

Etude de la reversion de la floculation des levures *Kluyveromyces lactis*

Bellal¹ M., Benallaoua² S., Ammouche A. et Bonaly³ R.

(1) Institut National Agronomique. El-Harrach. Alger

(2) INES de Biologie de Bejaia.

(3) Faculté de pharmacie de Nancy. France.

Résumé : Les levures *K. lactis* potentiellement floculantes forment des agrégats en milieu de sabouraud à base de glucose-peptone ou de mannose-peptone contenant 0.07mM de calcium. La synthèse des constituants responsables de la floculation est inhibée lorsqu'on substitue le galactose au glucose ou au mannose dans le milieu de culture. Les agrégats cellulaires de *K.lactis* sont stables dans un intervalle de pH 4.0 – 4.5 et de température de 30°C à 50°C. Les pH extrêmes et les températures supérieures à 60°C dispersent les agrégats cellulaires suite à la dénaturation des structures superficielles impliquées dans la floculation. Un effet analogue est obtenu par action d'enzymes protéolytiques (pronase, trypsine, chymotrypsine, et pepsine) sur des cellules de levures en état de floculation. Les agrégats cellulaires sont également dispersés, de façon spécifique, par des structures glucidiques ayant un groupement galactose terminal non réducteur. Ces résultats étayent l'hypothèse d'un mécanisme lectinique qui fait intervenir des récepteurs superficiels de nature glucidique.

Mots clés : levure, *Kluyveromyces lactis*, floculation, agrégats cellulaires, réversion.

Study of reversion floculation of *Kluyveromyces lactis* yeasts

Abstract : Flocculation of *K.lactis* occurred when these yeasts are grown in a peptone-glucose medium enriched with calcium ions. When glucose was replaced in the medium by galactose, the cells did not flocculate. In contrast, the substitution of glucose by mannose had no significant effect on growth and flocculation. The optimum pH of flocculation was around 4.5. Flocculation dispersion depends upon the nature of carbohydrate present, galactose being the most effective. Protease action depends upon both strains and enzymes. Data analysis of temperature shows identical values for activation energies of the flocculation dispersion reaction. These results lead to a biochemical flocculation mechanism which involves the binding of surface lectin to carbohydrates receptors.

Key words : Yeasts, *Kluyveromyces lactis*, Flocculation, Cell agragts, reversion.

INTRODUCTION

La floculation est le phénomène par lequel les cellules adhèrent ou s'agrègent pour former spontanément, au cours de leur cycle de croissance, des flocons pluricellulaires qui sédimentent ou flottent dans le milieu de culture (Stewart, 1975; Stewart et Russel, 1981).

Les analogies entre certaines caractéristiques de la floculation des levures et les mécanismes d'interaction des cellules d'organismes pluricellulaires, ont stimulé l'étude de ce phénomène particulièrement chez **Saccharomyces cerevisiae** et **Saccharomyces uvarum**. La fixation des bactéries ou de levures pathogènes sur un hôte serait sous la dépendance de phénomènes analogues qui font intervenir les structures externes de l'enveloppe cellulaire (Ofek et Sharon,1983; Sharon et Lis, 1993).

La multiplicité des facteurs et la complexité de leurs interactions font que le phénomène de floculation n'est pas toujours maîtrisé et qu'une même souche peut manifester des aptitudes floculantes variables au cours des cycles de fermentation. Elle peut changer de degré de floculation, devenir de plus en plus floculante ou inversement perdre cette propriété (Patel et Ingledew,1975).

Les mécanismes de floculation,encore mal définis, font intervenir les parties externes des parois cellulaires (Jeune-Ramos et al., 1964 ; Kamada et Murata,1984). Ils dépendent de plusieurs facteurs, habituellement classés en deux groupes: facteurs intrinsèques et facteurs extrinsèques. Ainsi, la floculation est un caractère génétique dont l'expression phénotypique dépend de plusieurs gènes (Thorne,1951; Lewis et al., 1976). Des travaux récents ont montré que ce phénomène est en premier lieu contrôlé par un gène (FLO1) dont l'expression phénotypique peut-être modifiée par d'autres gènes qui ne lui sont pas liés (Russel et al.,1980).

Par ailleurs, le caractère floculant est influencé par les facteurs nutritionnels; ainsi le glucose, le saccharose et le maltose sont considérés comme des agents dispersifs des agrégats cellulaires et par conséquent, empêchent la floculation de **Saccharomyces uvarum**, alors que certaines glycoprotéines sont reconnues comme inducteurs de la floculation de cette levure (Taylor et Orton, 1973; Fuijino et Yoshida, 1976). Selon Amri et al., (1979), les vitamines, les acides aminés et surtout le rapport Ca^{++} / K^{+} dans le milieu de culture constituent des facteurs déterminants de la floculation de **Saccharomyces uvarum**. D'autres auteurs tels que Mill (1964), Calleja et Johnson (1970) et plus récemment, Mik et al., (1981); Kida et al., (1989), ont montré que les agrégats cellulaires peuvent-être dispersés par les facteurs liés à l'environnement tels que le pH, la température et l'aération.

Des études faites sur les parois des levures ont montré que le potentiel génomique de la floculation est exprimé au niveau de la structure pariétale (Ballou,1974). Selon Lyons et Hough (1971) puis Russel et al., (1980), la floculation des levures est liée aux phosphopeptidomannanes pariétaux . Ces résultats ont été

confirmés pour les levures **K. bulgaricus** (Al Mahmood et al., 1986) et **K. lactis** (Bellal et al., 1995).

Miki et al., (1982), Nishihara et al., (1976, 1982) puis Hodgson et al., (1985) ont montré que des traitements enzymatiques, thermiques ou chimiques appliqués à des levures **Saccharomyces** floculantes leur font perdre l'aptitude à floculer; ces traitements altèrent les structures superficielles de la paroi.

De nombreux travaux ont porté particulièrement sur la floculation des levures appartenant au genre **Saccharomyces**. Afin de préciser si des mécanismes différents interviennent dans chaque cas de floculation, nous avons étudié dans le présent travail l'influence de certains facteurs du milieu et l'action d'enzymes protéolytiques sur la floculation de levures **Kluyveromyces lactis** haploïdes.

MATERIEL ET METHODES

1. Micro-organismes.

Nous avons utilisé trois souches **Kluyveromyces lactis** haploïdes qui se distinguent par leur pouvoir floculant et désignées comme suit:

- Klif : souche très floculante
- Klmf: souche modérément floculante
- Klff: souche faiblement floculante

2. Milieu de culture.

Nous avons utilisé le milieu de sabouraud (1 % Bactopeptone, 2 % glucose), favorable à la croissance et à la floculation. La concentration finale en calcium dans le milieu de culture est de 0.07mM.

Les cultures ont été conduites en aérobiose à 25°C dans un fermenteur Biolafite contenant 1,5 litres de milieu de culture. L'aération est assurée par barbotage d'air stérile. Les levures en état de floculation ont été récoltées par centrifugation, après 48 heures de croissance.

3. Mesure de la croissance.

La croissance des levures est évaluée par la mesure de l'absorbance d'une suspension de levures à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre type Coleman J.

4. Mesure de la floculation

Le pourcentage de floculation est mesuré directement dans le milieu de culture ou en tampon acétate de Helm. Pour cela, 10ml d'une suspension de levure sont placés dans un tube calibré et agités énergiquement; on mesure alors la densité

optique (DO1); la suspension de levure est laissée à température ambiante pendant 30 minutes et on mesure la densité optique (DO2). Le pourcentage de floculation est calculé selon l'expression préconisée par Eggset et al., (1983):

$$\% \text{ FLO} = \left(1 - \frac{\text{DO1}}{\text{DO2}} \right) \times 100.$$

5. Etude de la réversion de la floculation

5.1. Influence du pH.

Une suspension de levure à l'état floculant (10ml dans le milieu de culture ou dans le tampon acétate de Helm) est soumise à des variations de pH de 2 à 9 par addition de HCl 1N ou NaOH 1N pour obtenir le pH désiré. Le pourcentage de floculation est alors déterminé.

5.2. Influence de la température.

Après croissance et floculation, 10 ml d'une suspension de levure sont prélevés et portés à des températures variant de 30°C à 100°C pendant des temps allant de 1 à 10 minutes. L'effet réversible ou non de la température sur les agrégats cellulaires est évalué, après refroidissement de la suspension à 25°C, par la mesure du pourcentage de floculation.

5.3. Action des oses et dérivés glucidiques.

L'effet dispersif des oses et dérivés sur les agrégats cellulaires a été étudié en ajoutant à la suspension de levure floculante des quantités croissantes de différents oses et dérivés. Après agitation à 25°C, la défloculation doit être immédiate et totale pour les sucres les plus actifs.

5.4. Action d'enzymes protéolytiques.

10mg de cellules fraîches de levures en état de floculation (Kl.f, Kl.mf, Kl.ff) ont été mis en suspension dans 10ml de tampon acétate de sodium 0.1M à pH 4.2 puis traités par la pronase.

La même quantité de cellules a été mise en suspension dans le tampon Tris-HCl 0.1M à pH 7.5 puis traitée par 5mg de trypsine, de chymotrypsine ou pepsine. L'incubation a été faite à 36°C pendant 60 minutes. Après centrifugation et lavage à l'eau distillée, les tests de floculation ont été effectués. Le pourcentage de floculation est comparé à celui d'un témoin (cellules non traitées).

RESULTATS

1. Croissance et floculation.

De nombreux facteurs physico-chimiques et nutritionnels sont déterminants pour la floculation des levures. La nature du substrat ou du milieu de culture a une influence marquée sur le métabolisme de la levure et peut entraîner directement ou indirectement une variation de la floculation voire de la croissance.

La cinétique de croissance des souches a été suivie en milieu de sabouraud à base de glucose et peptone contenant 0.07 de CaCl_2 . Les résultats illustrés par la figure 1, indiquent que les souches se développent de façon analogue et les courbes de croissances sont similaires; toutefois, les vitesses de croissance des souches faiblement floculantes et modérément floculantes sont légèrement plus élevées que celle de la souche très floculante. Dans ce milieu de culture, le pourcentage de floculation maximal est observé après 48 heures de croissance (phase stationnaire) et représente 61%, 46%, et 25% respectivement pour les souches Klff, Klmf, Klff.

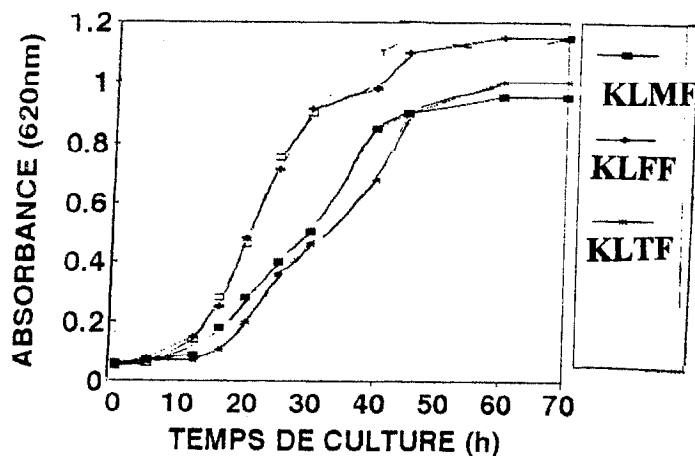


Fig. 1: Cinétique de croissance des trois souches *K. lactis* en milieu de sabouraud à base de glucose-peptone.

Lorsque l'on remplace, dans le milieu de culture, le glucose par le galactose, la croissance des souches n'est pratiquement pas affectée, cependant leur floculation disparaît. En revanche, la substitution du glucose par le mannose n'a pas d'effet sur la croissance et la floculation des souches (tableau 1). Ce résultat indique que les souches **K. lactis** synthétisent le facteur responsable de la floculation à partir du glucose et mannose et cette synthèse est inhibée par le galactose.

2. Influence du pH sur la floculation.

Au cours de la croissance des souches **K.lactis**, le pH du milieu de culture évolue pour atteindre des valeurs comprises entre 4.0 et 4.5. L'effet du pH a été étudié en milieu de culture et en solution tampon acétate de Helm. Les résultats illustrés par la figure 2 (a et b) indiquent que les variations de pH affectent la stabilité des agrégats cellulaires de **K.lactis**. Lorsque le pH est inférieur à 3.0 ou supérieur à 6.0, on observe une dispersion des cellules floculées. L'intensité maximale de floculation se situe entre pH 4.0 et 5.0. Les résultats montrent, par ailleurs, une similarité entre l'effet du pH en milieu de culture et en tampon acétate de Helm.

3. Influence de la température sur la floculation

L'influence de la température sur la stabilité des agrégats cellulaires est illustrée par la figure 3 (a,b et c). Pour des températures inférieures à 50°C les agrégats cellulaires des trois souches, plus ou moins floculantes, sont stables. Les températures supérieures à 50°C entraînent une baisse du pourcentage de floculation, variable selon le caractère floculant de la souche. En effet, les agrégats cellulaires des souches faiblement et moyennement floculantes (Klmf et Klff) sont plus sensibles aux traitements thermiques que ceux de la souche très floculante (Kltf). Dans le premier cas, les agrégats sont totalement dispersés en 8 minutes d'exposition aux températures respectives de 60°C et 70°C; alors que pour ceux de la souche très floculante la dispersion totale des agrégats n'est observée qu'à 100°C, pour une même durée d'exposition. A ces températures, la dispersion des agrégats cellulaires est irréversible dans tous les cas. Ces résultats semblent indiquer que les constituants impliqués dans le phénomène de floculation sont plus ou moins thermolabiles selon le degré de floculation de la souche, ce qui laisse penser que leur structure serait voisine mais différente.

Par ailleurs, lorsque les levures floculantes sont mises en suspension dans un milieu de culture préalablement chauffé à 100°C pendant 5 minutes, elles floculent; par contre, des levures chauffées à 100°C pendant 5 minutes et remises dans un milieu de culture non chauffé, ne floculent plus même si le milieu de culture est enrichi en

TABLEAU 1: TAUX DE CROISSANCE ET POURCENTAGE DE FLOCCULATION DES SOUCHES *K. LACTIS* EN FONCTION DU MILIEU DE CULTURE.

Souches	M ₁		M ₂		M ₃	
	μ (h ⁻¹)	% Flo	μ (h ⁻¹)	% Flo	μ (h ⁻¹)	% Flo
<u><i>KL</i></u> 9a (MF)	0.30 ± 0.1	45.6 ± 2.2	0.29 ± 0.1	43.4 ± 2.1	0.29 ± 0.1	0.0
<u><i>KL</i></u> 9b (FF)	0.31 ± 0.1	25.3 ± 1.5	0.30 ± 0.1	24.1 ± 1.4	0.30 ± 0.1	0.0
<u><i>KL</i></u> 9c (TF)	0.29 ± 0.1	60.8 ± 4.0	0.29 ± 0.1	56.5 ± 3.6	0.28 ± 0.1	0.0

Les valeurs indiquées sont les résultats moyens de 3 essais (± SD).

Nota : M₁: Milieu de culture, glucose - peptone.
M₂: Milieu de culture, mannose - peptone.
M₃: Milieu de culture, galactose - peptone.
% Flo: Pourcentage de floculation.
 μ : Taux de croissance (h⁻¹).

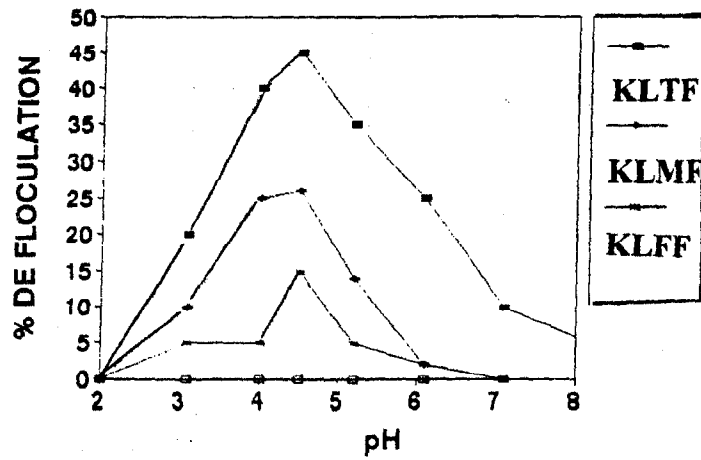
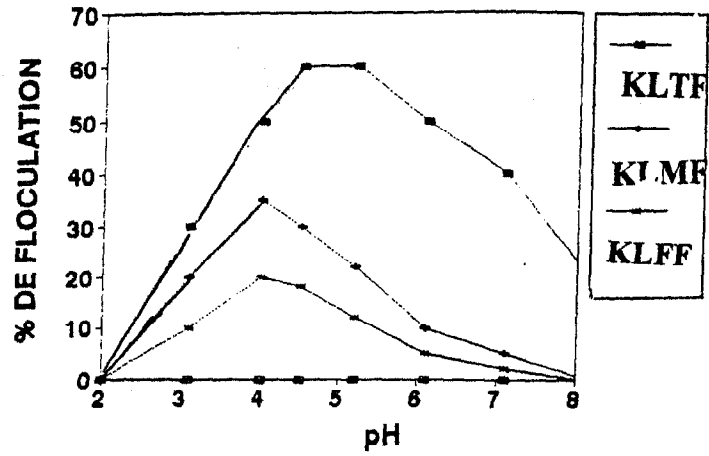


Fig. 2: Effet du pH sur les agrégats cellulaires de *K. lactis* en milieu de culture (a) et en acétate de Helm(b).

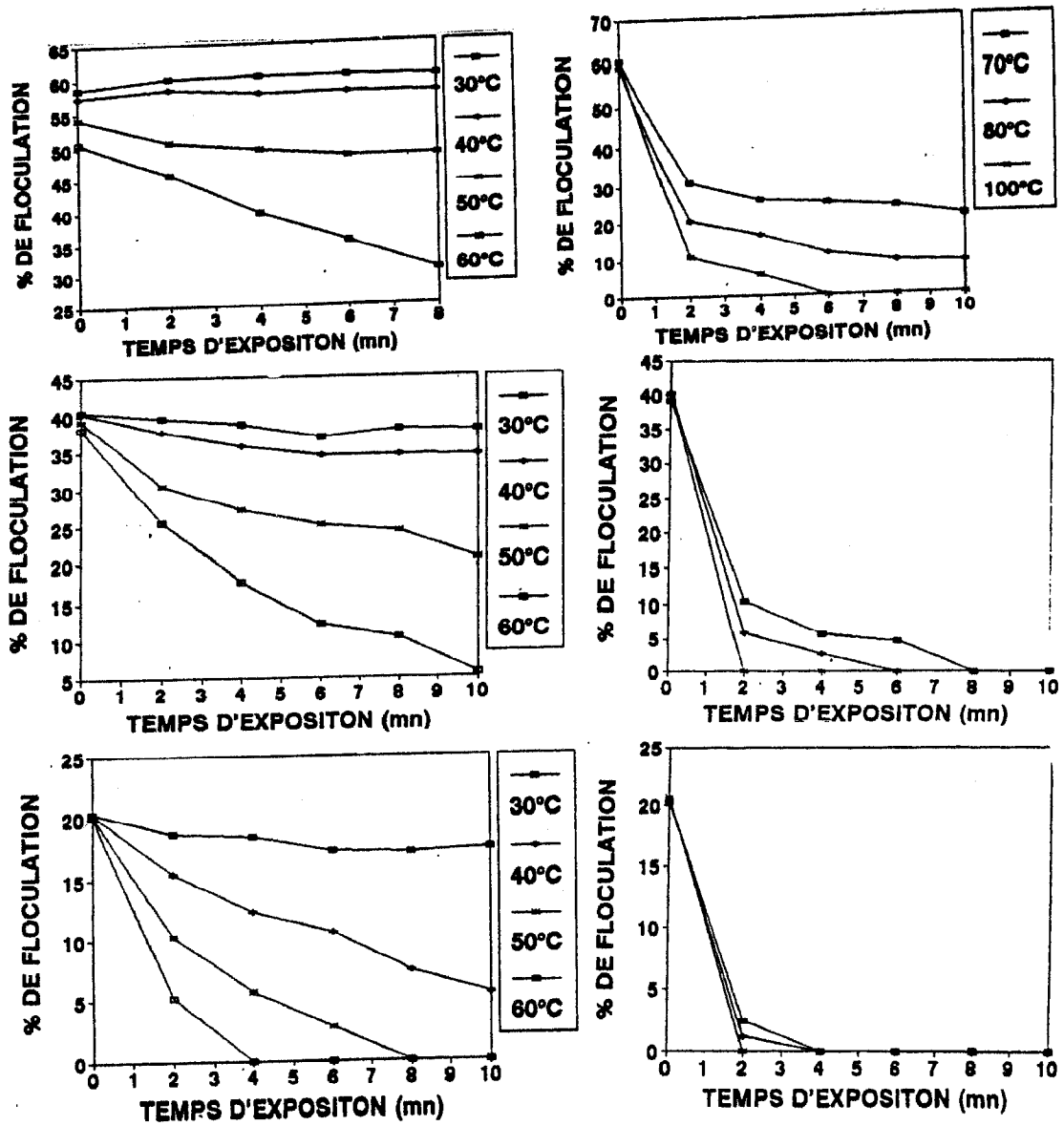


Figure 3. Influence de la température sur les agrégats cellulaires de *K. Lactis* (KLTF) (de haut en bas : fig. 3a, 3b, 3c)

Ca^{++} . Ce résultat indique, d'une part qu'il n'y a pas, dans le milieu de culture, des constituants thermolabiles impliqués dans la floculation et, d'autre part, que les structures superficielles de la paroi responsables de la floculation sont dénaturées par un traitement thermique à 100°C.

4. Réversion de la floculation par les oses et dérivés.

Les oses, monosaccharides en particulier, ont une action sur la stabilité des levures au cours de la floculation. Suivant la souche de levure, le sucre a un effet spécifique plus ou moins marqué. L'influence des oses a été étudiée en ajoutant des quantités croissantes d'oses ou dérivés dans la suspension de levure en état de floculation dans le milieu de culture. Les résultats rassemblés dans le tableau 2 attestent que les agrégats de *K.lactis* sont dispersés, de manière réversible, particulièrement par le D-galactose et le D-fucose. Ils indiquent également que seules les structures glucidiques ayant un groupement galactose du côté terminal non réducteur se comportent comme des inhibiteurs dont l'effet est plus ou moins marqué sur la floculation de *K.lactis* haploïde. Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour la levure *K. bulgaricus* par Hussain et al., (1986).

L'effet défloculant du galactose semble spécifique aux levures du genre *Kluyveromyces*, puisque les agrégats cellulaires des levures *Saccharomyces* sont dispersés par le mannose et dérivés. Par ailleurs, lorsque la fonction alcool primaire sur le C6 du D-galactose est oxydée ou absente l'efficacité défloculante du sucre est réduite.

5. Action d'enzymes protéolytiques.

De nombreux travaux ont confirmé le rôle des constituants protéiques dans la formation des agrégats cellulaires (Nishirara, 1977; Nishihara et al., 1987). Lorsque les levures *K.lactis* en état de floculation sont traitées par pronase, la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine leur aptitude à flocculer diminue (tableau 3). Pour un même temps d'action, la baisse du pouvoir flocculant dépend de la nature de l'enzyme et de la souche. Dans nos conditions expérimentales, la pronase est plus active. D'après Waxdal (1971) les sites d'action des protéases sur un peptide sont spécifiques. Ainsi, la chymotrypsine hydrolyse les liaisons peptidiques côté carboxylique des acides aminés aromatiques; par contre, la trypsine a pour sites potentiels les liaisons peptidiques côté carboxylique de la lysine ou de l'arginine, alors que la pepsine agit côté amine (NH_2) des acides aminés hydrophobes. L'action de ces trois enzymes est bloquée par la proline. Quant à la pronase, elle hydrolyse les liaisons peptidiques de la chaîne protéique à l'exclusion de la liaison acide aspartique-N-acétylglucosamine. Ainsi, l'action des enzymes protéolytiques sur le comportement flocculant des trois souches *K.lactis* peut-être attribuée à la nature des

Tableau 2 (a) . Quantités d'oses et dérivés fortement inhibiteurs, nécessaires a la réversion de la floculation de *K. Lactis*

Oses et dérivés	Souches	K L 9a 5MF)	K L 9b (FF)	K L 9c (TF)
D- Galactose		2.7 ± 0.6	5.6 ± 0.5	8.6 ± 0.7
D- Fucose		10.3 ± 0.8	7.4 ± 0.6	12.4 ± 1.10
D- Galactose- 6- P		4.8 ± 0.4	4.1 ± 0.3	5.2 ± 0.4
Méthyl α D galactopyranoside		13.1 ± 0.3	10.5 ± 1.0	14.2 ± 1.5
O- Nitrophényl α D galactopyranoside		6.5 ± 0.6	5.3 ± 0.4	8.3 ± 0.7
P- Nitrophenyl α D galactopyranoside		5.5 ± 0.5	4.5 ± 0.4	7.3 ± 0.6

Tableau 2 (b). Classification des oses et dérivés selon leur effet inhibiteur sur la floculation de *K. Lactis*

Inhibiteurs q < 20 mg/ml	Faiblement inhibiteurs 20 < q < 50 mg/ml	Non inhibiteurs q > 120 mg/ml
D- Galactose	D - Lactose	L - Galactose
D- Fucose	D - Mellibiose	L - Fucose
D- Galactose- 6- P	D - Raffinose	D - Mannose
Méthyl α D galactopyranoside	D - Galactosamine	D - Glucose
O- Nitrophényl α D galactopyranoside	N - Acétyl - D - galactosamine	L - Glucose
P- Nitrophenyl α D galactopyranoside	D - Acide - galacturonique	D - Glucosamine
	L - Arabinose	D - Mannosamine
		D - Glucose - 6 - P
		D - Mannose - 6 - P
		Méthyl α D glucopyranoside

Tableau 3. Action d'enzymes proteolytiques sur la floculation des souches *K. Lactis*

Enzymes	Souches	K L 9a (MF)	K L 9b (FF)	K L 9c (TF)
Témoin		40.3 ± 2.0	20.2 ± 1.1	60.5 ± 2.5
Pronase		5.4 ± 0.4	00	10.3 ± 0.6
Trypsine		5.6 ± 0.5	00	20.7 ± 1.2
Pepsine		2.5 ± 0.1	00	15.1 ± 1.0
Chymotrypsine		5.8 ± 0.5	00	20.5 ± 1.1

Résultats exprimés en pourcentage de floculation
 Les valeurs indiquées sont les résultats moyens de 3 essais (± SD)

Nota : MF : souches moyennement floculantes
 FF : souches faiblement floculantes
 TF : souches très floculantes

protéines pariétales spécifiques dont la biosynthèse serait liée au type de gène qui gouverne la floculation de la souche (Hodgson et al., 1985).

DISCUSSION

L'expression phénotypique de la floculation des levures est une manifestation génétiquement définie, soumise aux influences des facteurs nutritionnels et physico-chimiques liés à l'environnement de la croissance des levures.

En milieu de culture à base de glucose-peptone contenant 0.07mM de calcium les trois souches de **K.lactis** floculent. Dans ces conditions, elles synthétisent les structures nécessaires à leur floculation à partir du glucose; cette synthèse est inhibée lorsqu'on remplace, dans le milieu de culture, le glucose par le galactose qui est un puissant dispersant des agrégats cellulaires de **K. lactis**.

Lorsqu'on fait varier le pH du milieu, la floculation maximale est observée dans l'intervalle de pH 4.0 à 4.5. De tels résultats ont été obtenus dans d'autres cas de floculation (Mill, 1964; Porter et Cauley, 1965; Hussain et al., 1986). L'action du pH sur la stabilité des agrégats cellulaires est attribuée à la rupture des liaisons intercellulaires ce qui indique que la floculation dépend, en outre, du degré d'ionisation des groupements à la surface des cellules au pH optimal de la floculation.

Au pH optimal de la floculation, des températures supérieures à 60°C dispersent les agrégats de **K.lactis**. L'effet de la température (inférieure à 60°C) est réversible, dans ce cas, la rupture des liaisons intercellulaires résulterait d'un changement conformationnel des structures (glycoprotéines) superficielles impliquées. Par contre, aux températures élevées (supérieures à 60°C) l'effet est irréversible ce qui indique que la rupture des liaisons intracellulaires résulte, alors, d'une dénaturation des structures.

Le fait que l'action de la température soit plus ou moins prononcée selon le degré de floculation de la souche permet de suggérer que les structures impliquées seraient différentes. D'après Hodgson et al.,(1984), la biosynthèse de ces structures est régulée par un gène qui gouverne la floculation de la souche. Cette hypothèse est confirmée par l'action d'enzyme protéolytique qui varie selon le degré de floculation de la souche. L'action plus marquée de la pronase sur le pouvoir floculant des trois souches semble étayer l'hypothèse selon laquelle la nature des glycoprotéines superficielles varie en fonction du caractère floculant et révèle leur importance dans la floculation (Nishihara et al., 1987; Kamada et Murata, 1984). D'après Hodgson et al.,(1984), chez **Saccharomyces cerevisiae**, dont les agrégats cellulaires sont stables à de hautes températures, la floculation est gouvernée simultanément par les gènes FLO1 et FLO5, ce dernier serait responsable de la synthèse d'une protéine superficielle thermorésistante.

L'effet défloculant des oses indique que la floculation des levures appartenant au genre **Kluyveromyces** se distingue de celle des levures **Saccharomyces** par une spécificité bien définie. En effet, chez les levures **K.lactis** les oses les plus actifs sur la floculation ont des structures similaires à celle du D-galactose; en revanche, les levures **Saccharomyces** sont défloculées par des structures glucidiques similaires à celles du mannose (Taylor et Orton, 1978; Amri et al., 1981; Hussain et al., 1986). La nécessité d'une telle spécificité, pour que les oses soient actifs, impose que ceux-ci soient reconnus par des molécules impliquées dans la floculation et qu'ils soient présents sur la surface cellulaire. De tels mécanismes ont été mis en évidence dans d'autres phénomènes biologiques analogues qui mettent en jeu des molécules de type lectinique (Miki et al.,1982; Ofek et Sharon,1983; Al-Mahmood et al.,1988; Sharon et Lis,1993).

Références

- Al-Mahmood S., Giumentelli P., Bonaly R., Delmotte F., et Monsigny M., 1988. Kluyveromyces bulgaricus yeast lectins: isolation of N-acetyl-glucosamine and galactose specific lectins, their relation with flocculation. J. Biol., Microbiol., 263, 3930-3934.
- Amri M. A., Bonaly R., Duteurtre B., et Moll M., 1979. Interaction between Ca⁺⁺ and K⁺ ions in the flocculation of two brewer's yeast strains. Eur. J. Appl. Microbiol., 1, 235-240.
- Amri M. A., Bonaly R., Duteurtre B., et Moll M., 1981. Growth and flocculation of two Saccharomyces uvarum strains. Eur. J. Appl. Microbiol., 1, 227-234.
- Ballou C. E., 1974. Some aspects of structure immunochemistry and genetics control of yeast mannans. Adv. in Enzymol., 40, 239-270.
- Bellal M.M., Boudrant J., Elfoul L. et Bonaly R., 1995. Flocculation dispersion in Kluyveromyces lactis. Proc. Biochem., vol., 30, N°7, 641-648.
- Calleja G. B., et Johnson B. F., 1970. Flocculation in Schizosaccharomyces pombe. Can. J. Microbiol., 20, 797-803.
- Eggest G., Stenberg E. et Kjosbbaken J., 1983. Flocculation of a Methylomonas sp. possible involvement of surface protein. J. Gen. Microbiol., 129, 3611-3617.
- Fujino S. et Yoshida T., 1976. Premature flocculation of yeast induced by some wort constituents. Rept. Res. Lab. Kirin. Brew., 19, 45-53.
- Hodgson J.A., David R. B., et Johnston J. R., 1984. Discrimination by heat and protease treatments between flocculent phenotypes conferred on Saccharomyces cerevisiae by gene FLO1 and FLO5. J. Gen. Microbiol., 131, 32119-3227.
- Hussain T., Salhi O., Lematre J., Charpentier C., et Bonaly R., 1986. Comparative studies of flocculation of Saccharomyces uvarum and Kluyveromyces bulgaricus. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 269-273.
- Junehomme Ramos Cl., Castiau M., et Masschelein Ch.A., 1964. Flocculation et variabilité de la fraction mannane protéines au cours de la croissance de la levure. Rev. Ferm. Ind. Alim., 19, 18-22.

- Kamada K. et Murata M., 1984. Flocculating activity on the cell surface of brewer's yeast. *Nipp. Nogeikagaku kaishi*, 58,977-982.
- Kida K., Yamadaki M., Asano S.I., Nakata T., et Sonoda Y., 1989. The effect of aeration on stability of continuous ethanol fermentation by a flocculating yeast. *J. Ferment. Bioeng.*, 68,107-111.
- Lewis C.W., Johnston J.R., et Martin P.A., 1976. Genetic of flocculation yeast. *J. Inst. Brew.*,82,158.
- Lyons T.P. et Hough J.S., 1971. Further evidence for the cross-bridging hypothesis for flocculation of brewer's yeast. *J. Inst. Brew.*,77,300-305.
- Miki B.L., Poon N.H. et Seligny V.L., 1982. Repression and induction flocculation interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, 150, 690-899.
- Mill P. J., 1964. The effect of nitrogenous substances on time of flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 35,53-60.
- Nishihara H., Toraya T. et Fukui S., 1976. Factors affecting flocculation of brewer's yeast. *J. Ferment. Technol.*, 54,315-355.
- Nishihara H., 1977. Effect of chemical modification of cell surface components of a brewer's yeast on the flocc ability. *Arch. Microbiol.*, 115, 19-23.
- Nishihara H., Toraya T., et Fukui S., 1987. Essential role of cell surface protein and carbohydrate components in flocculation of a brewer's yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2721-2726.
- Ofek I., et Sharon N., 1983. Comment les bactéries adhèrent aux cellules. *La Recherche*, 14, 376-318.
- Patel G. et Ingledew W.M., 1975. A flocculation test for moderately flocculent brewing yeast. *J. Inst. Brew.*, 81, 123-126.
- Porter A.H., et Cauley R.J., 1965. Studies on flocculation I: a relationship between pH and calcium content of growth medium. *J. Inst. Brew.*, 71,175-179.
- Russel I., Stewart G.G., Reader H.P., Johnston J.R. et Martin P.A., 1980. Revised nomenclature of gene that control yeast flocculation. *J. Inst. Brew.*, 86,120-121.

Sharon N. et Lis H., 1983. Sucres et reconnaissance cellulaire. *Pour la Science*, 185,58-66.

Stewart G.G., 1975. Yeast flocculation: practical implication and experimental finding. *Brew. Digest*, 3,42-60.

Stewart G.G. Russel I., 1981. Yeast flocculation. *Brew. Sciences*, 6, 61-92.

Taylor N.W. et Orton W.L., 1973. Effect of alkaline-earth metal salts on flocculence in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 79,294-297.

Thorne R.S.W., 1951. Some aspects of flocculation. *Proc. Eur. Brew. com. Brighton*, 10,4121-4129.

Waxdal M.J., 1971. Selective cleavage of protien. *J. Agric. Food, Chem.*, 19,632-637.