

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

II. Essais et interprétations complémentaires

par

J. L. SCHMIDT et J. LENOIR*

avec la collaboration technique de Michèle SCHMIDT

INTRODUCTION

Dans une étude récente, réalisée sur des fromages de Camembert d'origine normande et fabriqués à partir de lait cru, nous avons mis en évidence la diversité de la flore levure [6]. Une étude complémentaire [7] a permis, en disposant d'un échantillonnage de souches plus large et plus représentatif, de confirmer l'identité des espèces présentes à la surface et à l'intérieur du fromage au cours de la maturation. On a pu ainsi remarquer que la flore levure du Camembert est constituée « d'une flore de fond » à laquelle appartient un petit nombre d'espèces : *Kluyveromyces lactis*/*Torulopsis sphaerica*, *Kluyveromyces fragilis*/*Candida pseudotropicalis*, *Debaryomyces hansenii*. Dans certaines fabrications, apparaissent ce que l'on peut appeler « des modifications ponctuelles » présentées par *Saccharomyces rouxii*/*Torulopsis mogii*, *Torulopsis versatilis* et *Kluyveromyces bulgaricus*. Entre ces deux groupes, on a pu noter l'existence d'un troisième, formé par *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces italicus*, qui n'est présent que dans quelques fabrications, mais il constitue alors la flore levure dominante.

Tenant compte de la diversité de la flore et des variations possibles de son équipement enzymatique, il nous a paru intéressant de procéder à une étude systématique des aptitudes biochimiques de différentes souches de levures isolées à partir du Camembert. Dans une première approche [5], il a été procédé à un essai d'identification des enzymes et à une estimation de leur niveau d'activité par l'emploi

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

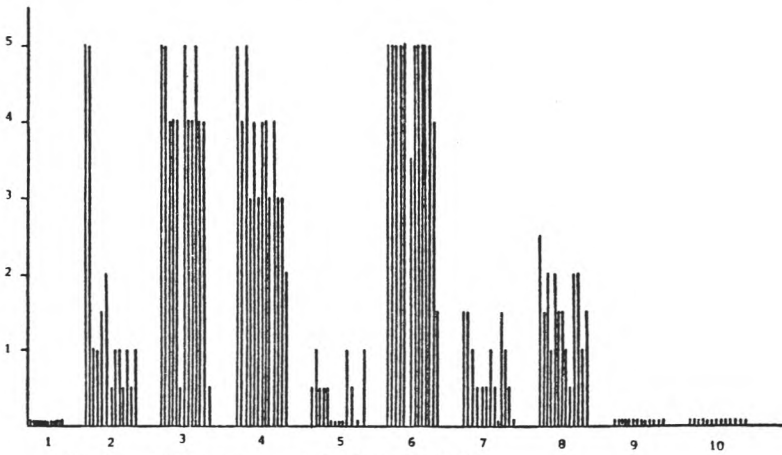


fig. 1a. - Profil enzymatique de *Saccharomyces italicus*

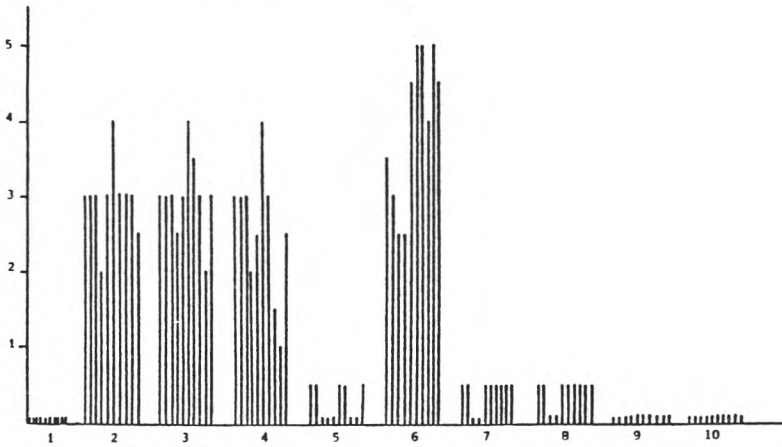


fig. 2a. - Profil enzymatique de *Saccharomyces cerevisiae*

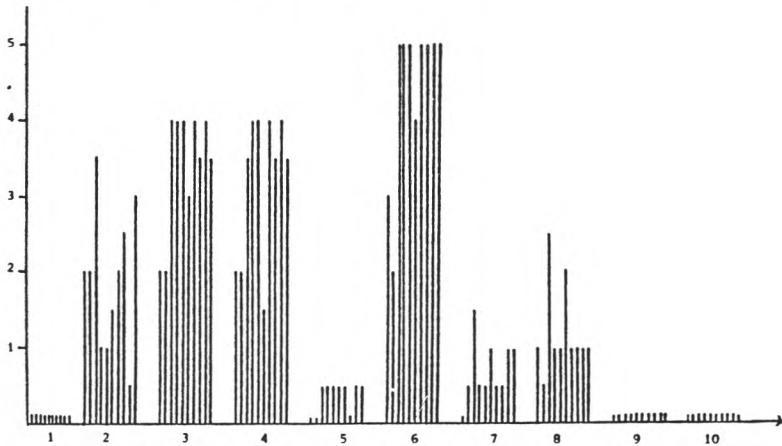


fig. 3a. - Profil enzymatique de *Debaryomyces hansenii*

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1 : Témoin | 6 : Leucine aminopeptidase |
| 2 : Phosphatase alcaline | 7 : Valine aminopeptidase |
| 3 : Estérase | 8 : Cystine aminopeptidase |
| 4 : Estérase lipase | 9 : Trypsine |
| 5 : Lipase | 10 : Chymotrypsine |

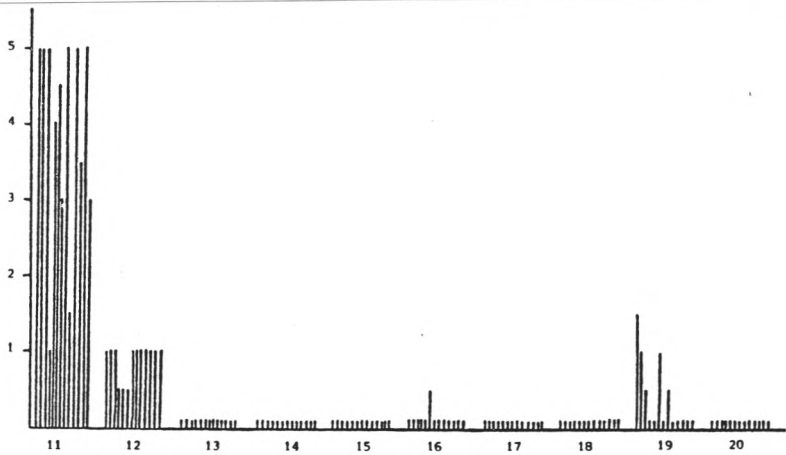


fig. 1b. - Profil enzymatique de *Saccharomyces italicus*

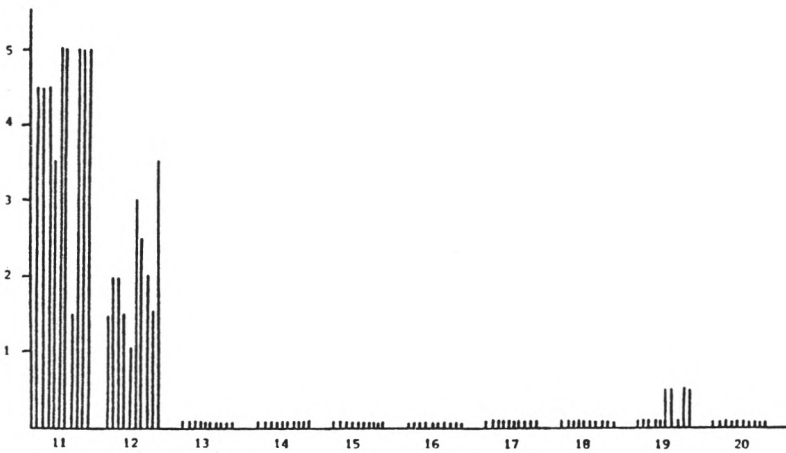


fig. 2b. - Profil enzymatique de *Saccharomyces cerevisias*

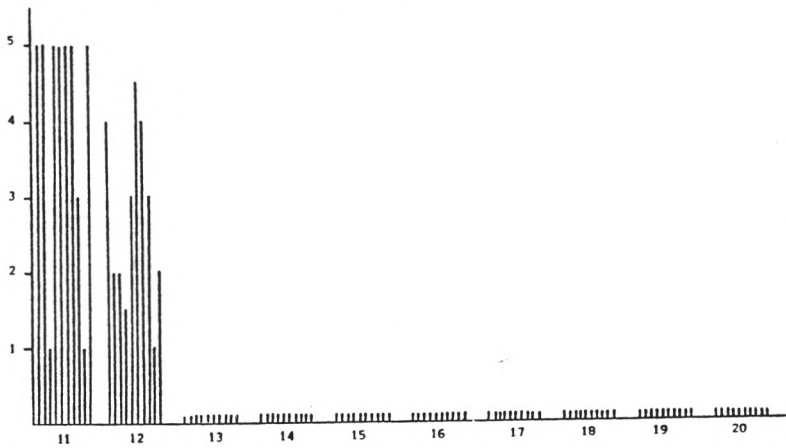


fig. 3b. - Profil enzymatique de *Debaryomyces hansenii*

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 11 : Phosphatase acide | 16 : α glucosidase |
| 12 : Phosphoamidase | 17 : β glucosidase |
| 13 : α galactosidase | 18 : β glucosaminidase |
| 14 : β galactosidase | 19 : α saminosidase |
| 15 : β glucuronidase | 20 : α fucosidase |

d'une technique permettant une discrimination rapide (Système API-ZYM**). La comparaison des profils enzymatiques a mis clairement en évidence la parenté existant entre *Kluyveromyces fragilis* et *Kluyveromyces lactis* (et leurs formes imparfaites) ainsi qu'entre *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces cerevisiae*. Une autre espèce, *Saccharomyces italicus*, a été plus récemment mise en évidence dans la flore du Camembert [7]. La présente étude porte sur son équipement enzymatique et compare le profil obtenu avec celui des autres espèces.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Treize souches de *Saccharomyces italicus*, isolées à partir de fromages de Camembert, ont été étudiées par mise en œuvre de la méthode « d'analyse enzymatique » API ZYM [3].

La description du dispositif, le mode opératoire utilisé et la reproductibilité des résultats ont été présentés dans la note antérieure [5].

RESULTATS

Les résultats obtenus sur les treize souches de *S. italicus* éprouvées sont groupés dans le tableau 1 et sur les histogrammes des figures 1 a et 1 b.

TABLEAU 1

Equipement enzymatique des souches de *Saccharomyces italicus* 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	1,6	1,6	96	0,64-2,59
Estérase (C4)	3,8	1,5	40	2,81-4,73
Estérase lipase (C8)	3,6	0,9	24	3,07-4,16
Lipase (C14)	0,45	0,5		
Leucine aminopeptidase	4,5	1,0	23	3,89-5,00
Valine aminopeptidase	0,8	0,5	68	0,44-1,10
Cystine aminopeptidase	1,5	0,6	36	1,19-1,89
Phosphatase acide	3,9	1,4	36	3,48-4,29
Phosphoamidase	0,9	0,2	25	0,75-1,02
α -glucosidase	0,04	0,1		
α -mannosidase	0,3	0,5		

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

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

On peut ainsi observer que, chez *S. italicus*, il existe une grande variabilité dans les activités enzymatiques. Onze systèmes, sur les dix-neuf testés, ont été mis en évidence, dont deux paraissent peu ou très peu fréquents, et cinq ont un coefficient de variation élevé compris entre 36 et 96 p. 100.

DISCUSSION

L'espèce, *S. italicus*, paraît ne posséder aucune activité osidasique, si ce n'est chez un petit nombre de souches une activité α mannosidase. Elle se différencie ainsi très nettement des *Kluyveromyces* et de leurs formes imparfaites, mais elle se rapproche de *D. hansenii* et de *S. cerevisiae* [5]. D'une façon générale, on peut d'ailleurs remarquer que *S. italicus* présente le même équipement enzymatique que ces deux dernières espèces (fig. 1 a - 1 b, 2 a - 2 b, 3 a - 3 b). Cet équipement enzymatique se manifeste avec une intensité comparable, bien que l'on enregistre de légères différences pour les activités phosphatase alcaline, valine aminopeptidase, cystine aminopeptidase, et phosphoamidase (tab. 2).

Les activités endopeptidasiques, types trypsine et chymotrypsine, sont absentes chez les souches étudiées, mais des protéases ayant des spécificités d'action moins marquées peuvent être produites.

Plusieurs aminopeptidasés sont présentes ; l'activité leucine aminopeptidase est maximale chez toutes les souches de *S. italicus*, les activités valine et cystine aminopeptidasés sont plus inégalement réparties et elles sont nettement inférieures à l'activité leucine aminopeptidase.

La distribution des activités lipasiques et estérasiques est également variable.

Les activités estérase lipase sont largement développées ; elles se situent chez la plupart des souches éprouvées à des niveaux élevés. En revanche, l'activité lipasique est faible, parfois même inexistante. Il convient, cependant, sur ce dernier point de rappeler les réserves formulées précédemment sur les résultats de cette épreuve [5].

Parmi les autres enzymes mises en évidence (tab. 1), on notera que les phosphomonoestérasés (phosphatasés acide et alcaline) sont bien représentés chez la plupart des souches de *S. italicus*, notamment la phosphatase acide.

Se manifeste également, bien qu'à un degré moindre, une activité phosphoamidase.

TABLEAU 2

Comparaison des équipements enzymatiques des souches de *S. cerevisiae* (1), *D. hansenii* (2) et *S. italicus* (3) isolées du fromage de Camembert

Enzymes	Moyenne			Ecart-type			Coefficient de variation en p. 100			Moyenne probable t (95 p. 100)		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
Phosphatase alcaline	2,9	1,9	1,6	0,5	0,9	1,6	17	49	96	2,58-3,32	1,20-2,60	0,64-2,59
Estérase (C4)	3,0	3,4	3,8	0,5	0,8	1,5	18	24	40	2,60-3,40	2,79-4,01	2,81-4,73
Estérase lipase (C8)	2,5	3,2	3,6	0,9	1,0	0,9	34	31	24	1,90-3,20	2,47-3,93	3,07-4,16
Lipase (C14)	0,2	0,3	0,45	0,3	0,2	0,5		69			0,17-0,53	
Leucine aminopeptidase	3,9	4,4	4,5	1,0	1,1	1,0	26	24	23	3,19-4,71	3,59-5,00	3,89-5,00
Valine aminopeptidase	0,4	0,7	0,8	0,2	0,4	0,5	53	60	68	0,24-0,56	0,38-1,02	0,44-1,10
Cystine aminopeptidase	0,4	1,2	1,5	0,2	0,6	0,6	53	49	36	0,24-0,56	0,76-1,64	1,19-1,89
Phosphatase acide	4,3	4,0	3,9	1,1	1,7	1,4	25	42	36	3,52-5,00	2,73-5,00	3,48-4,29
Phosphoamidase	2,0	2,7	0,9	0,8	1,2	0,2	37	44	25	1,48-2,62	1,81-3,59	0,75-1,02
α -glucosidase	0	0	0,04	0	0	0,1						
α -mannosidase	0,2	0	0,3	0,3	0	0,5						

Les résultats sont notés de 0 à 5.

Les chiffres des moyennes et des écarts-types sont arrondis à la décimale la plus proche.

Les activités non mentionnées sont nulles.

Entre l'équipement enzymatique de *S. italicus* et celui des espèces *S. cerevisiae* (fig. 2 a - 2 b) et *D. hansenii* (fig. 3 a - 3 b) on relève une certaine analogie. Les seules distinctions nettes portent sur deux systèmes enzymatiques, la phosphatase alcaline et la phosphoamidase, qui sont moins actifs chez *S. italicus* que chez *S. cerevisiae* et *D. hansenii* (tab. 2). En revanche, les profils caractéristiques des *Kluyveromyces* et de leurs formes imparfaites sont très différents [5].

L'analogie mise ainsi en évidence entre les profils de *S. italicus*, *S. cerevisiae* et *D. hansenii* souligne la parenté qui unit ces espèces. A ce propos, on peut d'ailleurs remarquer que la tendance actuelle de la classification [2] est de confondre en un seul et même groupe (*S. cerevisiae*) les espèces *S. italicus* et *S. cerevisiae*. On sait également que les espèces *S. cerevisiae* et *D. hansenii* sont très proches l'une de l'autre [4, 1].

Si l'on compare les réponses que fournissent les trois espèces aux tests biochimiques et physiologiques [1] et aux tests cultureux et morphologiques [4] on peut, en effet, constater que leur identification repose seulement sur quelques épreuves :

- Au plan biochimique :

- la fermentation et l'assimilation du raffinose, négatives chez *S. italicus*, et positives ou variables chez *S. cerevisiae* et *D. hansenii* ;

- les assimilations du cellobiose, de l'amidon, du xylose, du ribitol, de la salicine et de l'arbutine, positives pour *D. hansenii*, négatives pour *S. cerevisiae* et *S. italicus*.

- Au plan des caractères morphologiques :

- un pseudomycélium absent ou très primitif chez *D. hansenii* ;

- la présence de une à deux spores sphériques présentant une surface verruqueuse chez *D. hansenii*.

Comme ces critères d'identification restent, assez souvent, relativement difficiles à appliquer et à interpréter correctement, il était intéressant de mieux connaître l'équipement enzymatique des trois espèces afin de pouvoir, soit les différencier, soit au contraire confirmer leur parenté. L'allure des profils enzymatiques obtenus montre à l'évidence que *S. italicus*, *S. cerevisiae* et *D. hansenii* sont des espèces extrêmement proches, voire même, pour *S. italicus* et *S. cerevisiae*, identiques.

Résumé

L'étude du profil enzymatique de *S. italicus*, obtenu par une micro-méthode normalisée (API ZYM), montre que cette espèce est très proche de *D. hansenii* et qu'elle peut être confondue avec l'espèce *S. cerevisiae*, ce qui confirme la tendance actuelle de la classification des levures.

Par ailleurs, étant donné les niveaux enregistrés pour les activités estérasiqes et aminopeptidasiques, il paraît intéressant de procéder, chez cette espèce comme chez les autres espèces de levures dominantes du fromage de Camembert, à une étude approfondie de ces caractères.

Summary

CONTRIBUTION TO THE BIOCHEMICAL APTITUDES STUDY OF YEASTS ISOLATED FROM CAMEMBERT CHEESE II. COMPLEMENTARY EXPERIMENTS AND INTERPRETATIONS

The study of the enzymatic pattern of *S. italicus*, carried out using a standardized micromethod (API-ZYM) showest that this species is very close to *D. hansenii* and can be confused with the species *S. cerevisiae*; that confirms the present trend of yeast classification.

In another connection, considering the levels of esterase and aminopeptidase activities found, it seemed of interest to study thoroughly such enzymatic activities in this species as well as in the other ones with constitute the main yeast flora of Camembert.

Reçu pour publication en avril 1980.

Bibliographie

- [1] BARNETT (J. A.) and PANKHURT (R. J.) (1974). — A new key to the yeasts. 1 vol., *North Holland Publishing Company*, Amsterdam-London.
- [2] BARNETT (J. A.), PAYNE (R. W.) and YARROW (D.) (1979). — A guide to identifying and classifying yeasts. 1 vol., *Cambridge University Press*, Cambridge.
- [3] LAVIOLETTE (P.) (1979). — Sur une microméthode d'identification des activités enzymatiques. Revue de quelques résultats dans divers domaines d'application. (Communication personnelle).
- [4] LODDER (J.) (1971). — The yeasts. A taxonomic study, 1 vol., *North Holland Publishing Company*, Amsterdam-London.
- [5] SCHMIDT (J. L.), GRAFFARD (Christine) et LENOIR (J.). (1979). — Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de Camembert. I. Essais préliminaires. *Le Lait*, 583-584, 142-163.
- [6] 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, 355-370.
- [7] SCHMIDT (J. L.) et LENOIR (J.) (1980). — Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert (II). *Le Lait*, 595-596, 272-282.