



**HAL**  
open science

## Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires

A. Menassa, G. Lamberet

► **To cite this version:**

A. Menassa, G. Lamberet. Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires. *Le Lait*, 1982, 62 (611\_612), pp.32-43. hal-00928915

**HAL Id: hal-00928915**

**<https://hal.science/hal-00928915>**

Submitted on 11 May 2020

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

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

## Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*

Caractères comparés de deux activités exocellulaires

par

A. MENASSA\* et G. LAMBERET\*

### INTRODUCTION

Plusieurs auteurs ont montré que *Penicillium roqueforti* produit au moins deux lipases qui ont été distinguées essentiellement par leur pH optimal d'action situé, pour l'une, dans la zone des pH alcalins, pour l'autre, dans la zone acide [10, 14, 19, 21].

Dans les préparations enzymatiques obtenues à partir des cultures d'une souche, les deux composants paraissent souvent présents simultanément, en proportions relatives plus ou moins grandes, suivant la nature des extraits et les conditions de culture [9, 10, 21]. L'un d'eux, une lipase exocellulaire à pH optimal d'action alcalin a été séparé par précipitation au sulfate d'ammonium et ses propriétés enzymatiques ont été décrites [4]. Des essais de séparation de l'autre composant ont aussi été rapportés [11, 24] et, récemment, la purification et les propriétés de trois enzymes à pH optimal neutre ou acide ont été présentées [16, 17].

L'objet de ce travail est de préciser certaines caractéristiques de l'activité lipolytique produite en milieu acide et de la comparer à celle de la lipase synthétisée par la même souche en milieu alcalin.

### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

#### 1. Matériel d'étude et conditions de culture

L'étude a été réalisée à partir d'une souche de *P. roqueforti*, souche 1173 qui nous a été fournie par le Laboratoire de Biochimie et de Technologie laitières du C.N.R.Z.

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

La moisissure a été entretenue sur milieu gélosé à base de caséine. Les spores destinées à l'ensemencement des milieux de production sont récoltées à partir d'une culture sur galette de farines de seigle et de blé [6].

### 1.1. CULTURE A pH ALCALIN

Le milieu de culture est préparé à partir de :

— une base de composition suivante : trypticase (Mérieux) 10 g ; extrait de levure (Mérieux) 5 g ; sulfate de magnésium ( $7H_2O$ ) 0,5 g ; chlorure de potassium 0,5 g ; sulfate ferreux ( $7H_2O$ ) 0,01 g ; anhydride maléique 4,9 g ; Tris 12,1 g ; phosphate disodique ( $12H_2O$ ) 35,85 g ; solution d'oligo-éléments selon MEYERS et KNIGHT [18] 10 ml ; eau distillée 500 ml ; pH ajusté à 7,5 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée ;

— une solution de glucose à 40 g par litre ;

— une émulsion d'huile de beurre à 12 g par litre dans une solution de gomme arabique à 1,2 p. 100, préparée par sonication.

La solution de glucose et l'émulsion sont stérilisées 15 min à  $115^\circ C$ , le milieu de base, 20 min à  $120^\circ C$ . Après stérilisation, le milieu est préparé par mélange de deux parties de milieu de base, d'une partie d'émulsion et d'une partie de solution de glucose.

Le milieu de culture, réparti à raison de 40 ml par erlenmeyer de 150 ml, est ensemencé à un taux de  $10^6$  spores par ml ; il est incubé à  $25^\circ C$  pendant 6 jours avec agitation rotative (160-180 tours par min, amplitude 5 cm).

### 1.2. CULTURE A pH ACIDE

Le milieu est préparé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la culture alcaline. La base a la même composition, si ce n'est l'omission de la solution d'oligo-éléments et la nature du tampon constitué ici par : acide succinique 11,8 g ; phosphate monosodique ( $2H_2O$ ) 13,8 g ; le pH est ajusté à 3,5 par addition d'acide chlorhydrique. L'émulsion d'huile de beurre est remplacée par une solution de Tween 20 à 12 g par litre contenant 1,2 p. 100 de gomme arabique.

L'incubation est de 4 jours 1/2, les autres conditions de culture étant les mêmes que celles mentionnées pour la culture alcaline.

## 2. Préparation des extraits enzymatiques

Les extraits enzymatiques bruts sont constitués par les filtrats de culture centrifugés à 2 000 g pendant 20 min ; ils sont conservés à  $4^\circ C$  jusqu'au moment de l'emploi.

Pour contrôler l'influence du pH sur l'activité de la culture en milieu acide, la préparation enzymatique utilisée est obtenue par dialyse pendant 24 h à  $4^\circ C$  de l'extrait brut contre un tampon citrate de sodium 0,01 M, pH 6,0.

Les essais relatifs à la culture alcaline ont été effectués à partir de l'extrait brut pour estimer l'influence de la température. Pour déterminer les influences du pH et de la nature du substrat, les préparations mises en œuvre ont été obtenues par précipitation de l'extrait au sulfate d'ammonium à 60 p. 100 de saturation [4] ou à l'acétone, entre 50 et 80 p. 100 de concentration, les précipités étant redissous en tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8,0. Il a été vérifié que ces deux préparations enzymatiques donnent des résultats identiques entre les pH de 5,5 et 10 aux températures de 20° C et 30° C.

### 3. Mesure des activités lipolytiques

Elles ont été réalisées au pH-stat (Combititreur 3D Metrohm avec « Mikko » burette). Les émulsions à 5 p. 100 de tributyrine (Fluka, qualité courante), de tricaproïne et de tricapyryline (Sigma, qualité courante) dans l'eau distillée, en présence de 0,01 p. 100 de Tween 20 (Sigma) comme stabilisant, sont obtenues par traitement aux ultrasons pendant 5 min à température inférieure à 10° C. L'émulsion d'huile de beurre, séparée par fusion et décantation de beurre frais, est préparée à 45° C selon le même protocole.

Le mélange de digestion est préparé extemporanément dans le vase à réaction thermostaté à 20° C ou 30° C ; il a la composition suivante :

— émulsion de triglycéride	2 ml
— solution tampon Tris-maléate 2,5 mM	7 ml
— extrait enzymatique	1 ml

Avant addition de l'extrait enzymatique, le pH est ajusté, par ajout d'une faible quantité de solution diluée de soude ou d'acide chlorhydrique, à une valeur telle que le pH de consigne choisi soit atteint rapidement au début de la mesure. La réaction se déroule pendant un temps de 5 à 10 min.

Les acides libérés sont titrés par une solution de soude N/100, sous un faible courant d'azote dépourvu de CO<sub>2</sub>.

Les résultats sont exprimés en micro-équivalents acides libérés par minute (unité lipase : U.L.) après correction éventuelle des valeurs des essais à blanc. Pour les déterminations aux pH acides, il est tenu compte du pourcentage d'acide titré ; les pourcentages ont été calculés d'après les coefficients de dissociation des acides butyrique et caproïque aux températures de digestion [26] et vérifiés expérimentalement dans les conditions des essais pour 20° C et 30° C.

Les conditions de pH et de température sont indiquées pour chaque essai. Sauf cas particuliers qui seront mentionnés, l'activité lipolytique de la culture acide a été déterminée sur tricaproïne, celle de la culture alcaline, sur tributyrine.

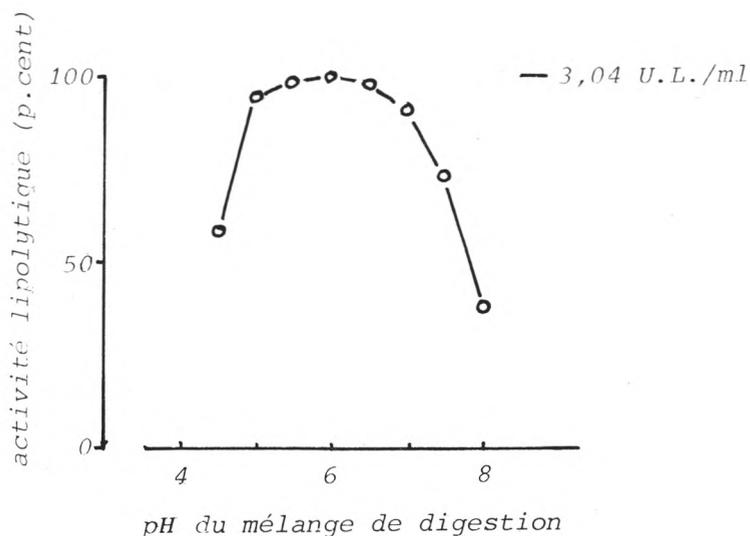


fig. 1

Influence du pH sur l'activité lipolytique du filtrat de culture acide de *Penicillium roqueforti*

(Activités déterminées au pH-stat, à 30° C sur tricaproïne. Résultats exprimés en p. 100 de l'activité maximale).

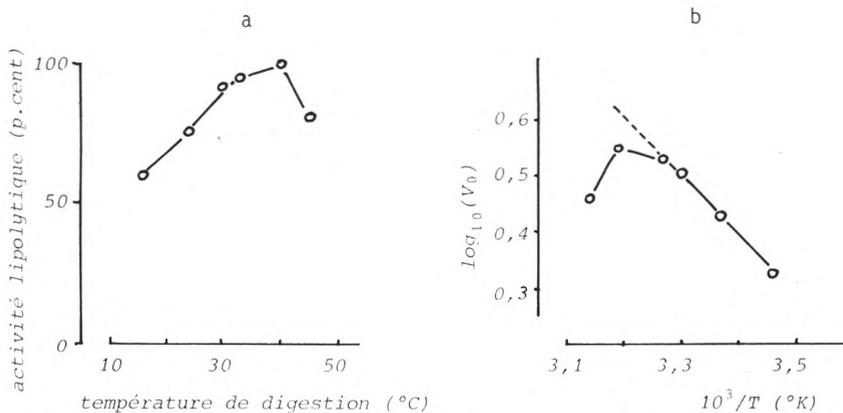


fig. 2

Influence de la température sur l'activité lipolytique du filtrat de culture acide de *Penicillium roqueforti*

Activités déterminées au pH-stat, à pH 5,5 sur tricaproïne.

a) Résultats exprimés en p. 100 de l'activité maximale.

b) Représentation selon ARRHENIUS ; V<sub>0</sub> = vitesse initiale de la réaction ; T = température en °K.

## RESULTATS

### 1. Caractères de l'activité produite en milieu acide

#### 1.1. INFLUENCE DU pH

Les résultats des déterminations à 30° C rapportés sur la fig. 1 montrent que l'activité catalytique est maximale entre les pH 5,5-6,5 (3,04 U.L./ml) et qu'elle se situe encore à un niveau supérieur à 90 p. 100 de cette valeur pour les pH de 5 et 7.

#### 2.1. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Selon la fig. 2a, la valeur maximale de l'activité est obtenue, pour des mesures à pH 5,5, à la température de 40° C. Le tracé selon ARRHENIUS (fig. 2b) permet d'estimer l'énergie apparente d'activation à 5,25 Kcal M<sup>-1</sup> entre 15 et 35° C. L'allure de la courbe indique qu'une certaine inactivation de l'enzyme, dans le mélange de digestion, se manifeste dès la température de 35° C. Si l'on suppose constant l'effet de la température sur l'augmentation de la vitesse de réaction, l'écart à 40° C entre la valeur théorique et la valeur mesurée de la vitesse initiale d'hydrolyse peut être estimé à 17 p. 100.

La stabilité de l'activité est plus grande dans le filtrat de culture (fig. 3). Ainsi à pH 5,5, l'inactivation n'est pas sensible après 1 h à 35° C et elle atteint 6 p. 100 à 40° C après ce temps. Le taux d'inactivation de 90 p. 100 est atteint après des temps qui sont respectivement de 90-58 et 9 min aux températures de 45° C-47° C et 50° C.

Conservé 22 h à pH 5,5 à 35° C, l'extrait enzymatique brut perd environ 30 p. 100 de son activité, soit un taux de dénaturation voisin de 2 p. 100 par heure (tab. 1). Les rapports des activités sur les substrats tributyrine et tricaproïne, mesurées aux pH 5,5 et 8,0, ne diffèrent pas significativement avant et après conservation.

#### 1.3. INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT

Les vitesses relatives d'hydrolyse de la tributyrine, de la tricaproïne et de la tricapyryline, déterminées à pH 6,0 et 30° C s'établissent respectivement à 23,7-100 et 10. Le résultat relatif à la tributyrine n'est pas significativement différent de ceux rapportés dans le tableau 1 pour des pH de mesure différents.

### 2. Caractères de l'activité produite en milieu alcalin

#### 2.1. INFLUENCE DU pH

Le graphique de la fig. 4 montre les courbes obtenues lors des déterminations à 20° C et à 30° C. Lorsque les résultats sont exprimés en p. 100 des activités maximales, les deux courbes sont totalement superposables dans l'intervalle de pH 7,0-9,0. A 30° C, le pH optimal d'action est de 8-8,9,0; à 20° C, il se situe entre pH 9 et 10.

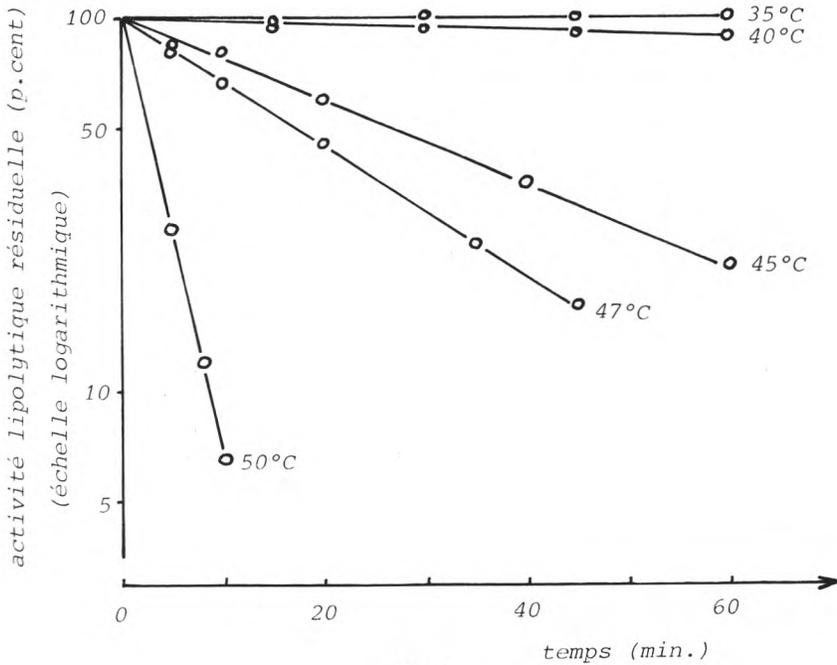


fig. 3

Stabilité thermique de l'activité lipolytique du filtrat de culture acide de *Penicillium roqueforti*

(Filtrat de culture à pH 5,5 : activités résiduelles déterminées au pH-stat, à 30° C et pH 5,5 sur tricaproïne. Résultats exprimés en p. 100 de l'activité au temps 0).

TABLEAU 1

Stabilité à 35° C du filtrat de culture acide de *Penicillium roqueforti* conservé 22 h à pH 5,5

pH de détermination	Substrat				
	tricaproïne		tributyryne		
	5,5	8,0	5,5	8,0	
Activité initiale (1)	100	81	21,5	21	
Activité résiduelle	(1)	100	82	25	22
	(2)	66	67	77	67

Les activités ont été déterminées au pH-stat à 20° C.

(1) Activité exprimée en p. 100 de la valeur obtenue avec la tricaproïne, à pH 5,5.

(2) Activité exprimée en p. 100 de l'activité initiale pour chaque substrat et pH.

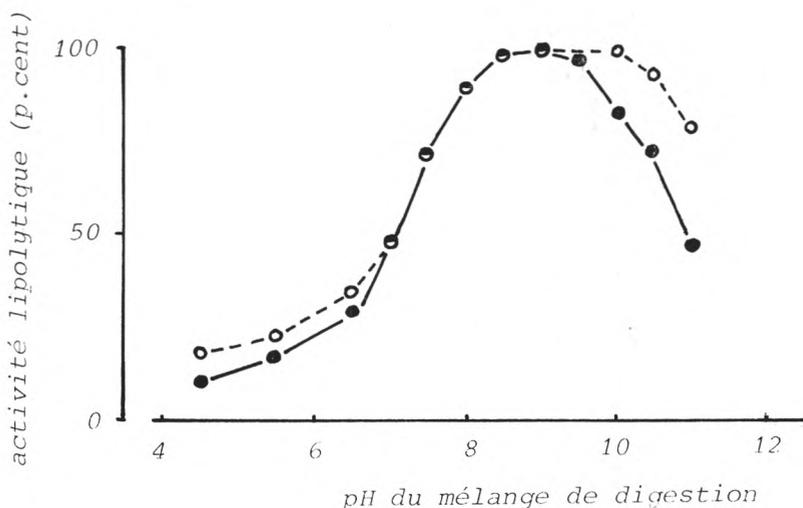


fig. 4

Influence du pH sur l'activité de la lipase alcaline partiellement purifiée de *Penicillium roqueforti*

(Activités déterminées au pH-stat à 30° C (●—●) et 20° C (○--○) sur tributyrine ; résultats exprimés en p.100 des activités maximales obtenues à 20° C et 30° C).

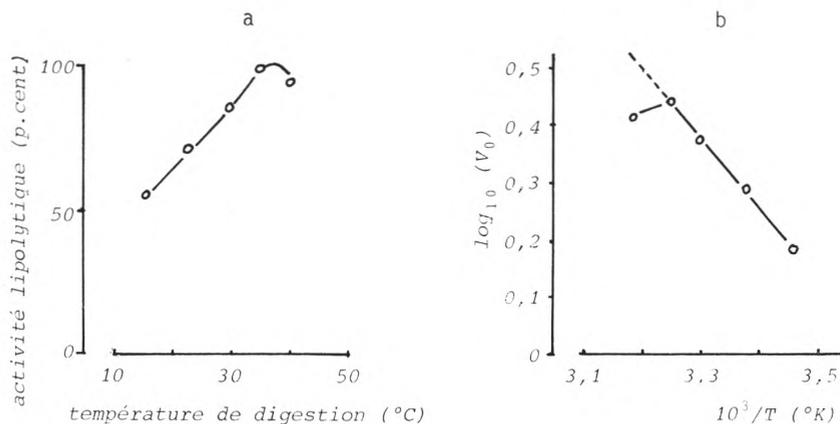


fig. 5

Influence de la température sur l'activité de la lipase alcaline partiellement purifiée de *Penicillium roqueforti*

Activités déterminées au pH-stat, à pH 8,0 sur tributyrine.

a) Résultats exprimés en p.100 de l'activité maximale.

b) Représentation selon ARRHENIUS ;  $V_0$  = vitesse initiale de la réaction ;  $T$  : = température en °K.

A pH 4,5, les activités sont respectivement de 10 et 17 p. 100 des maxima à 30° C et 20° C, à pH 11 de 48 et 80 p. 100.

## 2.2. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Les résultats qui ont permis d'établir les courbes de la fig. 4 révèlent que, entre les pH de 7 et 9, l'activité à 20° C se situe entre 77 et 81 p. 100 de celle à 30° C ; pour les pH extrêmes, l'activité est plus forte à 20° C qu'à 30° C et le rapport « 20° C/30° C » est proche de 1,35 aux pH 4,5 et 11.

La figure 5a rapporte l'influence de la température sur l'activité déterminée à pH 8,0. La vitesse maximale de la réaction se situe au voisinage de 35° C et à 16° C, l'activité est égale à 55 p. 100 de cette valeur. L'énergie apparente d'activation est de l'ordre de 5,4 Kcal M<sup>-1</sup> (fig. 5b).

## 2.3. INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT

La tributyrine est le substrat le plus facilement hydrolysé, les vitesses relatives d'hydrolyse se situant vers 40 p. 100 avec la tricaproïne, 91 p. 100 avec la tricapriline et 60 p. 100 avec l'huile de beurre (tab. 2).

TABLEAU 2

Influence de la nature du substrat sur l'activité de la lipase alcaline partiellement purifiée de *Penicillium roqueforti*

Substrat	Températures et pH de détermination			
	20° C		30° C	
	pH 5,5	pH 9,0	pH 5,5	pH 9,0
Tributyrine	1,67	7,70	1,60	9,60
Tricaproïne	0,67 (40 p. 100)	2,85 (37 p. 100)	0,68 (43 p. 100)	3,80 (40 p. 100)
Tricapriline				8,70 (91 p. 100)
Huile de beurre				5,76 (60 p. 100)

Les résultats sont exprimés en U.L. par ml d'extrait enzymatique ; entre parenthèses, l'activité exprimée en p. 100 de celle mesurée sur tributyrine aux mêmes pH et température.

Le pH et la température influent peu sur la spécificité T6:O/T4:O, les valeurs trouvées pour le rapport des activités fluctuant de 0,37 à 0,43 pour les différents pH et températures.

## DISCUSSION

La production de plusieurs lipases par une même souche a été rapportée pour diverses moisissures autres que *P. roqueforti* ; les enzymes sont distinguées, au plan de leurs propriétés catalytiques, par leur spécificité de substrat, notamment vis-à-vis des triglycérides homogènes. Il en est ainsi chez *Penicillium crustosum* [22], *Rhizopus sp.* [13, 23], *Mucor lipolyticus* [20] et *Penicillium cyclopium* [12]. Chez ces deux dernières espèces et chez *P. roqueforti*, le pH optimal d'action permet également la différenciation.

Dans les conditions de culture adoptées ici, les caractéristiques d'action des deux préparations enzymatiques (cf. tab. 1 et 2) montrent qu'il y a essentiellement production d'une activité acide ou d'une activité alcaline. Les données établies sur ces préparations peuvent être considérées comme représentatives de l'une et de l'autre. La première présente un pH optimal d'action de 6, la seconde ne conserve à ce pH que 20 à 25 p. 100 de son activité maximale qui se situe aux pH de 9-9,5. Les rapports des vitesses d'hydrolyse de la tributyrine et de la tricaproïne (T6:O/T4:O) sont respectivement proches de 4 et 0,4 pour chacune des préparations.

L'activité de la préparation acide varie peu entre pH 5,0 et 7,0. Cet intervalle de pH recouvre les différentes valeurs généralement rapportées dans la littérature [5, 10, 14, 17, 19, 21]. Le choix d'une température (30° C) inférieure à la température maximale d'action pour les déterminations de l'activité réduit probablement l'inactivation de l'enzyme de part et d'autre du pH optimal. SHIPE [25] signalait, pour une enzyme de pH optimal 5,0-5,5, une activité plus forte sur tributyrine que sur tricaproïne. Nos résultats, mettant en évidence une spécificité marquée vis-à-vis de la tricaproïne, concordent avec ceux obtenus par LOBYREVA et MARCHENKOVA [16]. Toutefois ces auteurs ont relevé pour les trois enzymes qu'ils ont purifiées, des différences sensibles dans le rapport T6:O/T4:O. En revanche, dans notre préparation enzymatique, les faibles variations de ce rapport au cours de la destabilisation à pH 5,5, ne laissent pas supposer la présence de lipases de spécificités différentes. La spécificité vis-à-vis de la tricaproïne peut aussi être rapprochée des travaux d'IMAMURA et KATAOKA [10] faisant état d'une proportion plus grande d'acide caproïque parmi les acides gras volatils libérés à partir d'huile de beurre par un extrait endocellulaire enrichi en lipase neutre.

Pour la lipase alcaline, un certain nombre d'études signalent une activité maximale vers pH 7,5-8,0 [4, 5, 10, 19, 21]. Les valeurs trou-

vées de 9-9,5 sont proches de celles mentionnées par KHAN *et al.* [14]. Les résultats concernant la spécificité de substrat concordent avec ceux d'EITENMILLER *et al.* [4] pour la tributyrine et la tricapriline mais non pour l'huile de beurre (respectivement 100, 93 et 26).

Les températures optimales d'action des activités alcaline (35° C) et acide (40° C) sont très voisines de celles signalées dans la littérature. Ces valeurs ne paraissent pas être des caractéristiques originales par rapport à celles observées pour les lipases acides et alcalines d'autres *Penicillium* [1, 12, 15, 22], tandis que des températures optimales d'action de l'ordre de 25° C ont été trouvées pour les lipases acides purifiées de diverses espèces d'*Aspergillus* [2, 7, 8]. Les énergies apparentes d'activation ne permettent pas la distinction des lipases de *P. roqueforti* ; leurs valeurs sont plus fortes que celle rapportée pour l'enzyme de *P. caseicolum* [15] mais assez proches de celle de la lipase pancréatique [3].

Les conditions d'action des deux composants étudiés du système lipolytique de *P. roqueforti* apparaissent ainsi distinctes. L'un et l'autre sont susceptibles d'être produits dans les pâtes fromagères mais, selon les niveaux respectifs d'activité, il devrait en résulter des profils d'acides gras sensiblement différents et par suite des caractères de pâtes également différents. La connaissance des activités relatives des deux enzymes au cours de l'affinage présente donc un intérêt technologique majeur.

## Résumé

Les caractéristiques d'action de deux composants du système lipolytique exocellulaire de *Penicillium roqueforti* ont été déterminées sur le filtrat d'une culture à pH acide (A) et sur un extrait partiellement purifié obtenu à partir d'une culture à pH alcalin (B). Chacun des extraits contient essentiellement l'un ou l'autre des composants dont les activités peuvent être différenciées par le pH optimal d'action et la spécificité vis-à-vis des triglycérides homogènes.

A 30° C, l'activité de A est maximale à pH 6 et reste supérieure à 90 p. 100 entre les pH de 5 et 7. L'activité de B, maximale à pH 9, est réduite à 20 p. 100 environ à pH 6. Les vitesses relatives d'hydrolyse de la tributyrine, de la tricaproïne et de la tricapriline sont respectivement de 24-100 et 10 pour A et de 100-40 et 91 pour B. La température optimale d'action de A est de 40° C, mais l'inactivation thermique devient appréciable après 1 h d'incubation à pH 5,5 pour les températures supérieures à 35° C. Pour B, la valeur maximale de l'activité est obtenue à 35° C ; le rapport des activités à 20° C et 30° C ne varie pas entre les pH de 7 et 9, mais l'activité devient plus importante à 20° C qu'à 30° C aux pH 4,4 et 11.

## Summary

### CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE LIPOLYTIC SYSTEM OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI*

#### COMPARISON OF CHARACTERISTICS OF TWO EXOCELLULAR ACTIVITIES

The characteristics of action of the activity of two components of *Penicillium roqueforti* exocellular lipolytic system were determined using a cell free filtrate from an acid broth culture (A) and a partially purified extract from a basic broth culture (B) as sources of enzymes. Each contained mainly one of the components and the two activities could be differentiated by means of their pH optimum of action and their specificity towards low molecular weight triglycerides.

At 30° C, the activity of A was maximum for pH 6 and remained higher than 90 p. 100 between pH 5 and 7. At pH 6, 30° C, the activity of B represented ca. 20 p. 100 of the maximum value which was reached at pH 9. The relative rate of hydrolysis of tributyrine, tricaproine and tricapyryline were respectively 24-100 and 10 for A and 100-40 and 91 for B. The temperature optimum of A was 40° C, but the thermal inactivation became noticeable after 1 h. of incubation at pH 5.5 for temperatures above 35° C. For B, the temperature optimum was 35° C; the ratio of activities determined at 20° C and 30° C was constant in the pH range 7-9, but for pH 4.5 and 11 the activity at 20° C became higher than that at 30° C.

Reçu pour publication en juillet 1981.

## Bibliographie

- [1] CHOPRA (A. K.), CHANDER (H.), BATISH (V. K.) et RANGANATHAN (B.) (1980). — Activité lipolytique de *Penicillium chrysogenum*. *Le Lait*, 60 (593-594), 184-191.
- [2] CHOPRA (A. K.), CHANDER (H.), SINGH (J.) and RANGANATHAN (B.) (1980). — Lipolytic activity of *Aspergillus wentii*. *Milchwissenschaft*, 35 (4), 228-230.
- [3] DESNUELLE (P.) (1961). — Pancreatic lipase. *Advanc. Enzymol.*, 23, 129-161.
- [4] EITENMILLER (R. R.), VAKIL (J. R.) and SHAHANI (K. M.) (1970). — Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sci.*, 35, 130-133.
- [5] FODOR (P. J.) and CHARI (A.) (1949). — The ester-hydrolyzing enzyme systems of *Aspergillus niger* and *Penicillium roqueforti*. *Enzymologia*, 13, 258.
- [6] FOURNET (G. P.) (1971). — Etude de l'hétérogénéité des *Penicillia roqueforti* et son influence sur les fromages de Roquefort. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle. Faculté des Sciences, Montpellier.
- [7] FUKUMOTO (J.), IWAI (M.) and TSUJISAKA (Y.) (1963). — Studies on lipases. I. Purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9 (3), 353-361.
- [8] HOOVER (R.), LAURENTIUS (S. F.) and GUNETLEKE (K. G.) (1973). — Spoilage of coconut oil. Purification and properties of a fungal lipase that attacks coconut oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 50 (3), 64-67.

- [9] IMAMURA (T.) and KATAOKA (K.) (1963). — Biochemical studies on the manufacturing of Roquefort type cheese. I. Lipase-producing ability of *Penicillium roqueforti*. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 34 (5), 344-348.
- [10] IMAMURA (T.) and KATAOKA (K.) (1963). — Biochemical studies on the manufacturing of Roquefort type cheese. II. Characteristics of lipases produced by *Penicillium roqueforti*. *Jap. J. Zootechn. Sci.*, 34, (5), 349-353.
- [11] IMAMURA (T.) and KATAOKA (K.) (1966). — Biochemical studies on the manufacturing of Roquefort type cheese. III. Isolation of lipases from mould-culture. *Jap. J. Dairy Sci.*, 15 (6), A 138-142.
- [12] IWAI (M.), OKUMURA (S.) and TSUJISAKA (Y.) (1975). — The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* Wrestring. *Agr. Biol. Chem.*, 39 (5), 1063-1070.
- [13] IWAI (M.) and TSUJISAKA (Y.) (1974). — The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.*, 38 (6), 1241-1247.
- [14] KHAN (I. M.), CHANDAN (R. C.) and SHAHANI (K. M.) (1966). — Hydrolysis of milk fat by microbial lipase. *J. Dairy Sci.*, 49 (6), 700.
- [15] LAMBERET (G.) et LENOIR (J.) (1976). — Les caractères du système lipolytique de l'espèce de *Penicillium caseicolum*. Purification et propriétés de la lipase majeure. *Le Lait*, 56 (559-560), 622-644.
- [16] LOBYREVA (L. B.) and MARCHENKOVA (A. I.) (1980). — Isolation and characteristics of lipases from *Penicillium roqueforti*. *Mikrobiologica*, 49 (6), 924-930.
- [17] LOBYREVA (L. B.) and MARCHENKOVA (A. I.) (1981). — Characteristics of lipases in the cultural broth of *Penicillium roqueforti*. *Mikrobiologia*, 50, (1), 90-95.
- [18] MEYERS (E.) and KNIGHT (S. G.) (1958). — Study on the nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.*, 6 (3), 174-178.
- [19] MORRIS (H. A.) and JEZESKI (J. J.) (1953). — The action of microorganisms on fats. II. Some characteristics of the lipase system of *Penicillium roqueforti*. *J. Dairy Sci.*, 36, 1285-1298.
- [20] NAGAOKA (K.) and YAMADA (Y.) (1953). — Purification of *Mucor* lipases and their properties. *Agr. Biol. Chem.*, 37 (12), 2791-2796.
- [21] NIKI (T.), YOSHIOKA (Y.) and AMIKO (K.) (1966). — Proteolytic and lipolytic activities of *Penicillium roqueforti* isolated from Blue cheese. XVII Int. Dairy Congr., D, 531-537.
- [22] OI (S.), SAWADA (A.) and SATOMURA (Y.) (1967). — Purification and some properties of two types of *Penicillium* lipase, I and II and conversion of types I and II under various modification conditions. *Agr. Biol. Chem.*, 31 (11), 1357-1366.
- [23] OI (S.), YAMAZAKI (O.), SAWADA (A.) and SATOMURA (Y.) (1969). — Purification and some properties of a fungal lipase preparation used for milk flavouring. *Agr. Biol. Chem.*, 33 (5), 729-738.
- [24] RACHEV (R.), PEEVA (Yu. J.), PANOVA (V.) et PELENSKI (I.) (1977). — Le système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Détermination des conditions optimales de synthèses d'enzymes lipolytiques dans le milieu de culture. Isolement et propriétés. II Symposium po Enzyman S.E.W. Poznam, 124.
- [25] SHIPE (W. F.) (1951). — A study of the relative specificity of lipases produced by *Penicillium roqueforti* and *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 30, 165-179.
- [26] WEAST (R. C.) and SELBY (S. M.) (1967-1968). — Handbook of Chemistry and Physics. 48th ed. Pub. by The Chemical Rubber Co. Cleveland, Ohio (U.S.A.).