

Aptitude de l'espèce
***Geotrichum candidum* à la production**
d'enzymes protéolytiques (1)

par

Micheline GUEGUEN et J. LENOIR

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

INTRODUCTION

Geotrichum candidum Link (Syn *Oidium lactis* Fresenius, *Oospora lactis* Saccardo) est une moisissure présente à la surface de nombreux fromages à pâte molle. Elle tend à se développer en début d'affinage sur le Camembert (Sansonezzi, 1930), le Pont-l'Évêque et le Livarot (Hurel et Mocquot, 1947). Elle apparaît très précocement sur un fromage belge, le Limburger, et fait partie de la microflore de l'Olomouc, du Quargel, du Quarg, du Tilsit, du Bel paese, du Romadur... (Petricic, 1959-1960). C'est la principale moisissure isolée sur le Robbiola, fromage italien à maturation rapide (Carini et al., 1971) et elle forme le feutrage blanc compact des 10 premiers jours d'affinage sur le Taleggio (Ottogalli et Galli, 1972). *G. candidum* se rencontre également à la surface de certains fromages à pâte pressée tels le Saint-Nectaire (Dale et Guillot, 1971 ; Dale, 1972) et la Tome de Savoie (Delespaul et al., 1973).

Un inventaire de la microflore fongique superficielle de ces deux types de fromages a été dressé (Delespaul et al., 1973) et les conditions de développement des principales moisissures présentes ont été étudiées (Gueguen et al., 1974). Ces travaux ont mis en évidence le rôle prépondérant de *Geotrichum candidum* dans l'implantation de la couverture blanche recherchée. Mais, cette moisissure n'a pas en fromagerie un caractère purement « décoratif ». Elle peut jouer un rôle dans l'affinage par neutralisation de la pâte,

(1) Travail réalisé dans le cadre d'un contrat de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique. Contrat n° 737 1221 sur la mise au point d'une technologie des croûtes des fromages à pâte pressée au regard des moisissures.

permettant ainsi le développement de germes caséolytiques (Pulss, 1955 ; Veisseyre, 1965), et par production d'enzymes qui participent à la dégradation des constituants du caillé. Aussi n'est-il pas sans intérêt d'étudier les aptitudes biochimiques de l'espèce.

Le système lipolytique de *Geotrichum candidum* a fait l'objet de nombreux travaux depuis une vingtaine d'années et il est aujourd'hui bien caractérisé (Nelson, 1952-1953 ; Dluzewski, 1963 ; Carini et al., 1970 ; Tsujisaka et al., 1973 ; Franzke et al., 1973). En revanche, l'aptitude de l'espèce à la protéolyse et la nature de son système protéolytique restent encore mal connues. Pulss (1955) considère que l'organisme n'est pas fortement protéolytique. Les travaux de Dluzewski et Bruderer (1963) confirment ce point de vue. Ces auteurs observent en effet, chez les fromages affinés en présence de *O. lactis*, une légère augmentation de la teneur en composés azotés solubles par rapport aux fromages témoins. L'examen électrophorétique des caséines des deux types de fromages tend à montrer que l'activité protéolytique de la moisissure porte sur les fractions α_s et β . Toutefois, selon Carini et al. (1970) *G. candidum* hydrolyserait seulement la caséine β .

Tenant compte de l'importance de l'espèce en microbiologie fromagère et de l'insuffisance de nos connaissances sur son activité protéolytique, il nous a paru utile de déterminer, sur une collection de souches de diverses origines, les aptitudes à la production de protéases et de préciser les caractères du système protéolytique.

I. — PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I. 1. Sélection des souches

Une collection de 30 souches de *Geotrichum candidum* a été constituée à partir d'isolements effectués sur fromages de Saint-Nectaire d'origines fermière et industrielle (25 souches), Tome de Savoie (1 souche), Camemberts normands (4 souches).

Trois souches de *Geotrichum gracile*, isolées de Tome de Savoie ont été également éprouvées.

I. 2. Conditions de culture

Les souches, cultivées en milieu Czapek-trypticase pH 5,5, sont conservées à + 5° C et repiquées sur ce même milieu en tubes de gélose inclinée.

Après 8 j d'incubation à 23° C, 10 ml de solution stérile de Ringer au 1/4 sont introduits dans le tube de culture et, par agitation

énergique, on obtient la suspension de spores constituant la solution mère.

Le milieu de culture est inoculé par addition de 1 ml de cette suspension à 40 ml de milieu. Le nombre de spores ainsi ensemencées est compris entre 0,5 et 2,5. 10^6 par ml de milieu. Il a été observé que dans cet intervalle, le poids de mycélium développé et l'aptitude à la production d'enzymes protéolytiques sont indépendants du taux d'ensemencement.

Le milieu de culture utilisé est le milieu Czapek-trypticase, dérivé du milieu Czapek-Dox (Thom et Raper, 1945). Il a la composition suivante : glucose 30 g, trypticase 10 g, KH_2PO_4 1 g, KCl 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, tampon tris-maléate pH 5,5 0,05M 1 000 ml*. Ce milieu est réparti en erlenmeyers de 150 ml à raison de 40 ml par fiole et stérilisé par autoclavage à 115° C pendant 20 mn.

Chaque souche est ensemencée sur deux fioles coniques qui sont mises à l'étuve à 23° C pendant 11 j sans agitation. Une deuxième série d'essais est réalisée à 8 j d'intervalle dans les mêmes conditions afin de confirmer les résultats.

I. 3. Conditions de détermination de l'activité protéolytique

I. 3. 1. PRÉPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

Après incubation, les cultures sont filtrées sur papier Médi-Sciences n° 111. Le filtrat, ajusté à pH 6,0 constitue la préparation enzymatique extracellulaire. Le mycélium séparé par filtration est lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis égoutté. Un poids connu de mycélium frais est mis en présence de 30 ml de tampon mixte (acétate de sodium - phosphate dipotassique - borate de sodium 0,25 M, réglé à pH 6,0) et broyé pendant 2 mn à l'aide de l'appareil de Braun en flacon de 75 ml en présence de 50 g de billes de verre de 0,45-0,50 mm de diamètre. Un jet continu d'anhydride carbonique liquide permet d'éviter l'échauffement du mélange et, ainsi l'inactivation des enzymes. La suspension est conservée 30 mn à la température ambiante. L'activité enzymatique intracellulaire est déterminée, soit directement sur la suspension c'est-à-dire sur le broyat total, soit, après centrifugation 10 mn à 6 000 tours, sur le surnageant. Dans ce dernier cas, l'activité du culot remis en suspension en tampon mixte permet d'estimer la proportion d'enzymes liées à la paroi.

I. 3. 2. CONDITIONS DE DIGESTION

L'activité des préparations est déterminée sur un substrat à base de caséine ; sa composition est la suivante : caséine Hammarsten 25 g, citrate trisodique 0,02 M q.s.p. 1 000 ml, pH ajusté à 7,0 par

*Trishydroxyméthylamino-méthane : 6,05 g/l, anhydride maléique : 4,9 g/l, soude q.s.p. pH voulu.

addition de soude environ N. La solution est stabilisée par autoclavage 15 mn à 120° C.

Les mélanges de digestion ont la composition suivante : solution de caséinate 2,5 ml, tampon mixte (acétate-borate-phosphate, 0,25 M, pH 6,0) : 0,5 ml, préparation enzymatique : 1 ml, eau distillée : 1 ml.

La digestion est conduite en tubes à essai, placés en bain-marie thermostaté à la température de 40° C, pendant 1 h.

I. 3. 3. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Le mélange de digestion est déféqué par addition de 5 ml d'acide trichloracétique à 4 p. 100 et sur le filtrat trichloracétique la quantité de matières azotées non protéiques est déterminée par la méthode colorimétrique de Anson (1938) avec le réactif de Folin (Folin et Cicalteu, 1927).

Le développement de la coloration s'effectue en ajoutant à 1 ml de filtrat trichloracétique : 6,5 ml d'eau, 2 ml de carbonate de sodium à 150 g par l et 0,5 ml de réactif de Folin. Après maintien 5 h à la température ambiante, il est procédé à la lecture de la densité optique contre le blanc préparé à partir du filtrat trichloracétique correspondant au mélange de digestion non incubé. Les lectures sont faites avec un colorimètre Lumetron à la longueur d'onde de 650 nm, et traduites en poids de tyrosine à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en μg de tyrosine libérée par ml de milieu et par heure de digestion pour l'activité protéolytique extracellulaire, en mg de tyrosine libérée par g de mycélium sec et par heure de digestion pour l'activité intracellulaire.

II. — RESULTATS

II. 1. Mise au point des conditions opératoires

II. 1. 1. CONDITIONS DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

Sur un petit nombre de souches, ont été notamment déterminées les influences de la quantité d'enzyme, du temps, du pH de digestion et de la technique de broyage. Pour les enzymes intracellulaires les activités des surnageants de centrifugation ont été comparées à celles des broyats totaux.

a) *L'influence de la quantité d'enzyme* a été estimée en faisant varier les volumes des préparations enzymatiques dans les limites 0-2 ml, les mélanges de digestion réglés à pH 6,0 étant incubés 1 h à 40° C. Dans ces conditions les densités optiques trouvées sont proportionnelles aux quantités d'enzymes. Avec 2 ml d'extrait enzymatique les colorations développées sont intenses ; dans les essais ultérieurs les mélanges de digestion renferment 1 ml de préparation.

b) *Des temps de digestion* de 30 mn, 1 h, 2 h et 4 h ont été éprouvés, à la température de 40° C et un pH de 6,0, sur les préparations extracellulaires de trois souches (G. 116, G. 824 et D. 72). Au-delà de 2 h il n'y a plus proportionnalité entre le temps de digestion et la quantité de tyrosine libérée ; le temps finalement retenu est 1 h.

c) *L'influence du pH de digestion* a été déterminée sur trois souches (G. 116, G. 824, D. 72) dans l'intervalle 5,5-6,5 et sur une souche (G. 824) dans les limites 4,5-6,5. Le degré de protéolyse optimal observé se situe dans l'intervalle de pH 5,5-6,0.

d) *L'influence de la technique de broyage du mycélium* a été estimée sur trois souches (G. 36, G. 819 et D. 72) en comparant les résultats d'un broyage mécanique et d'un broyage aux ultra-sons. Pour ce dernier la suspension mycélium-tampon, préalablement homogénéisée à l'ultra-turrax, est soumise à l'action des ultra-sons au moyen de l'appareil Ultrasonic type N. 165 à la puissance maximale pendant 20 mn. Le mycélium est alors très mal dissocié et l'activité protéolytique trouvée est sensiblement moindre que sur la suspension broyée mécaniquement.

e) *Les activités du surnageant et du broyat total* ont été comparées sur quatre souches (G. 36, G. 819, G. 824, D. 72). Dans tous les cas les activités des surnageants de centrifugation sont sensiblement inférieures à celles des broyats totaux, elles n'en représentent que 50 p. 100 à 80 p. 100. Dans tous les essais ultérieurs l'activité intracellulaire a été déterminée sur le broyat total.

II. 1. 2. CONDITIONS DE CULTURE

Les conditions de développement favorables à la croissance et à la production d'enzymes ont été recherchées sur un certain nombre de souches. Ont notamment été étudiées les influences de l'âge de la préculture, de la composition du milieu, de la nature du tampon, du pH et du temps de culture.

a) *Influence de l'âge de la préculture*

Les souches G. 36 et G. 819 ont été repiquées sur milieu Czapek trypticase gélosé tamponné à pH 5,5 et incubées pendant 3 j, 4 j, 8 j et 1 mois à 23° C avant l'ensemencement en milieu liquide. Après 11 j de culture en erlenmeyers à 23° C le poids de mycélium sec et l'activité protéolytique extracellulaire ont été déterminés.

Les résultats obtenus (tab. 1) montrent que le temps de préculture doit être supérieur à 4 j pour permettre développement mycélien et production d'enzymes satisfaisants. Dans les essais ultérieurs, un temps de préculture de 1 semaine a finalement été retenu.

b) *Influence de la composition du milieu de culture*

Le milieu de culture doit assurer une croissance satisfaisante et permettre au micro-organisme de manifester ses aptitudes à la production d'enzymes. Au cours de l'étude des conditions de développe-

TABLEAU 1

Influence de l'âge de la préculture sur la croissance et l'activité protéolytique extracellulaire de *Geotrichum candidum*

Temps de préculture	Souche G. 36		Souche G. 819	
	Poids de mycélium	Activité protéolytique	Poids de mycélium	Activité protéolytique
3 jours	0,23	70	0,23	60
4 jours	0,24	70	0,68	545
8 jours	0,24	90	0,68	605
1 mois	0,29	55	0,66	620

Le poids de mycélium est exprimé en g de mycélium sec pour 40 ml de milieu.

L'activité protéolytique est exprimée en μg de tyrosine/ml de milieu par heure de digestion

ment des principales moisissures présentes à la surface des fromages de Saint-Nectaire et de Tome de Savoie, cinq milieux de culture ont été essayés (Gueguen et al., 1974) ; les plus favorables à la croissance sont les milieux Czapek-sulfate et Czapek-trypticase. Parallèlement un test rapide d'estimation de l'activité protéolytique des filtrats de culture a été réalisé par mesure de la zone d'hydrolyse sur lait gélosé coulé en boîte de Pétri.

Le milieu Czapek-trypticase sur lequel la croissance et la production d'enzymes protéolytiques sont les plus satisfaisantes a été finalement retenu. La supplémentation de ce milieu par addition d'une solution d'oligo-éléments renfermant cuivre, zinc, manganèse, calcium et molybdène ne s'est pas révélée nécessaire comme pour les *Penicillium* (Meyers et Knight, 1958 ; Lenoir et al., 1973).

c) Influence de la nature du tampon

Au cours des essais préliminaires, il avait été observé que certaines souches possédaient une activité protéolytique très faible. Les milieux de culture étaient alors maintenus à pH 5,5 au moyen d'un tampon citrate 0,2 M, or l'on sait que le citrate inactive certaines protéases. L'influence du tampon a été déterminée en comparant le développement et l'activité protéolytique de trois souches de *G. gracile* (D. 306, D. 611, D. 72) et quatre souches de *G. candidum* (G. 633, G. 801, G. 819, G. 828) cultivées sur milieux Czapek-trypticase

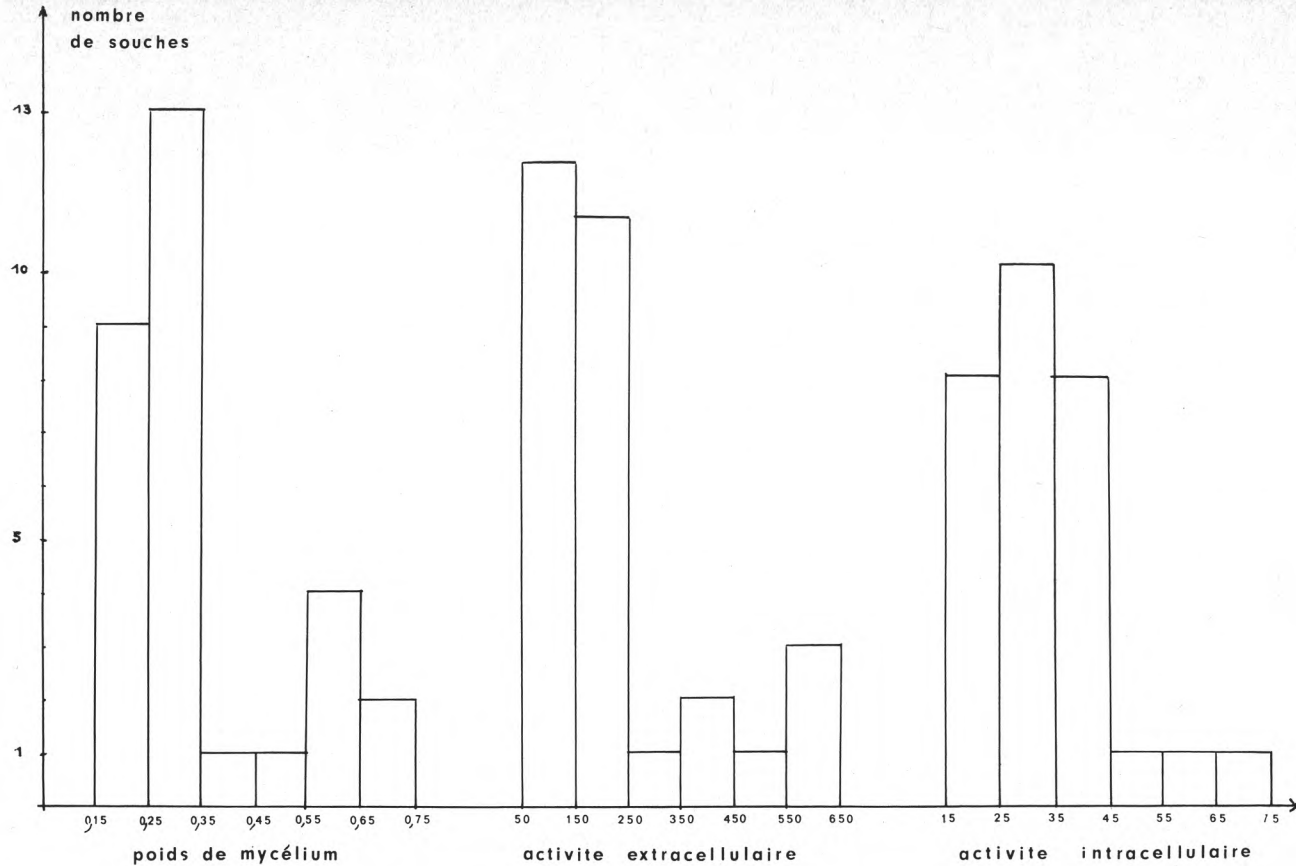


fig. 1

Distribution des souches de *Geotrichum candidum* en fonction des poids de mycélium et des activités protéolytiques extra et intracellulaires.

Les poids de mycélium sont exprimés en g de mycélium sec pour 40 ml de milieu, les activités extracellulaires en μg de tyrosine/ml de milieu/h de digestion et les activités intracellulaires en mg de tyrosine/g de mycélium/h de digestion.

tamponnés à pH 5,5 avec du citrate 0,2 M ou du tris-maléate 0,05 M. Les différences dans les poids de mycélium obtenus sur les deux milieux sont très faibles.

Le tampon citrate permet un développement légèrement supérieur au tampon tris-maléate pour *G. gracile*, un peu inférieur pour l'espèce *G. candidum*. Il n'y a pas non plus de différences très marquées entre les deux milieux dans les activités protéolytiques intracellulaires. En revanche, pour toutes les souches étudiées, l'activité protéolytique extracellulaire est très faible avec le milieu tamponné au citrate et est beaucoup plus élevée sur le milieu tamponné au tris-maléate puisque multipliée par un facteur qui peut dépasser 10 (tab. 2). Le tampon tris-maléate a donc été retenu dans les autres essais.

d) Influence du pH de culture

Cinq souches (G. 36, G. 116, G. 633, G. 819 et D. 72) ont été ensemencées sur le milieu de culture réglé aux pH 5,5 - 6,0 et 6,5 à l'aide du tampon tris-maléate. La croissance, favorisée par les pH acides, est encore très bonne à pH 6,5 ; en revanche, la production d'enzymes extracellulaires se trouve inhibée lorsque les moisissures sont cultivées à ce pH. Avec les souches G. 633 et G. 819, qui ont une forte activité, l'inhibition se manifeste dès pH 6,0, les souches G. 36 et G. 116 à activité très faible, sont beaucoup moins sensibles aux différences de pH, entre 5,5 et 6,0. Quant à *G. gracile* D. 72 elle a un comportement différent, son activité extracellulaire est un peu plus élevée sur les cultures à pH 6,0 que sur celles à pH 5,5 (tab. 3).

Trois souches (G. 36, G. 819, D. 72) ont été également cultivées sur milieu tamponné à pH 4,0. La digestion, sur substrats caséine et hémoglobine, effectuée à différents pH (3,4 - 5,6) n'a pas permis de détecter la présence d'une protéase acide.

On peut donc retenir comme pH de culture le pH 5,5 qui est favorable à la production de protéases par l'une et l'autre espèce et qui est compatible avec une bonne croissance.

e) Influence de l'âge de la culture

Deux souches de *G. candidum* (G. 36 et G. 819) ont été cultivées sur milieu Czapek-trypticase réglé à pH 5,5. Après 5, 7, 9, 12, 15 j de culture, le poids de mycélium formé et les activités extra et intracellulaires ont été déterminés.

Le tableau 4 montre que la croissance et les activités protéolytiques passent par un optimum se situant dans l'intervalle 9-12 j. Pour des raisons d'ordre pratique le temps de culture a été fixé à 11 j.

II. 2. Croissance et activité protéolytique des souches de la collection

Les cultures obtenues après incubation 11 j à 23° C sont filtrées. Les filtrats des deux erlenmeyers correspondant à une même souche

TABLEAU 2. — Influence de la nature du tampon sur la croissance et l'activité protéolytique de *Geotrichum*

	N° souche	Poids de mycélium		pH fin de culture		Activité extracellulaire		Activité intracellulaire	
		C*	TM**	C	TM	C	TM	C	TM
<i>Geotrichum gracile</i>	D. 306	0,47	0,43	5,7	6,3	65	470	28	23
	D. 611	0,46	0,44	5,6	6,3	90	460	28	19
	D. 72	0,57	0,60	5,6	5,9	80	380	39	30
<i>Geotrichum candidum</i>	633	0,55	0,58	5,5	5,9	35	545	44	30
	G. 801	0,49	0,46	5,5	6,2	15	425	30	25
	G. 819	0,51	0,60	5,6	6,0	45	640	39	34
	G. 828	0,56	0,61	5,6	5,9	55	425	48	53

*C = tampon citrate.

**TM = tampon tris-maléate.

Les poids de mycélium sont exprimés en g de mycélium sec pour 40 ml de milieu, les activités extracellulaires en μg de tyrosine/ml de milieu/h de digestion et les activités intracellulaires en mg de tyrosine/g de mycélium/h de digestion.

TABLEAU 3. — Influence du pH de culture sur la croissance et l'activité protéolytique extracellulaire de *Geotrichum*

	N° souche	pH de culture					
		5,5		6,0		6,5	
		Poids de mycélium	Activité	Poids de mycélium	Activité	Poids de mycélium	Activité
G. gracile ↕ G. candidum ↑	G. 36	0,31	90	0,27	85	0,25	55
	G. 116	0,34	100	0,26	85	0,25	90
	633	0,66	700	0,66	585	0,65	265
	G. 819	0,69	595	0,71	460	0,70	210
	D. 72	0,53	520	0,51	580	0,64	350

Le poids est exprimé en g de mycélium sec pour 40 ml de milieu de culture et l'activité en μg tyrosine/ml milieu/h de digestion

TABLEAU 4. — Influence de l'âge de la culture sur la croissance et l'activité protéolytique de *Geotrichum candidum*

Temps de culture	G. 36				G. 819			
	pH fin de culture	Poids de mycélium	Activité extracellulaire	Activité intracellulaire	pH fin de culture	Poids de mycélium	Activité extracellulaire	Activité intracellulaire
5 jours	5,35	0,20	65	16,5	5,65	0,71	500	50
7 jours	5,2	0,20	65	22	5,85	0,71	600	54
9 jours	5,4	0,33	80	37	6,35	0,76	780	98
12 jours	5,05	0,33	25	35	6,2	0,70	600	81
15 jours	5,1	0,32	30	27	6,4	0,64	780	94

Culture de 5 à 15 j à pH 5,5, tampon tris-maléate.

Le poids de mycélium est exprimé en g de mycélium sec pour 40 ml de milieu. L'activité extracellulaire en $\mu\text{g tyr./ml/h}$. L'activité intracellulaire en mg tyr./g/h .

TABLEAU 5. — Activités protéolytiques extra et intracellulaires de *Geotrichum*

	N° souche	pH fin de culture	Poids de mycélium	Activité extracellulaire	Activité intracellulaire	Activité totale
G. gracile	D. 306	6,35	0,43	470	23	720
	D. 611	6,3	0,44	460	19	675
	D. 72	6,25	0,46	380	25	670
	G. 801	5,9	0,60	425	30	875
	G. 828	5,95	0,58	425	30	855
	G. candidum	D. 49	5,6	0,26	125	29
G. 25		5,7	0,23	150	28	310
G. 36		5,4	0,24	70	17	170
G. 59		5,4	0,27	145	37	395
G. 116		5,3	0,25	255	20	380
G. 117		5,6	0,20	95	22	205
G. 410		5,5	0,28	145	23	305
G. 618		5,6	0,20	60	17	145
633		6,3	0,62	615	40	1235
635		6,8	0,62	530	39	1140
637		5,8	0,52	235	32	650
638		5,8	0,43	165	19	370
G. 802		5,75	0,34	215	36	525
G. 812		5,75	0,23	135	32	320
G. 813		5,75	0,26	135	41	405
G. 816		4,9	0,31	205	37	490
G. 817		5,7	0,26	160	38	410
G. 819		6,2	0,69	615	69	1810
G. 820		5,7	0,25	205	46	495
G. 821		5,7	0,20	115	26	245
G. 822		5,7	0,20	160	23	275
G. 823		5,2	0,31	110	38	410
G. 824		5,7	0,23	170	24	310
G. 825		5,4	0,25	90	32	295
G. 826		5,3	0,16	95	—	—
G. 827		5,7	0,25	195	28	370
G. 830	6,3	0,66	615	55	1525	
G. 832	5,7	0,28	215	30	425	

Les poids de mycélium sont exprimés en g de mycélium sec pour 40 ml de milieu, les activités extracellulaires et totales en μg de tyrosine/ml de milieu/h de digestion, les activités intracellulaires en mg de tyrosine/g de mycélium/h de digestion.

sont mélangés et sur ces filtrats sont déterminés le pH final du milieu et l'activité protéolytique extracellulaire.

Le mycélium récolté à partir de l'un des erlenmeyers est, après lavage, séché à l'étuve et pesé. Sur le mycélium correspondant à la seconde fiole est déterminée l'activité protéolytique intracellulaire.

Chaque souche est ainsi éprouvée dans deux séries d'essais réalisées à 8 j d'intervalle.

Les résultats obtenus sont groupés sur le tableau 5. On notera que le pH final des cultures oscille entre 4,9 et 6,8, le poids de mycélium sec, exprimé en g pour 40 ml de milieu, entre 0,16 et 0,69, l'activité extracellulaire de 60 à 615, l'activité intracellulaire de 16,6 à 69,3.

III. — DISCUSSION

L'examen des résultats concernant l'ensemble de la collection permet de faire un certain nombre d'observations.

Les deux espèces *G. candidum* et *G. gracile* semblent avoir des comportements sensiblement différents. Dans les mêmes conditions de culture, *G. gracile* a une croissance mycélienne plus grande que *G. candidum*, les poids de mycélium moyens étant respectivement 0,45 g et 0,30 g pour 40 ml de milieu. La production moyenne d'enzymes de *G. gracile* est également plus élevée ; il en est notamment ainsi pour l'activité protéolytique extracellulaire et l'activité protéolytique totale rapportées au ml de milieu de culture. On remarquera cependant que le nombre de souches de *G. gracile* éprouvées est faible, aussi les caractères observés peuvent ne pas être représentatifs de l'espèce.

Au sein de la collection de *G. candidum*, il existe, d'une souche à l'autre, des différences importantes dans les aptitudes à la croissance et à la production d'enzymes dans les conditions de culture choisies. Les poids de mycélium récoltés après 11 j d'incubation sont pour la plupart compris entre 0,20 et 0,30 g. Toutefois, une proportion non négligeable de souches, environ 1/4, se développe beaucoup plus activement et produit des poids de mycélium compris entre 0,50 et 0,70 g. Les activités protéolytiques extracellulaires se situent dans l'intervalle 60-615, soit une amplitude de variation voisine de 1 à 10. Dans cet intervalle, la distribution des souches n'est cependant pas uniforme (fig. 1) : vingt-trois souches s'inscrivent dans les classes d'activité 50-250, six dans les classes 350-650. Les activités intracellulaires, exprimées en mg par g de mycélium, oscillent entre 16 et 70, soit une amplitude de variation proche de 1 à 4, mais vingt-six souches se classent dans l'intervalle 15-45, seulement trois dans l'intervalle 45-75. Rapportées au ml de milieu de culture, les activités intracellulaires varient de 80 à 1 200, soit une amplitude de 1 à 15, le nombre

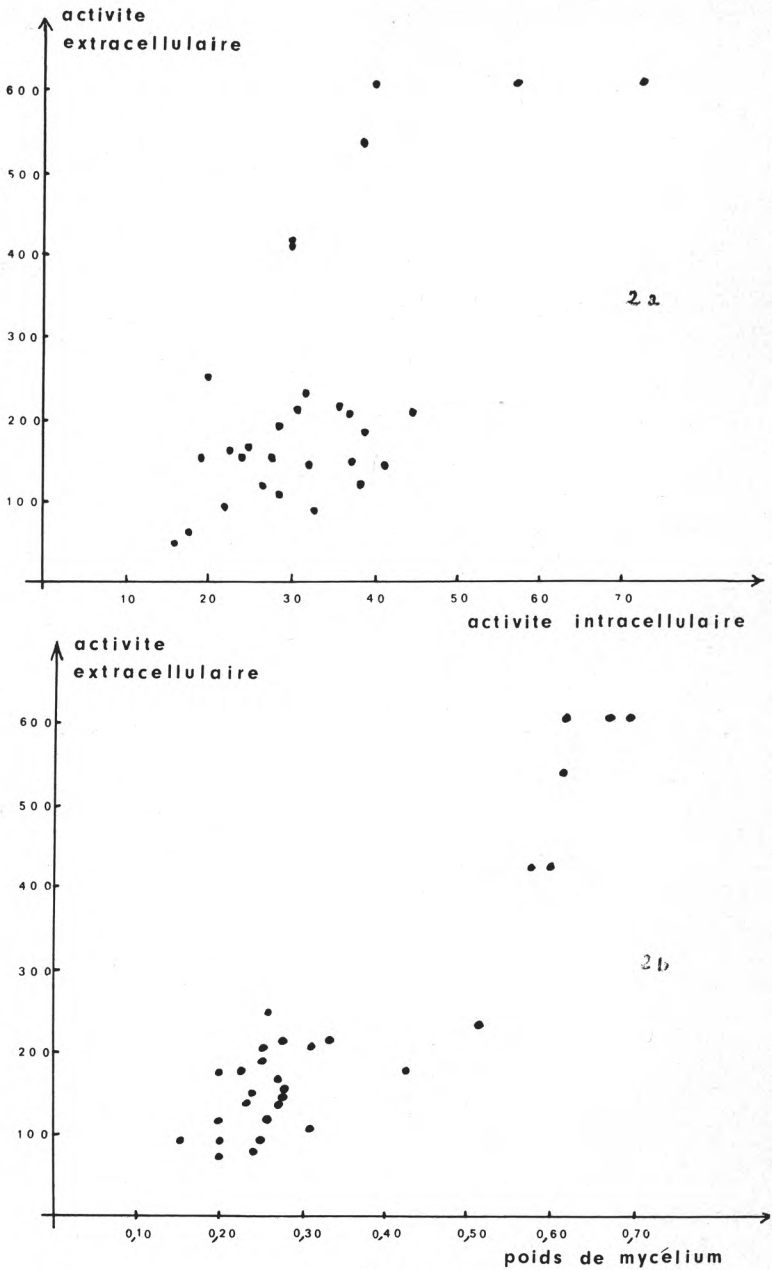


fig. 2

Relation entre les activités protéolytiques extra et intracellulaires (2 a) et entre les activités extracellulaires et le poids de mycélium (2 b) chez *Geotrichum candidum*.

Les poids de mycélium sont exprimés en g de mycélium sec pour 40 ml de milieu, les activités extracellulaires en μg de tyrosine/ml de milieu/h de digestion et les activités intracellulaires en mg de tyrosine/g de mycélium/h de digestion.

de souches dont l'activité dépasse 400 est cependant faible, il représente à peine le 1/4 de la population.

La comparaison entre les activités extra et intracellulaires des diverses souches de *G. candidum* ne permet pas d'établir une relation constante entre les deux valeurs. Les rapports activité extracellulaire / activité intracellulaire sont compris entre 3 et 15, et le diagramme de la figure 2 a met en évidence cette absence de corrélation. Observons toutefois que les souches dont l'activité extracellulaire est supérieure à 500 ont aussi une activité intracellulaire plus élevée que la moyenne de la collection. Entre la production d'enzymes et la croissance mycélienne il semble y avoir une certaine corrélation. En général, aux poids de mycélium élevés correspondent des activités protéolytiques exocellulaires également élevées (fig. 2 b), et les classements des souches en fonction de leurs aptitudes à la croissance et à la production d'enzymes font apparaître une bonne concordance, contrairement à ce qui avait été observé chez *P. caseicolum* (Lenoir et Choisy, 1971). Un lien paraît également exister entre la production d'enzymes et le pH du milieu en fin de culture. On remarque en effet que les souches activement protéolytiques ont une action alcalinisante marquée, le pH final dépassant 6,0 avec un milieu tamponné au départ à pH 5,5.

L'ensemble des caractères des différentes souches de *G. candidum* permet finalement de distinguer au sein de la population deux sous-groupes. L'un, formé par la majeure partie des souches, environ les 3/4, est caractérisé par un développement mycélien limité (0,20 à 0,35 g) et une activité protéolytique extracellulaire assez faible (60 à 250). Le second, qui rassemble seulement six souches, est caractérisé au contraire par une croissance et une production d'enzymes très actives, les poids de mycélium atteignant 0,60 à 0,65 g, les activités protéolytiques extracellulaires 400 à 600. Ce sous-groupe II se distingue également du reste de la population par un rapport activité extracellulaire / activité intracellulaire élevé (10 à 15 contre 3 à 8) et une action alcalinisante nettement marquée.

Ces différences de comportement et d'aptitudes biochimiques sont associées à des différences dans l'aspect des cultures.

Sur milieu gélosé, malt ou Czapek-trypticase, les souches du sous-groupe I ont une couleur blanc-crème et un aspect levuriforme. En milieu liquide elles se développent en surface et au sein du milieu, formant une masse beige, visqueuse, rappelant une « mère » de vinaigre. Les souches du sous-groupe II ont sur milieu gélosé un aspect non levuriforme mais très proche de celui d'un mycélium vrai. En milieu liquide, elles se développent exclusivement en surface, formant un feutrage épais et irrégulier. Cultivées sur milieu gélosé Czapek-caséine elles prennent l'apparence de certaines souches de *Penicillium caseicolum* alors que les souches du sous-groupe I conservent leur aspect levuriforme.

L'aptitude à la protéolyse de *Geotrichum candidum* peut être comparée à celles d'autres moisissures appartenant à la microflore des fromages, par exemple *Penicillium caseicolum*, principal responsable de la dégradation des protéines dans les fromages de type Camembert.

L'activité protéolytique extracellulaire du *Penicillium*, cultivé sur milieu Czapek-trypticase, varie selon les souches de 210 à 450 (Lenoir et Choisy, 1971). Ce sont des valeurs proches de celles relevées chez *G. candidum* qui se situent dans la fourchette 60-600. On peut, dans ces conditions, admettre que le développement de *G. candidum* à la surface des fromages n'est pas sans influence sur l'évolution des matières azotées des pâtes au cours de l'affinage.

Classements et comparaisons de souches et d'espèces sur la base des activités protéolytiques sont possibles et ils ne manquent pas d'intérêt. Il convient cependant de ne pas considérer les chiffres mentionnés comme des valeurs absolues mais plutôt comme des ordres de grandeur, situant un niveau de production. Les résultats des déterminations ne sont, en effet, jamais parfaitement reproductibles, même dans des conditions de culture et de digestion soigneusement contrôlées. En outre, on peut observer, avec le temps, et à la suite de repiquages successifs, des variations importantes dans les niveaux de production d'enzymes (Lenoir et al., 1973).

IV. — RESUME ET CONCLUSION

L'espèce *G. candidum* appartient à la flore microbienne de surface de nombreux fromages, et par ses activités biochimiques elle est susceptible d'intervenir dans l'affinage, cependant son aptitude à la protéolyse reste encore mal connue. Sur une collection de trente souches, isolées de fromages de divers types, l'aptitude à la production d'enzymes protéolytiques a été déterminée en adoptant des conditions de culture et de digestion bien définies. Après une préculture de 8 j sur gélose inclinée, les souches sont ensemencées sur milieu Czapek-trypticase tamponné à pH 5,5 et incubées pendant 11 j à 23° C. Les activités protéolytiques extra et intracellulaires sont déterminées sur un substrat à base de caséine, le mélange étant maintenu à pH 6,0, à la température de 40° C, pendant 1 h.

La production d'enzymes protéolytiques par l'espèce *G. candidum* est variable d'une souche à l'autre. Deux sous-groupes peuvent être distingués au sein de la population. Le premier, formé par les 3/4 des souches, est caractérisé par une activité protéolytique extracellulaire limitée (60 à 250), le second par une activité exocellulaire relativement élevée (350-650). Outre ce caractère, les deux sous-groupes se distinguent également par leur aptitude à la croissance et l'aspect des cultures. Les différences d'activité observées sont suffisantes pour justifier la prise en considération de ce caractère comme critère de sélection des souches en vue de leur emploi en fromagerie.

Ces résultats, encore fragmentaires, ne traduisent qu'imparfaitement les caractères du système protéolytique de *G. candidum* puisqu'ils portent sur des préparations enzymatiques brutes. Etant données l'importance de la moisissure dans la formation de la croûte fleurie typique du fromage de Saint-Nectaire, sa contribution probable à l'élaboration d'une pâte aux caractéristiques organoleptiques originales, son intervention dans l'affinage de divers fromages à pâte molle, une caractérisation plus approfondie du système protéolytique de l'espèce paraît utile.

Summary

The species *Geotrichum candidum* belong to the bacterial flora on the surface of many cheeses, and, because of its biochemical activities, it may have a role during the ripening ; though, its ability to the proteolysis is scarcely known. With a collection of 30 strains, isolated from different cheese-varieties, the ability to produce proteolytic enzymes was determined by using definite conditions of culture and digestion.

The production of proteolytic enzymes by the species *G. candidum* is variable from one strain to another. Two undergroups can be determined among the population. The first one (3/4 of the strains), is characterized by an extracellular proteolytic activity, which is limited (60 to 250 μ g tyrosine/ml of médium/h of digestion), the second is characterized by an exocellular activity which is relatively high (350-650). Besides this character, the two undergroups are also distinguishable by their ability to grow and by the apperance of médium. The differencies between the activities are important enough to be considered as a selection criterium of the strains for the use in cheesemaking.

Reçu pour publication en novembre 1974.

**

Depuis la rédaction de ce mémoire une nouvelle série d'isoléments a été effectuée à partir de fromages de Pont-l'Evêque. Les résultats obtenus sur la nouvelle collection présentent des différences avec ceux de cette première série.

— Les souches produisant des poids de mycélium élevés, supérieurs à 0,50 g, dominant ; elles représentent les 2/3 de la population.

— La proportion de souches présentant une forte activité protéolytique, supérieure à 350, est sensiblement plus élevée, elle atteint près de 40 p. 100.

— La corrélation entre la production d'enzymes et la croissance mycélienne n'est plus observée.

Les résultats de ces nouveaux essais feront l'objet d'une publication ultérieure.

Références bibliographiques

- ANSON (M. L.) (1938). — The estimation of pepsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 73, 627.
- CARINI (S.), VOLONTERIO (G.), BOZZOLATI (M.), GALLI (A.) (1970). — Caseinolisi e lipolisi di *Mucor*, *Penicillium* e *Geotrichum*. *Latte*, 44 (12), 867-873.
- CARINI (S.), KADERAVEK (G.), GREGORI (A. de), IVERNIZZI (F.) (1971). — Il formaggio « Robiola » e le sue caratteristiche chimiche e microbiologiche. *Latte*, 45 (9), 615-623.
- DALE (G.) (1972). — Moisissures et levures de la flore du fromage de Saint-Nectaire. *Revue Lait. Frse « Industr. Lait. »*, 296, 199-203.
- DALE (G.), GUILLOT (J.) (1971). — Contribution à l'étude de la microflore du fromage de Saint-Nectaire et de la physiologie de *Geotrichum candidum* link. *Société Biologique de Clermont-Ferrand*, 309-316.
- DELESPAUL (G.), GUEGUEN (Micheline), LENOIR (J.) (1973). — La flore fongique superficielle des fromages de Saint-Nectaire et de Tome de Savoie. Son évolution au cours de l'affinage. *Revue Lait. Frse « Industr. Lait. »*, 313, 715-729.
- DLUZEWSKI (M.) (1963). — Lypolytic properties of *Oospora lactis*. *Bull. Acad. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 11 (5), 227-230.
- DLUZEWSKI (M.), BRUDERER (G.) (1963). — Proteolytic activity of *Oospora lactis*. *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 11 (5), 221-225.
- FOLIN (O.), CIOCALTEU (V.) (1927). — On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73, 627.
- FRANZKE (Cl.), KRÖLL (J.), PETZOLD (R.) (1973). — Studien zur Glyceridstruktur von Fetten 6. Mitt. Untersuchungen and synthetisierten Triglyceriden zur Fettsäureresistenz der lipase von *Geotrichum candidum*. *Nahrung*, 17 (2), 171-184.
- GUEGUEN (Micheline), DELESPAUL (G.), LENOIR (J.) (1974). — La flore fongique superficielle des fromages de Saint-Nectaire et de Tome de Savoie. II. Ses conditions de développement. *Revue Lait. Frse « Industr. Lait. »*, 325.
- HUREL (C.), MOCQUOT (G.) (1947). — Etude comparée des fromages de Livarot et de Pont-l'Evêque. *Le Lait*, 27, 131-141.
- LENOIR (J.), CHOISY (C.) (1971). — Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait*, 51 (503-504), 138-157.
- LENOIR (J.), GLENZA (A.), BERGERE (J. L.), CERF (O.), CHOISY (C.), DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J.) (1973). — Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le Lait*, 53 (525-526), 246-279.
- MEYERS (E.), KNIGHT (S. G.) (1958). — Studies of the nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.*, 6 (3), 174-178.
- NELSON (W. O.) (1952). — Some characteristics of the lipase of *Geotrichum candidum*. *J. Dairy Sci.*, 35, 455-462.
- NELSON (W. O.) (1953). — Nutritional factors affecting growth and production of lipase by *Geotrichum candidum*. *J. Dairy Sci.*, 36, 143-151.
- OTTOGALLI (G.), GALLI (A.) (1972). — Ricerche sulla microflora superficiale del formaggio Taleggio. *Scienza Tec. Latt. Casear.*, 23 (6), 363-376.
- PETRICIC (A.) (1959-1960). — Study of *Geotrichum candidum* and its role in the ripening of soft cheese. *Rad. poljopriv. Fak. Univ. Sarajevu.* 8/9 (10/11), 149-207.
- PULSS (G.) (1955). — *Kieler Milchw. Forsch. Berichte.*, 7, 384.
- SANSONETTI (Françoise) (1930). — Sur les flores bactériennes et fongiques des caillés lactiques. Thèse Doctorat en Pharmacie, Paris, *Le Lait*, 10 (96), 100.
- THOM (C.), RAPER (K. B.) (1945). — A manual of the Aspergilli. The Williams and Wilking Company Ed., Baltimore (U.S.A.), p. 373.
- TSUJISAKA (Y.), IWAI (M.), TOMINAGA (Y.) (1973). — Purification, crystallization and some properties of lipase from *Geotrichum candidum* link. *Agr. Biol. Chem.*, 37 (6), 1457-1464.
- VEISSEYRE (R.) (1965). — Techniques Laitières. 2^e éd., *La Maison Rustique*, Paris, p. 697.