline	3,0	1,8	59	1,42 - 4,53
Estérase (C 4)	3,9	0,4	11	3,49 - 4,27
Estérase Lipase (C 8)	2,2	0,9	40	1,40 - 2,97
Lipase (C 14)	0,5	0,3	53	0,26 - 0,74
Leucine aminopeptidase	5,0	0	0	5,00
Valine aminopeptidase	2,4	1,5	61	1,08 - 3,68
Cystine aminopeptidase	0,8	0,5	56	0,40 - 1,22
Phosphatase acide	4,4	1,2	28	3,30 - 5,00
Phosphoamidase	3,9	1,5	38	2,58 - 5,00
α galactosidase	1,2	0,7	59	0,56 - 1,82
β galactosidase	4,2	1,1	27	3,24 - 5,00
β glucosidase	0,2	0,5		
α glucosidase	0,6	0,7		

3. Etude de Torulopsis versatilis

Avec les quatre souches de *Torulopsis versatilis éprouvées* (tab. 8), il apparaît que l'on peut distinguer deux types de comportement ; d'une part, les souches présentant des activités estérase, leucine aminopeptidase et phosphatase acide fortes et une activité phosphoamidase moyenne ; de l'autre, les souches présentant ces activités à des niveaux faibles.

4. Etude de Debaryomyces hansenii et Torulopsis candida

Le tableau 9 montre que chez *D. hansenii* il existe aussi une grande variabilité dans les activités enzymatiques. Neuf systèmes ont été mis en évidence, mais sept d'entre-eux ont un coefficient de variation compris entre 30 et 70 p. 100. Seules, deux activités sont, d'une souche à l'autre, relativement stables, l'estérase et la leucine aminopeptidase, avec un coefficient de variation de 24 p. 100. L'espèce ne possède aucune activité osidasique, ce qui la différencie nettement des *Kluyveromyces* et de leurs formes imparfaites. On peut également noter que l'activité valine aminopeptidase est, en moyenne, plus faible (fig. 5) que celle observée chez les *Kluyveromyces.*

La souche de *Torulopsis candida* a un profil enzymatique (tab. 12) qui se rapproche de celui de sa forme sporulée (*D. hansenii*) ; cependant, les activités phosphatase alcaline et phosphoamidase sont plus marquées chez la forme non sporogène.

5. Etude de Saccharomyces cerevisiae

Sur les dix souches de *S. cerevisiae* éprouvées (tab. 10) les variations des activités enzymatiques sont, pour certaines, importantes mais cependant plus faibles que chez *D. hansenii.* Les coefficients de variation les plus forts sont trouvés sur les activités estérase lipase (34 p. 100), valine aminopeptidase (53 p. 100), cystine aminopeptidase (53 p. 100) et phosphoamidase (37 p. 100).

Le profil enzymatique de l'espèce (fig. 6) présente une assez grande analogie avec celui de *D. hansenii.* On retrouve, en effet, chez les deux espèces, le même équipement enzymatique, et cet équipement paraît se manifester avec la même intensité, exceptions faites toutefois pour les activités valine aminopeptidase et cystine aminopeptidase qui sont un peu plus faibles chez *S. cerevisiae.*

6. Etude de Saccharomyces rouxii et de Torulopsis moggi

Les activités osidasiques des souches étudiées sont faibles ou nulles (tab. 11) et on relève également l'absence d'activité aminopeptidase. Par ailleurs, les profils enzymatiques des souches sont très proches si l'on excepte le cas d'une souche de *T. moggi* qui possède une activité phosphatase acide élevée, ces profils présentant une certaine similitude avec ceux de *S. cerevisiae* (tab. 10 et fig. 6).

TABLEAU 8

Equipement enzymatique des souches de *Torulopsis versatilis* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Souches			
	45_5	21_8	18_6	38_3
Phosphatase alcaline	1	1,5	2	2
Estérase (C 4)	3	2	4	4
Estérase Lipase (C 8)	1,5	2	2	2
Leucine aminopeptidase	1,5	2,5	5	4
Valine aminopeptidase	0	0	0,5	0
Cystine aminopeptidase	0,5	0	0,5	1
Phosphatase acide	1	1	5	5
Phosphoamidase	1	1	2,5	4

TABLEAU 9

Equipement enzymatique des souches de *Debaryomyces hansenii* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation en p. 100	Moyenne probable t (95 p. 100)
Phosphatase alcaline	1,9	0,9	49	1,20 - 2,60
Estérase (C 4)	3,4	0,8	24	2,79 - 4,01
Estérase Lipase (C 8)	3,2	1,0	31	2,47 - 3,93
Lipase (C 14)	0,3	0,2	69	0,17 - 0,53
Leucine aminopeptidase	4,4	1,1	24	3,59 - 5,00
Valine aminopeptidase	0,7	0,4	60	0,38 - 1,02
Cystine aminopeptidase	1,2	0,6	49	0,76 - 1,64
Phosphatase acide	4,0	1,7	42	2,73 - 5,00
Phosphoamidase	2,7	1,2	44	1,81 - 3,59

TABLEAU 10

Equipement enzymatique des souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation en p. 100	Moyenne probable t (95 p. 100)
Phosphatase alcaline	2,9	0,5	17	2,58 - 3,32
Estérase (C 4)	3,0	0,5	18	2,60 - 3,40
Estérase Lipase (C 8)	2,5	0,9	34	1,90 - 3,20
Lipase (C 14)	0,2	0,3		
Leucine aminopeptidase	3,9	1,0	26	3,19 - 4,71
Valine aminopeptidase	0,4	0,2	53	0,24 - 0,56
Cystine aminopeptidase	0,4	0,2	53	0,24 - 0,56
Phosphatase acide	4,3	1,1	25	3,52 - 5,00
Phosphoamidase	2,0	0,8	37	1,48 - 2,62
α mannosidase	0,2	0,3		

TABLEAU 11

Equipement enzymatique des souches de *Saccharomyces rouxii* et *Torulopsis moogi* isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Souches			
	Sacch. rouxii	*Torulopsis mogii*		
	29_6	27_8	31_6	31_3
Phosphatase alcaline	3,5	3	3,5	4
Estérase (C 14)	2,5	3	2	1,5
Estérase Lipase (C 8)	2	2	2	1,5
Lipase (C 14)	0,5	0	0	0
Leucine aminopeptidase	2,5	3	3,5	3,5
Cystine aminopeptidase	0	0	1	0,5
Phosphatase acide	2,5	2	2	4,5
Phosphoamidase	1	1	1	1
β glucosidase	0	0	0	0,5
β glucosaminidase	0	0,5	0	0
α fucosidase	1	0,5	0	0

TABLEAU 12

Equipement enzymatique de diverses espèces de levures isolées à partir du fromage de Camembert

Enzymes	Espèces				
	Torulopsis candida	*Pichia bovis*	*Saccharomyces italicus*	*Candida sake*	
				1	2
Phosphatase alcaline	5	1	3	1	1
Estérase (C 4)	4	5	2,5	2	3,5
Estérase Lipase (C 8)	4	3	2	1	3,5
Lipase (C 14)	0,5	0,5	0	0	0,5
Leucine aminopeptidase	5	5	5	1	5
Valine aminopeptidase	1	1,5	0	0,5	0,5
Cystine aminopeptidase	1	1,5	0,5	0,5	1
Phosphatase acide	5	4,5	5	0,5	5
Phosphoamidase	5	5	2,5	0,5	3

7. Etude des espèces mineures (P. bovis, S. italicus, C. Sake) (tab. 12)

Chez ces espèces, il n'a pas été décelé d'activité osidasique.

L'espèce *Pichia bovis* paraît avoir des activités estérase, leucine aminopeptidase, phosphoamidase et phosphatase acide élevées (4,5 à 5), une activité estérase-lipase moyenne (3) et des activités phosphatase alcaline, lipase, valine aminopeptidase, cystine aminopeptidase faibles (0,5 à 1,5).

La souche de *Saccharomyces italicus* a des caractères enzymatiques très proches de ceux de *S. cerevisiae ;* les activités leucine aminopeptidase et phosphatase acide sont fortes (5), les activités phosphatase alcaline, estérase, estérase lipase et phosphoamidase étant moyennes (2 à 3). On peut rappeler que *S. italicus* est considérée par Lodder (1971) comme très proche de *S. cerevisiae :* il s'en distingue essentiellement par l'absence de fermentation du raffinose.

Les deux souches de *Candida sake* éprouvées présentent des profils enzymatiques d'allure sensiblement différente ; ces deux souches correspondent pourtant l'une et l'autre à l'espèce type décrite par Lodder (1971).

DISCUSSION

Nous n'avons pas détecté d'activité osidasique chez *D. hansenii, S. cerevisiae, T. versatilis, T. candida, P. bovis, S. italicus, C. sake* et *T. mogii ;* par ailleurs, aucune activité β glucuronidase, β glucosaminidase, α mannosidase, α fucosidase n'a été décelée chez *Kl. lactis, Kl. fragilis* ou leurs formes imparfaites. Cependant, il a déjà été montré que *P. bovis, D. hansenii* possédaient des systèmes α glucosidase et β glucosidase (Fiol, 1973) ; mais, ces systèmes étant inductibles, ils peuvent être plus ou moins sensibles à la répression exercée par le glucose sur les synthèses enzymatiques. Or, le milieu de culture utilisé (gélose « mycophil » Mérieux) contient du glucose ce qui peut expliquer la faible production de β glucosidase chez la plupart des souches de *Kl. lactis, Kl. fragilis* ou leurs formes imparfaites éprouvées.

Les activités endopeptidasiques de type trypsine ou chymotrypsine sont absentes ou rares chez les différentes espèces étudiées ; elles n'ont été observées que chez deux souches de *Kl. fragilis.* Cependant, Tsugo et Chang (1970), étudiant plusieurs espèces de levures, avaient mis en évidence, chez *Kl. fragilis* et *C. pseudotropicalis,* une activité protéolytique importante. Plus récemment, Yamauchi *et al.* (1976) ont montré que l'espèce *D. hansenii* possède une activité protéolytique faible, sauf si elle est développée en association avec des souches judicieusement choisies de *Streptococcus cremoris* ou de *Streptococcus lactis ;* elle peut alors, dans ces conditions, jouer un rôle important au cours de l'affinage de certains fromages.

Du fait de la diversité des activités de type endopeptidasique, il apparaît donc nécessaire de vérifier, sur un nombre de substrats et de souches plus important, la présence de ces activités.

Les activités exopeptidasiques de type aminopeptidases sont présentes chez la plupart des espèces mais à des niveaux qui paraissent être sensiblement différents. Elles ont déjà fait l'objet d'un certain nombre d'études, notamment chez *S. lactis* (*Kluyveromyces lactis*) où elles ont été partiellement caractérisées (Desmazeaud et Devoyod, 1974).

L'activité leucine aminopeptidase est maximale sur toutes les souches, exception faite de deux souches de *T. versatilis.* Quant aux autres activités, valine et cystine aminopeptidases, elles apparaissent très inégalement réparties au sein des différentes espèces. Elles sont, en général, faibles ou nulles chez *S. cerevisiae, T. candida, P. bovis, S. italicus, C. sake, T. versatilis, T. mogii,* et rarement aussi importantes que l'activité leucine aminopeptidase chez les autres espèces étudiées.

En ce qui concerne les activités lipasiques et estérasiques, on observe une distribution voisine chez toutes les souches éprouvées. L'activité estérase est forte et, dans l'ensemble, peu variable ; l'activité estérase lipase est légèrement moins développée et l'activité lipa-

sique est faible ou inexistante. On notera, cependant, que des essais d'incubation des dispositifs API ZYM pendant 12 h à 37° C ont permis de révéler, sur quelques souches, une activité lipasique relativement importante. Rappelons également, que dans d'autres conditions expérimentales, Carini et Lodi (1975) ont mis en évidence, sur des souches de *Candida, Torulopsis* et *Debaryomyces* des activités lipolytiques appréciables.

Parmi un certain nombre d'hypothèses envisageables pour expliquer le faible niveau d'activité enregistré en 6 h, on peut penser qu'avec le temps d'incubation de 12 h, il y a autolyse des cellules et libération d'un système lipolytique endocellulaire, ou bien encore qu'il y a dégradation spontanée du substrat au contact de protéines cellulaires (Brandl et Zizer, 1973).

Les phosphomonoestérases, phosphatases acides et phosphatases alcalines, comptent parmi les enzymes les plus connues et les plus répandues chez les êtres vivants (Brisou, 1971). Elles ont déjà été mises en évidence chez un certain nombre de bactéries et de levures, notamment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Pett et Wynne, 1938).

D'après nos résultats, il apparaît que les deux activités phosphatasiques sont largement représentées chez la plupart des souches de levures éprouvées. Chez *Kluyveromyces sp., S. cerevisiae* ou *S. rouxii* et *D. hansenii* (ou chez leurs formes imparfaites), l'activité phosphatase alcaline est variable selon les souches mais elle est toujours présente à un seuil élevé. En revanche, chez *T. versatilis, C. sake* et *P. bovis,* cette activité semble plus limitée ; mais, le petit nombre de souches éprouvées sur ces dernières espèces ne permet pas de tirer des conclusions définitives.

En ce qui concerne la phosphatase acide, on observe également une activité bien développée chez *Kluyveromyces* sp. (notamment *Kl. lactis*), *Debaryomyces* sp. et *S. cerevisiae* ou *S. rouxii,* et moins élevée chez certains *T. versatilis* ou *C. sake.*

Une autre activité se traduisant par la libération d'acide phosphorique a été étudiée, la phosphoamidase. Cette enzyme, selon la Nomenclature Internationale (1972), agit sur la N-phosphocréatine et sur d'autres phosphoamides. Cette activité paraît être particulièrement développée chez *Kluyveromyces* et leurs formes imparfaites, ainsi que chez *T. candida* et *P. bovis ;* elle est moyenne et surtout très variable chez *D. hansenii* et *S. cerevisiae.* Chez *T. versatilis* et *C. sake,* l'activité phosphoamidase est extrêmement variable selon les souches et elle devient difficilement quantifiable.

Enfin, il est intéressant de souligner ici qu'une certaine analogie apparaît entre les profils enzymatiques de *D. hansenii* et de *S. cerevisiae.* Il convient, à ce propos, de remarquer que dans l'identification de ces espèces, on se heurte souvent à certaines difficultés pour classer les souches dans l'un ou l'autre groupe (Luu, 1976). En effet, le genre *Debaryomyces* se distingue du genre *Saccharomyces* par l'exis-

tence de spores sphériques verruqueuses reconnaissables parfois seulement au microscope électronique et par des capacités fermentaires réduites. Ces deux critères d'identification restent cependant, dans certains cas, difficiles à appliquer (Barnett, 1968). Il était donc intéressant de mieux connaître l'équipement enzymatique des deux groupes afin de pouvoir éventuellement les distinguer. L'allure des profils confirme clairement que *D. hansenii* et *S. cerevisiae* sont deux espèces de levures très proches.

Conclusion - Résumé

La méthode employée pour l'étude des aptitudes biochimiques des levures du fromage de Camembert est une microméthode normalisée permettant une analyse des activités enzymatiques (Buissière et Nardon, 1968). Le dispositif analytique comporte pour chacun des caractères étudiés, un système constitué par la source d'enzymes qui est la souche microbienne et le substrat approprié, chimiquement pur. Il permet une étude systématique d'un grand nombre de caractères en soumettant les différentes souches aux mêmes épreuves et, lorsque les conditions expérimentales sont normalisées, une comparaison des résultats peut être effectuée.

La présente étude, portant sur dix-neuf caractères, concerne quatre-vingt-six souches appartenant à treize espèces.

L'ensemble des résultats obtenus se traduit, pour chaque espèce, par un profil enzymatique. On peut avoir ainsi une connaissance visuelle immédiate des activités et situer les souches ou les espèces les unes par rapport aux autres.

La comparaison des profils met clairement en évidence la parenté existant entre *Kl. fragilis* et *Kl. lactis* (et leurs formes imparfaites). Un tel résultat s'accorde avec les observations de Fiol (1973) qui considère comme plausible une évolution de l'espèce *Kl. fragilis* vers *Kl. lactis* par augmentation des possibilités osidasiques. La même analogie est également observée entre *D. hansenii* et *S. cerevisiae* qui sont deux espèces très proches.

Il apparaît, finalement, qu'étant donné le niveau enregistré chez toutes les espèces pour les activités estérasiques et aminopeptidasiques, activités qui peuvent jouer un rôle important dans l'affinage, il serait intéressant de procéder à une étude plus approfondie de ces caractères chez les espèces de levures dominantes du fromage de Camembert.

Summary

A standardized micro-method (Buissière and Nardon, 1968) has been used for testing the biochemical aptitudes of yeasts from Camembert cheese. The analytical apparatus presented, for each

character, a system constituted by the microbial strain as an enzymatic productor and the chemically pure corresponding substrate. This procedure brought a systematic study of a large number of characteristics by submitting different strains to the same tests, and as the experimental conditions were standardized, a comparison of the results could be done.

In the present study were tested 19 enzymatic characters on 86 strains belonging to 13 species.

The results were presented in an enzymatic pattern of each species. So, it has been possible to get an immédiate knowledge of the activities and to classify them.

The comparison of the patterns shows the very relationship between *Kl. fragilis* and *Kl. lactis* (and their imperfect forms). Such a result agree with the observation of Fiol (1973) who considered as possible, the evolution of *Kl. fragilis* species towards *Kl. lactis* through the increasing of the osidasic abilities. The same result was also noticed between *D. hansenii* and *S. cerevisiae* which are very closed species.

Considering the important part of the esterasic and aminopeptidasic activities in the cheese ripening and the noticed levels of these enzymes in this paper, it would be interesting to study more completely the main dominant species of yeasts from Camembert cheese.

Reçu pour publication en janvier 1979.

Bibliographie

ALIFAX (R.) (1978). — Communication personnelle.

BARNETT (J. A.) (1968). — Biochemical differentiation of taxa. In the Fungi. An advanced treatise. Vol. 3, 557, Ainsworth G. C. and Sussman A. S. Academic Press Inc., New York.

BRANDL (E.) und ZIZER (T.) (1973). — Uber die Spaltung aromatischer Ester durch Prëparate von Mikroorganismen mit lipolytischer und proteolytischer Aktivität. *Ost Milchw., 28,* (12), 15.

BRISOU (J.) (1971). — Techniques d'enzymologie bactérienne. Masson et Cie éd., Paris.

BUISSIÈRE (J.) et NARDON (P.) (1968). — Microméthode d'identification des bactéries : intérêt de la quantification des caractères biochimiques. *Ann. Inst. Pasteur, 115,* 218.

CARINI (S.) and VOLONTERIO (G.) (1969). — Lipolytic activity of yeasts from cheese. *Scienza tech. Latt. casear., 20,* (6), 339.

CARINI (S.) e LODI (R.) (1975). — L'attivita lipolitica dei lieviti nella maturazione dei prodotti lattiero-caseari. *L'industria del Latte, 11,* (3-4), 3.

CARINI (S.) and CABRINI (A.) (1975). — Caseolytic exo- and endocellular systems of yeasts: their role in the ripening of cheeses. *Latte, Mar.,* 153.

CHANG (J. E.) and TSUGO (T.) (1972). — Studies on cheese ripened mainly with yeast. II. Proteolytic activity of *Saccharomyces fragilis. Jap. J. Zootech. Sci., 43,* 193.

DALE (G.) (1972). — Moisissures et levures de la flore du fromage de Saint-Nectaire. *Rev. Lait. Frse, 296,* 199.

DESMAZEAUD (M.) et DEVOYOD (J. J.) (1974). — Mise en évidence et caractérisation partielle de différentes peptidases chez *S. lactis. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 14,* 327.

DEVOYOD (J. J.) et SPONEM (M.) (1970). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Le Lait, 498,* 524.

DHERBOMEZ (M.) (1975). — Contribution à l'étude de la lipase de *Candida lipolytica. Rev. Fr. Corps Gras, 22,* (3), 147.

DUCASTELLE (A.) et LENOIR (J.) (1969). — Etude de la flore microbienne du fromage de Saint-Paulin. III. Son activité protéolytique. *Le Lait, 489-490,* 615.

ENZYME NOMENCLATURE (1972). — Commission on biochemical nomenclature. Elsevier Scientific Publishing Company Ed., Amsterdam.

FIOL (J. B.) (1973). — Biosystématique des levures : recherche d'osidases, besoins vitaminiques, teneur en guanine-cytosine des ADN. Thèse de Doctorat es Sciences Naturelles. (Université Claude-Bernard, Lyon I).

FORSS (D. A.) (1969). — Flavours of dairy products: a review of recent adavances. *J. Dairy Sci., 52,* (6), 832.

GALESLOOT (Th. E.) (1947). — Défaut de production précoce de gaz dans le fromage causé par des levures. *Med. Melk-en Zuiveltijdschr., 1,* (4), 238.

HOSONO (A.) and TOKITA (F.) (1970). — The lipolytic properties of *Candida mycoderma* and *Debaryomyces kloeckeri* isolated from Limburg cheese and some properties of the lipases produced by these yeasts. *Jap. J. Zootech. Sci., 41,* 519.

JACQUET (J.) et LENOIR (J.) (1969). — Mécanismes intimes de l'affinage des fromages. *Economie et Médecine Animales, 10,* 38.

KANAUCHI (T.), YOSHIOKA (Y.) and HAMAMOTO (M.) (1962). — Microbial studies on blue veined cheese. I. Microflora of blue veined cheese in ripening period. *Jap. J. Zootech. Sci., 32,* 104.

KELLY (C. D.) (1937). — The microbial flora on the surface of Limburger cheese. *J. Dairy Sci., 20,* 239.

KOSIKOWSKI (F. V.) et MOCQUOT (G.) (1958). — Progrès de la technologie du fromage. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome.

LANGHUS (W. L.), PRICE (W. V.), SOMMER (H. H.) and FRAZIER (W. C.) (1945). — The «smear» of brick cheese and its relation to flavor development. *J. Dairy Sci., 28,* 827.

LAVIOLETTE (P.) (1977). — Sur une microméthode d'identification des activités enzymatiques. Revue de quelques résultats dans divers domaines d'application. (Communication personnelle).

LODDER (J.) (1971). — The yeasts. A taxonomic study. North Holland Publishing Company, Amsterdam-London.

LUU (Thanh) (1976). — Etude taxonomique des levures isolées à partir des fromages à pâte molle de type Camembert. D.E.A. de Nutrition (Université de Caen).

MILLET (Liliane), MELCION (Dominique) et DEVOYOD (J. J.) (1974). — La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. III. Rôle des levures dans la maturation de la « Tome ». *Le Lait, 539-540,* 616.

MONGET (D.) (1975). — Différence d'activités enzymatiques entre deux lignées cellulaires d'insectes : *Antheraea eucalypti* et *Malacosoma disstria* (*Lepidoptera*). *C.R. Acad. Sci., Paris, 281,* série D, 651.

PETT (L. B.) and WYNNE (A. M.) (1938). — *Biochem. J., 32,* 563, cité par PORTER (J. R.) (1948), in Bacterial chemistry and physiology. John Wiley Ed., New York.

SCHMIDT (J. L.) et LENOIR (J.) (1978). — Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. Son évolution au cours de la maturation. *Le Lait, 577,* 355.

SZUMSKI (S. A.) and CONE (J. F.) (1962). — Possible role of yeast endoproteinases in ripening surface-ripened cheeses. *J. Dairy Sci., 45,* (3), 349.

TSUGO (T.) and CHANG (J. E.) (1970). — Studies on cheese ripened mainly with yeast. I. Selection of yeast and manufacturing experiment. *Jap. J. Zootech. Sci., 41,* 445.

VERGEADE (J.) (1975). — Etude des levures du fromage de Saint-Nectaire. Thèse de Doctorat de 3e Cycle (Université de Clermont-Ferrand).

YAMAUCHI (K.), KANG (K.) and KAMINOGAWA (S.) (1976). — Proteolysis by *Debaryomyces hansenii* and lactic starters in skim-milk culture. *Jap. J. Zootech. Sci., 47,* 12.