



HAL
open science

Influence de certaines conditions de la culture superficielle sur la production des lipases et des protéases par des souches de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium candidum*

L. Stepaniak, K. Kornacki, J. Grabska, E. Wodecki

► To cite this version:

L. Stepaniak, K. Kornacki, J. Grabska, E. Wodecki. Influence de certaines conditions de la culture superficielle sur la production des lipases et des protéases par des souches de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium candidum*. *Le Lait*, 1980, 60 (591_592), pp.45-55. <hal-00928845>

HAL Id: hal-00928845

<https://hal.science/hal-00928845v1>

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.



HAL Authorization

**Influence de certaines conditions
de la culture superficielle sur la production des lipases
et des protéases par des souches
de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium candidum***

par

L. STEPANIAK*, K. KORNACKI*, J. GRABSKA* et E. WODECKI**

I. INTRODUCTION

Au cours des dix dernières années, des recherches ont été poursuivies, surtout par des auteurs français, qui ont permis de faire connaître, sur un plan assez large, l'importance et la nature de l'action des lipases et des protéases produites par les moisissures *P. roqueforti* et *P. caseicolum* [6, 7, 11, 12, 13, 14, 15]. Les travaux de Desmazeaud *et al.* [4], Gripon *et al.* [8] ont mis en évidence que les protéases de streptocoques lactiques et celles de *P. roqueforti* et *P. caseicolum* différaient entre elles par leurs activités endo- et exopeptidasiques dans leur action sur les protéines de la pâte du fromage. Desmazeaud et Gripon [3] ont décrit le mécanisme général de la dégradation des protéines du fromage sous l'influence de la présure, de la microflore du lait et des moisissures. Gripon [6] qui étudiait les moisissures de *P. roqueforti*, ainsi que Lenoir et Auberge [13] qui s'occupaient de *P. Caseicolum*, ont démontré que ces moisissures produisaient un système compliqué de protéases qui pourraient être classées en plusieurs groupes. Nos études [10] ont révélé que les lipases de *P. roqueforti* et de *P. caseicolum* se caractérisaient par une spécificité élevée pour les acides gras de la matière grasse du lait. C'est le caractère avantageux, l'utilisation de préparations lipolytiques dans la technique laitière étant prise en considération. Pourtant, lorsque l'on compare les nombreux travaux sur la détermination

* Laboratoire de Production des Biopréparations lactiques.

** Institut du Génie et de la Biotechnologie alimentaire, Université de Technologie agricole, Olsztyn (Pologne).

des paramètres optimaux de la culture qui favoriseraient la biosynthèse des lipases et des protéases par des moisissures dans la fabrication des fromages, des différences considérables peuvent être observées dans les résultats qui étaient obtenus par divers auteurs [5, 9, 12, 15, 18, 20].

Cela pris en considération, il nous semblait utile de rechercher l'étendue de l'interaction de paramètres choisis de la culture sur la production des lipases et des protéases extracellulaires. Pour atteindre cet objectif, une expérience a été effectuée dans le plan orthogonal de deuxième degré, ce qui nous a permis de déterminer la corrélation des facteurs variables étudiés et de les décrire au moyen des équations de régression.

II. MATERIEL ET METHODES

Pour nos recherches, des souches de *P. candidum* n° 11 ont été choisies, ayant des caractères morphologiques identiques à ceux de *P. caseicolum* (Bainier), ainsi que des souches de *P. roqueforti* n° 23. Ces souches provenaient de la collection du Laboratoire de production des biopréparations lactiques à Olsztyn.

Les moisissures étaient cultivées sur le milieu de Czapek, modifié, par Lenoir et Choisy [14], par addition de glucose et de peptone, ainsi que de la solution d'oligoéléments, sans que des solutions tampons fussent employées pour stabiliser le pH du milieu. Des cultures superficielles étaient réalisées dans des bouteilles à plasma, d'un volume de 500 ml et de 8 cm de diamètre. Le milieu étaitensemencé avec la suspension des spores de la culture des moisissures, en quantité suffisante pour obtenir 1×10^5 germes par ml de milieu. La culture était réalisée à 25° C.

La durée de la culture, les valeurs initiales de pH du milieu, l'épaisseur de la couche du milieu et la concentration de glucose dans le milieu étaient déterminées par les conditions de l'expérience dans le plan orthogonal de deuxième degré [16].

L'activité lipolytique était déterminée par rapport à l'émulsion de la matière grasse du lait par la méthode pH-statique. Le substrat était préparé d'après les méthodes de Perry *et al.* [19] et de San Clemente et Vadehra [21]. La mesure à 37° C et à pH = 7,2 était effectuée pendant 5 min. Pour la titration électrométrique, l'ensemble des dispositifs « Radiometer », Copenhague (pH-mètre PHM6, titrimètre TTT60, autoburette ABU-13, servographe REC61/REA160). Il était admis qu'une unité d'activité lipolytique (μ AL) correspondait à 1 micromole des acides gras libres, libérés, pendant 1 h, de 9 ml de substrat par 1 ml de liquide après-culture. L'activité protéolytique était déterminée par la méthode d'Anson [1].

TABLEAU 1

Equations décrivant l'influence des quatre paramètres de culture sur la production des lipases et des protéases extracellulaires par des souches de *P. roqueforti* 23 et *P. candidum* 11

Y =	a	+ x ₁	+ x ₂	+ x ₃	+ x ₄	+ x ₁ ²	+ x ₁ .x ₂	+x ₁ .x ₃	+x ₁ .x ₄	+ x ₂ ²	+ x ₂ .x ₃	+ x ₂ .x ₄	+ x ₃ ²	+ x ₃ .x ₄	+ x ₄ ²
valeurs pour « x »															
<i>P. roqueforti</i> 23															
Y ₁ =	+ 30,35	- 9,55	+ 2,22	- 2,31	- 8,73	+ 1,06	- 0,29	+ 0,33	+ 1,73	- 0,01	- 0,03	- 0,17	+ 0,06	+ 0,21	0,00
Y ₂ =	+ 54,97	- 14,15	- 0,18	+ 0,22	+ 1,67	+ 1,03	+ 0,00	0,00	+ 0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	- 0,29	0,00
Y ₃ =	+ 156,93	- 40,74	- 0,71	- 0,46	- 10,04	+ 3,03	- 0,07	0,00	+ 2,75	+ 0,01	+ 0,02	- 0,18	0,00	0,00	0,00
<i>P. candidum</i> 11															
Y ₁ =	- 16,71	+ 27,59	- 5,76	+ 8,93	- 7,17	- 1,97	+ 0,27	- 0,56	- 4,18	+ 0,06	- 0,11	+ 0,48	- 0,08	+ 0,38	+ 2,19
Y ₂ =	+ 25,92	- 2,08	- 0,36	- 0,30	+ 3,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	+ 0,02	0,00	0,00	+ 0,11	- 1,45
Y ₃ =	+ 18,88	+ 12,79	- 1,67	+ 1,99	- 18,34	- 1,96	+ 0,12	- 0,31	+ 3,40	0,00	+ 0,02	+ 0,12	0,00	0,00	- 2,09

Y₁ — Activité lipolytique.

Y₂ — Activité protéolytique à pH 5,5.

Y₃ — Activité protéolytique à pH 7,0.

x₁ — pH initial du milieu (4,6 - 7,4).

x₂ — épaisseur de la couche du milieu (5 - 35 mm).

x₃ — durée de la culture (4 - 20 j).

x₄ — Teneur du milieu en glucose (0,2 - 3,4 p. 100).

La caséine, obtenue de la compagnie Fluck, préparée selon Hammarsten, était mise en solution jusqu'à concentration de 2 p. 100 au moyen de 0,15M tampons de phosphate à pH 5,5 et 7,0.

Comme unité de l'activité protéolytique (μ AP), on a adopté l'augmentation de densité optique de 0,01 unité de l'échelle spectrophotométrique dans le filtrat du mélange de liquide après-culture (1 ml) et de substrat (9 ml), après incubation d'une heure à 37° C, additionné du réactif de Folin. Le filtrat était obtenu en ajoutant au substrat, après l'incubation, une quantité égale d'acide trichloracétique de 12 p. 100.

Pour atteindre l'objectif proposé, nous avons entrepris un essai orthogonal du deuxième degré que nous avons réalisé d'après la formule :

$$n = 2k + 2k + 1,$$

où : k = nombre des variables

$$n = \text{nombre total des essais [16, 23].}$$

La disposition détaillée de l'expérimentation en forme de matrice a été déduite des données suivantes :

Facteur	Niveau de base	Intervalle de variations
$x_1 = \text{pH initial de milieu}$	6,0	1,4
$x_2 = \text{temps de culture/j}$	12,0	8,0
$x_3 = \text{épaisseur de la couche du milieu}$	25,0	20,0
$x_4 = \text{teneur du milieu en glucose}$	1,8	1,6

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des essais étaient analysés d'après Manczak et Zielinski [16, 23]. On y utilisait le « plan uniforme de rotation (Uniform rotatable design) qui consiste en unité de précision. A l'aide d'un calculateur numérique, la surface de régression était analysée et on en vérifiait les équations. La signification de l'influence des facteurs et de leur coopération était déterminée en vérifiant l'hypothèse selon laquelle chaque coefficient de régression est égal à « zéro » ; le niveau de signification établi « $\alpha = 0,05$ » permet de se servir des équations de régression vérifiées comme des relations de prédiction, avec une marge de 5 p. 100 comme risque d'erreur.

Penicillium roqueforti 23

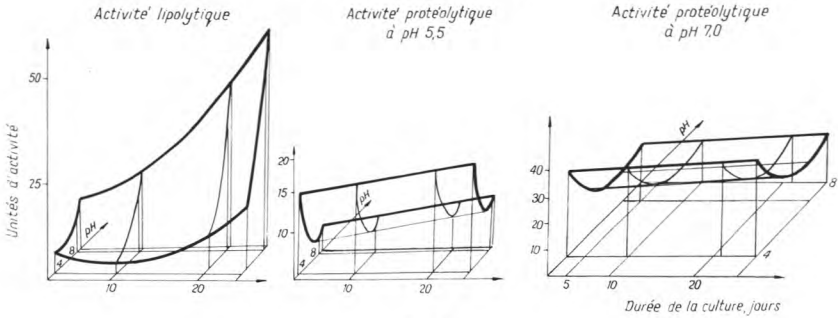


fig. 1

Influence du pH initial du milieu et de la durée de culture sur la production des lipases et des protéases extracellulaires par la souche *P. roqueforti* 23 (teneur du milieu en glucose = 0,2 p.100, épaisseur de la couche du milieu : 10 mm).

Penicillium candidum 11

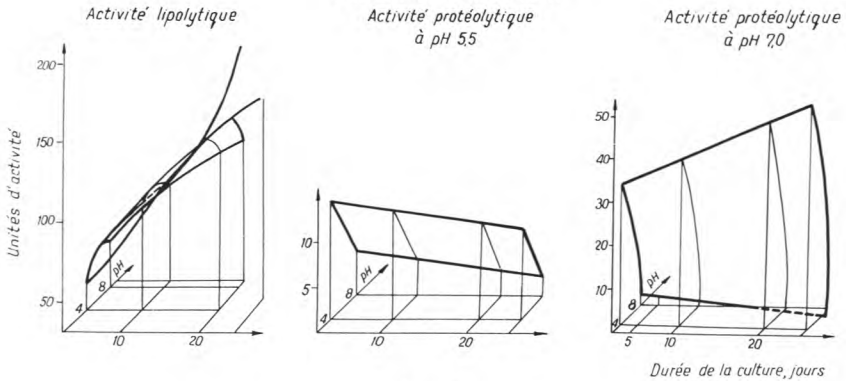


fig. 2

Influence du pH initial du milieu et de la durée de culture sur la production des lipase et des protéases extracellulaires par la souche de *P. candidum* 11 (teneur du milieu en glucose = 0,2 p.100, épaisseur de la couche du milieu = 10 mm).

En analysant les équations présentées dans le tableau 1, on peut constater que, dans l'intervalle des valeurs analysées, il y a un niveau de glucose, où les deux souches produisent des quantités minimales de lipases. On peut aussi observer que la teneur en lipases du liquide après-culture diminue tant que l'épaisseur de la couche du milieu augmente. Les figures 1 et 2 représentent l'influence du pH initial et de la durée de culture sur la production des lipases et des pro-

téases, la teneur du milieu en glucose étant de 0,2 p. 100 et l'épaisseur de la couche du milieu de 10 mm. Il résulte de l'analyse préalable des équations que ces valeurs sont favorables pour la production des lipases extracellulaires.

Les relations présentées en diagramme mettent en évidence des variations dans l'interaction du pH initial du milieu et de la durée de culture sur la production des lipases extracellulaires par *P. candidum* 11 et *P. roqueforti* 23.

L'influence du pH initial du milieu sur la production des lipases par *P. candidum* 11 est moins intense, mais plus compliquée, que l'effet du même facteur sur la production des lipases par *P. roqueforti* (fig. 1 et 2). Indépendamment de la durée de la culture, plus le pH initial du milieu est élevé, plus est élevé le niveau révélé des lipases qui sont produites par *P. roqueforti*. Les valeurs initiales plus élevées du pH du milieu sont plus favorables pour la production des lipases, qui sont produites par *P. candidum* dans des cultures de 12 j environ. Pour la production des protéases, c'est l'effet, tout contraire, du pH qui peut être observé. Pour les deux souches étudiées, la mesure de l'activité protéolytique à pH 5,5 et 7,0 confirme que la valeur moins élevée du pH du milieu favorise la biosynthèse des protéines. Niki *et al.* [18] ont constaté que plus le pH initial du milieu est élevé, davantage de lipases et moins de protéases sont produites par *P. roqueforti*. Les résultats que nous avons obtenus confirment cette tendance, mais les relations constatées ne sont pas linéaires. L'exemple de *P. roqueforti* 23 nous montre que ce n'est que jusqu'à un certain niveau du pH du milieu que l'activité protéolytique diminue à mesure que le pH du milieu augmente.

Le pH initial du milieu est un facteur qui détermine, d'une manière essentielle, le niveau des protéases qui sont produites par *P. candidum* 11, et cela surtout, lorsque l'activité protéolytique est mesurée à pH 7,0. A cette valeur du pH, l'activité protéolytique révélée atteint des valeurs inférieures à zéro dans l'étape finale de la culture, comme on le voit sur le diagramme (fig. 2), ce qui s'explique probablement par le fait que l'erreur de calcul a dépassé le niveau assez bas de l'activité protéolytique.

Aux valeurs inférieures de pH initial du milieu, l'activité protéolytique révélée, mesurée à pH = 7,0, est beaucoup plus élevée que celle qui est mesurée à pH 5,5. Cela vaut pour les deux souches examinées. La durée de culture est un facteur qui influence le niveau des lipases et des protéases d'une manière bien différente. Dans les intervalles de temps étudiés on peut observer que l'activité protéolytique de la souche de *P. candidum* diminue à pH 5,5, indépendamment du pH initial du milieu, tandis que le niveau des lipases augmente. Gripon et Bergère qui cultivaient *P. roqueforti* sur des milieux à pH 4,0, 6,0, 8,0 ont mis en évidence que cette moisissure produisait des protéases ayant leur activité optimale à pH 6,0, labiles dans l'inter-

valle alcalin du pH. Les relations que nous avons décrites indiquent que les deux espèces étudiées produisent un mélange composé de protéases dont certaines sont labiles à pH plus élevé et peuvent être inactivées au cours de la culture.

Les figures 1 et 2 permettent de conclure que les rapports entre l'activité protéolytique mesurée à pH 5,5 varieront dans un intervalle considérable, en fonction du temps de culture et du pH initial du milieu. Outre cela, la proportion entre les activités protéolytiques mesurées à ces deux valeurs de pH, seront différentes pour deux souches étudiées, aux conditions culture identiques.

L'analyse des équations de régression indique l'existence de la corrélation entre le niveau de glucose dans le milieu et le niveau de pH du milieu ainsi que la biosynthèse des lipases effectuée par les deux souches étudiées.

Autrement que pour *P. roqueforti* 23, la teneur moins élevée en glucose doit être maintenue dans le cas de *P. candidum* 11 pour assurer le même niveau des lipases produites avec des pH plus élevés.

L'interaction de ces deux facteurs reste sans effet sur le niveau des protéases qui sont produites par *P. candidum* 11. Dans le cas de la souche *P. roqueforti* 23, la concentration plus élevée en glucose stimule la production des protéases plus efficacement aux valeurs inférieures de pH initial du milieu.

Lamberet et Lenoir [12] ont démontré que le niveau de glucose était le facteur qui déterminait la production des lipases par *P. caseicolum*. Chander *et al.* [2] ont constaté que le glucose stimulait la production des lipases par *P. chrysogenum*. Lenoir *et al.* [15] ont mis en évidence que le glucose, mieux que beaucoup d'autres sucres, stimulait la production des protéines par *P. caseicolum*. Les équations de régression que nous avons obtenues laissent conclure qu'il y a un niveau du glucose dans le milieu qui est le moins favorable pour la biosynthèse des lipases. Au-dessus et au-dessous de ce niveau, la biosynthèse des lipases pour les deux souches augmente. La teneur optimale en glucose dépend aussi de la valeur du pH initial du milieu.

L'épaisseur de la couche du milieu est un facteur qui détermine le niveau des protéases dans le liquide après-culture d'une manière bien différente. La teneur en enzyme diminue lorsque l'épaisseur de la couche augmente, mais ces variations dépendent en même temps de l'espèce de la souche et de l'espèce des enzymes.

Cela peut être illustré par un exemple des calculs suivants : après 12 j de culture, la teneur du milieu en glucose étant 0,2 p. 100 et le pH initial du milieu 6,0, l'activité lipolytique sera, avec une épaisseur du milieu de 10 et 35 mm, respectivement de 109,1 et 31,7 $\mu\text{Al/ml}$ pour la souche de *P. candidum* 11, et 11,4 et 7,5 $\mu\text{Al/ml}$ pour la souche de *P. roqueforti* 23. En augmentant l'épaisseur de la couche de cet intervalle d'épaisseur, la quantité des lipases produites par

les souches étudiées est réduite de 28 et 66 p.100, respectivement. L'activité protéolytique révélée, mesurée à pH 5,5, sera 8,1 et 5,6 $\mu\text{Ap/ml}$ pour une épaisseur de couche de 10 et 35 mm, pour la souche de *P. candidum* 11/réduction jusqu'à 69,7 et 46,4 p.100. Mesurée à pH 7,0, l'activité protéolytique sera, pour les mêmes épaisseurs de la couche de milieu, 35,6 et 2,9 $\mu\text{Ap/ml}$ /réduction jusqu'à 8,2 p.100, ou bien, pour la souche de *P. roqueforti* 23, de 13,4 et 0,0 $\mu\text{Ap/ml}$. Les équations obtenues indiquent qu'il y a un maximum d'épaisseur de la couche du milieu pour la souche de *P. roqueforti*. Les couches plus minces ou plus épaisses sont moins favorables pour la biosynthèse révélée des lipases extracellulaires.

Les résultats des recherches de Desmazeaud *et al* [4] et de Gripon *et al* [8] montrent que *P. roqueforti*, autant que *P. candidum* (*P. caseicolum*) produisent des lipases dont l'action est semblable. La sensibilité de réaction que nous avons trouvée chez ces deux espèces en fonction des divers paramètres de culture ne nous permettent pas de généraliser qu'il s'agit de différences entre deux espèces. On peut de même prévoir des différences d'une souche à l'autre, dans la même espèce, ce qui est confirmé par les communications d'autres auteurs. Des relations dont nous avons constaté l'existence entre les paramètres de culture étudiés et la biosynthèse des lipases, peuvent indirectement expliquer l'origine des divergences considérables dans l'estimation des conditions optimales de culture pour la biosynthèse des lipases et des protéases, et dans l'estimation des conditions optimales d'action des lipases et des protéases que nous avons trouvées chez divers auteurs [5, 7, 9, 10, 14, 15] qui ont étudié des moisissures de fromagerie.

Les résultats que nous avons présentés à cette phase de nos recherches ne nous permettent pas de préciser les valeurs optimales de la culture superficielle. Pour cela, il faut mettre au point des expériences dans les limites plus étroites des facteurs analysés et faire une analyse plus détaillée des équations de régression obtenues.

Les résultats rapportés nous permettent cependant de tirer quelques conclusions et de faire des généralisations qui pourraient se montrer assez importantes lorsqu'on se propose d'utiliser les moisissures étudiées pour la production de préparations enzymatiques.

Il faut prendre en considération que les diverses souches de moisissures réagissent d'une manière bien différente aux conditions variables de la culture. Il y a donc lieu d'admettre qu'un paramètre défini de culture ne peut être optimal que pour d'autres conditions de culture précisément définies.

En variant les conditions de culture, la quantité des lipases et des protéases ainsi que les proportions entre ces enzymes peuvent être réglées dans des limites assez larges.

En raison du système non homogène et même compliqué des protéases qui sont produites par des moisissures, les conditions de

culture influencent non seulement la quantité, mais aussi la spécificité d'action des préparations enzymatiques obtenues.

Résumé

Des équations de régressions ont été employées pour présenter l'interaction du pH initial du milieu, de la durée de la culture, de l'épaisseur de la couche et de la teneur en glucose du milieu sur la production des lipases et des protéases par une souche de *P. roqueforti* et une souche de *P. candidum*. Les équations étaient formulées à partir des calculs d'une expérience effectuée d'après le plan orthogonal du deuxième degré.

Les équations obtenues mettent en évidence la possibilité de la régulation, dans des limites assez larges, de la quantité de lipases et de protéases, et des proportions entre des enzymes, par la sélection des conditions de culture. A partir de ces équations, on peut conclure que les valeurs des facteurs variables qui sont optimales pour la production des lipases et des protéases par *P. roqueforti*, diffèrent de celles qui le sont dans le cas de la souche de *P. candidum*. Les proportions calculées entre les valeurs d'activité protéolytique, mesurées à pH 5,5 et 7,0, ont varié dans un intervalle assez large, en fonction des conditions de culture, pour les deux souches étudiées.

Summary

INFLUENCE OF SOME SUPERFICIAL CULTIVATION CONDITIONS
ON THE PRODUCTION OF LIPASES
AND PROTEASES BY *P. roqueforti* AND *P. candidum* STRAINS

Regression equations were used to present interactions of the initial pH value of medium, the cultivation time, the thickness of medium layer and the glucose content of the medium on the production of lipases and proteases by one strain of *P. roqueforti* and one strain of *P. candidum*. The equations were obtained by calculating results of an experiment which was carried out according to the orthogonal plan of II degree.

The equations obtained showed the possibility to control amounts of lipases and proteases produced, as well as proportions between those enzymes by choosing cultivation conditions. From the equations obtained, it may be concluded that the values of variables factors studied which are optimal for lipase and protease production, are other for the *P. roqueforti* than for the *P. candidum* strain. In case of both strains, the ratio of proteolytic activities, as measured at pH values 5,5 and 7,0 was found to vary in a wide range, depending on cultivation conditions.

Reçu pour publication en août 1979.

Bibliographie

- [1] ANSON (M. L.) (1938). — The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79.
- [2] CHANDER (H.), SANNABHADTI (S. S.), ELIAS (J.), RANGANATHAN (B.) (1977). — Factor affecting lipase production by *Penicillium chrysogenum*. *J. Food Sci.*, 42, 1677.
- [3] DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.) (1977). — General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32, 731.
- [4] DESMAZEAUD (M. J.), GRIPON (J. C.), LE BARS (D.), BERGÈRE (J. L.) (1976). — Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes *Str. lactis*, *P. candidum* et *P. roqueforti*. *Le Lait*, 56, 379.
- [5] EITENMILLER (R. R.), VAKIL (J. R.), SHAHANI (K. M.) (1970). — Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sci.*, 35, 130.
- [6] GRIPON (J. C.) (1978). — Study of the extracellular proteolytic system of *Penicillium roqueforti*. 20 Int. Dairy Congr., IE, 480.
- [7] GRIPON (J. C.), BERGÈRE (J. L.) (1972). — Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*. Conditions de production et nature du système protéolytique. *Le Lait*, 52, 518.
- [8] GRIPON (J. C.), DESMAZEAUD (M. J.), LE BARS (D.), BERGÈRE (J. L.) (1977). — Role of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicolum* during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 60, 1532.
- [9] KALINOWSKI (L.), FRACKIEWICZ (E.), JANISZEWSKA (L.) (1975). — Biosynteza enzymow proteolitycznych przez *Penicillium candidum*. IV. Sesja Komitetu Techn. Chem. Zywn. PAN. 166.
- [10] KORNACKI (K.), STEPANIAK (L.), ADAMIEC (I.), GRABSKA (J.), WRONA (K.) (1979). — Characteristic of lipolytic mould preparations as compared to hog pancreas lipase. *Milchwissenschaft*, 34, 340.
- [11] LAMBERET (G.), LENOIR (J.) (1972). — Aptitude de l'espèce *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes lipolytiques. *Le Lait*, 52, 175.
- [12] LENOIR (J.), AUBERGER (B.) (1977). — Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. I. Précaractérisation de l'active exocellulaire. *Le Lait*, 57, 164.
- [13] LENOIR (J.), AUBERGER (B.) (1978). — The exocellular protease of *Penicillium caseicolum*. XX Int. Dairy Congr. E, 483.
- [14] LENOIR (J.), CHOISY (C.) (1971). — Aptitude de l'espèce *P. caseicolum* à la production d'enzymes protéolitiques. *Le Lait*, 51, 138.
- [15] LENOIR (J.), GLENZA (A.), BERGÈRE (J. L.), CERF (O.), CHOISY (C.), DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J.) (1973). — Les factures de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le Lait*, 53, 246.
- [16] MANCZAK (K.) (1976). — Technika Planowania Eksperymentow. *P.W.N. Warszawa*.
- [17] MODLER (H. W.), BRUNNER (J. R.), STINE (C. M.) (1974). — Extracellular Protease of *Penicillium roqueforti*. Production and characteristics of crude enzyme preparation. *J. Dairy Sci.*, 57, 523.
- [18] NIKI (T.), YOSHIOKA (K.), ANIKO (K.) (1966). — Proteolytic and lipolytic activities of *Penicillium roqueforti* isolates from blue cheese. XVII Int. Dairy Congr., D, 531.
- [19] PARRY (R. M.), CHANDAN (R. C.), SHAHANI (K. M.) (1966). — Rapid and sensitive assay for milk lipase. *J. Dairy Sci.*, 36, 356.

-
- [20] PIEJEVA (Yo.), RACZEW (R.), PANOWA (W.), PIELENSKI (J.) (1977). — Opredie-
lenie optymalnych uslowij sinteza extracelularnych enzymow is plesnien.
II Sympozjum po Enziman. RWPG. Poznan, 122.
- [21] SAN CLEMENTE (C. L.), VADEHRA (D. V.) (1967). — Instrumental assay of
microbial lipase and constant pH. *Appl. Microbiol.*, 15, 110.
- [22] TOSHIHIKO (T.), TAKAFUJI (S.) (1971). — Studies on the microorganisms of
Camembert cheese. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 42, 205.
- [23] ZIELINSKI (R.) (1974). — Wybrane zagadnienia optymalizacji statystycznej.
P.W.N. Warszawa.
-