

UTILISATION DE LA PLANIFICATION EXPERIMENTALE POUR L'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE LA PROTEASE ACIDE PAR ASPERGILLUS NIGER

Reçu le 01/09/2001- Accepté le 20/03/2002

Résumé

La production de la protéase acide (aspartyl-protéase) est réalisée par fermentation de milieux à base de déchets d'oranges par une moisissure mésophile (*Aspergillus niger*). Les milieux sont enrichis par des substrats simples et/ou complexes. La biosynthèse de l'enzyme est effectuée en utilisant les matrices de Plackett et Burman à N=8, soit à N-1 = 7 variables. Ces dernières sont 5 facteurs de production (lactosérum, déchets de dattes, « corn-steep liquor » (CSL), urée et sulfate d'ammonium) et 2 erreurs. Les résultats observés sont ajustés selon une régression linéaire multiple. Une régression progressive réalisée sur le modèle retenu permet de confirmer la sélection d'un seul facteur (le CSL) pour la production de l'enzyme selon le sous-modèle : $Y_{AP}=1114.88 + 682.63X_1 + \varepsilon$. La meilleure activité protéasique acide (1881 U.) est obtenue sur un milieu à base de déchets d'oranges enrichi en CSL en 72 h., à pH 5, à 30°C et avec une agitation de 110 rpm/min.

Mots-clés : protéase acide, *Aspergillus niger*, déchets d'oranges, optimisation, matrices de Plackett et Burman.

Abstract

The acid proteinase production (aspartic-proteinase) is realized by fermentation of a mesophilic mould (*Aspergillus niger*) in media prepared from industrial orange wastes. The media are enriched by simple and/or complex substrates. Biosynthesis of enzyme is prepared using de Plackett's and Burman's matrices with N=8, and N-1 = 7 variables. These later are the 5 production factors (whey, dates wastes, corn-steep liquor (CSL), urea and ammonium-sulfate) and 2 errors. The observed results are adjusted according to a multiple linear regression. A progressive regression, based on the retained model, permits to confirm the selection of only one factor (CSL) for the enzyme production according to the sub model : $Y_{AP}=1114.88 + 682.63X_1 + \varepsilon$. The best acid proteasac activity (1881 U.) is obtained from a medium of orange wastes enriched with CSL in 72 h., pH 5, 30°C and with a 110 rpm shaking.

Key-words: acid proteinase, *Aspergillus niger*, orange wastes, optimization, Plackett's and Burman's matrixes.

A. MECHAKRA-MAZA¹
Z. GHERIBI-AOULMI²
Z. MERAIHI¹
H. BOUSSEBOUA³

¹ Laboratoire de
Génie Enzymatique
Département de Biologie
Université Mentouri
Constantine, Algérie

² Département de Mathématiques
Université Mentouri
Constantine, Algérie

³ Laboratoire de Microbiologie
de l'Environnement
Département de Biologie
Université Mentouri
Constantine, Algérie

ملخص

تم إنتاج انزيم البروتياز الحامضي (Aspartic-proteinase) بواسطة فطر متوسط الحرارة (*Aspergillus niger*) على بيئة فضالة البرتقال الصناعية و المزودة بعناصر بسيطة او مركبة. تم إنتاج الأنزيم باستعمال مخطط تجريبي، Plackett's and Burman's matrixes، بـ N=8 و سبع متغيرات منها خمس عوامل الإنتاج (مصل الحليب، فضالة التمر، نقيع الدرة-corn-steep liquor" يوريا و سولفات الأمونيوم) وخطأين. كما تم التقويم التجريبي للنتائج المسجلة وفق نموذج رياضي خطي متعدد المتغيرات عدل كالتالي: $Y_{AP}=1114.88 + 682.63X_1 + \varepsilon$ و سجلت القيمة العظمى للنشاط الأنزيمي أي 1881 وحدة عند استعمال البيضة التجريبية الأساسية و المزودة بـ CSL بعد 72 ساعة من التخمر عند pH 5 و 30 °م و سرعة رج 110 rpm

الكلمات المفتاحية: البروتياز الحامضي، *Aspergillus niger*، نفايات صناعية للبرتقال.

La microbiologie est qualifiée aujourd'hui de « participant majeur de l'industrie globale, spécialement des industries pharmaceutiques, alimentaires et chimiques » [1]. Dans ce contexte, les moisissures représentent un groupe de microorganismes physiologiquement différents des autres groupes. Elles disposent de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement, elles sont de plus en plus utilisées dans la production d'enzymes [2].

Plusieurs espèces de moisissures sont utilisées pour la production de protéases à l'échelle industrielle [3] en particulier *Aspergillus niger* [4]. Nos travaux antérieurs nous ont permis leur synthèse par *Penicillium camemberti* à l'échelle expérimentale [5].

L'aspartyl-protéase appartient au groupe des enzymes "pepsin-like", d'une MM d'environ 22.5 Kda, possédant deux groupes carboxyliques dont l'un est sous forme indissociée dans le site actif de l'enzyme [6]. Ce type d'enzymes peut-être produit par plusieurs espèces de moisissures dont *Penicillium camemberti* [6,4] et *Aspergillus niger* [7].

La composition du milieu de production dépend de l'espèce microbienne utilisée. Elle englobe aussi bien des substrats simples (caséine, lactose, sels minéraux), que des substrats complexes (farine de soja, moutures d'orge, levure de bière, etc.) [8].

Le prix de revient des déchets agro-alimentaires industriels en fait d'eux une source d'énergie et de substrats très bien adaptés aux

fermentations à grande échelle. Nos travaux ont montré la possibilité de production de protéases par les moisissures cultivées sur du lactosérum [4]. Le présent travail suit la même démarche avec l'utilisation d'un autre déchet de l'industrie alimentaire, à savoir les déchets d'oranges.

Les méthodes de planification expérimentale à réplique fractionnée ont été proposées pour la première fois par Finney puis par Plackett et Burman [9]. Elles permettent d'introduire plusieurs facteurs à la fois dans des expériences de taille réalisable tout en permettant de déterminer assez vite quels sont les facteurs ayant un effet important sur le produit. Dans notre cas, nous avons adopté les mêmes méthodes associées à la modélisation que celles utilisées pour l'optimisation de la production de protéases par *Penicillium camemberti* [10].

MATERIEL ET METHODES

La souche d'*Aspergillus niger* (ATCC 16 404) est sporulée sur milieu " agar à la pomme de terre " (PDA) à 30°C pendant 3 jours. Les spores à ensemercer sont dénombrées par mesure de l'absorbance à 650 nm par référence à une courbe établie d'après un dénombrement à l'aide de la cellule de Malassez.

Le milieu de culture est préparé par broyage par Ultra-Turax de 100 g. de déchets d'oranges industriels avec 500 ml d'eau distillée jusqu'à obtention d'une suspension homogène puis par centrifugation à 4000 rpm et dilution avec du tampon phosphate 0,2 M à pH 5. Le milieu de base ainsi obtenu ajusté à pH 5 est enrichi par les 5 facteurs sélectionnés, 3 déchets agro-alimentaires (" corn-steep liquor " ; lactosérum et poudre de dattes déclassées) et 2 substrats simples (urée et sulfate d'ammonium). Les quantités ajoutées sont précisées dans le tableau 1. Les milieux enrichis selon un plan d'expérience, sont répartis dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 40 ml/flacon, puis stérilisés à 110°C pendant 15 min.

Facteurs	Niveau inférieur	Niveau supérieur
X ₁ : corn-steep liquor (CSL)	0	50 ml/l
X ₂ : Ammonium sulfate	0	5 g/l
X ₃ : Erreur	-	-
X ₄ : Déchets de dattes	0	50 g/l
X ₅ : Erreur	-	-
X ₆ : Urée	0	5 g/l
X ₇ : Lactosérum	0	50 ml/l

Tableau 1: Listes des facteurs variables.

Ensemencement et conditions de fermentation. Chaque erlenmeyer est ensemencé avec un taux de 10⁵ spores/ml de milieu, à pH initial proche de 5, puis bien homogénéisé pour éviter l'agrégation des spores, et incubé à 30°C pendant 3 jours sous agitation par oscillations dans un bain-Marie à 110 rpm. Les milieux sont préparés en triple ; chaque résultat est la moyenne de 3 essais.

La biomasse est mesurée à la fin des fermentations après filtration sur papier-filtre Whatman n°2, pesée pour avoir le poids humide, séchage à l'étuve à 90°C jusqu'à

stabilité du poids (24 h) puis pesée de nouveau pour obtenir le poids sec.

L'activité aspartyl-protéase est dosée par la méthode d'Anson [11] après incubation du substrat ; la caséine à 2,5% dans le citrate de sodium, à 40°C pendant 1h selon le protocole décrit précédemment [4]. L'unité « aspartyl-protéase » correspond à la quantité d'enzyme ayant entraîné la formation de 1μ mole de produit (tyrosine) formé par heure et par ml de milieu.

Les sucres et les protéines dans les filtrats de culture sont mesurés après chaque fermentation afin d'estimer les taux de consommation et de synthèse par la moisissure dans les conditions de chaque expérience. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry [12] en utilisant la sérum-albumine bovine (Fraction V, Sigma) pour l'étalonnage. Les sucres sont, quant à eux, mesurés selon la méthode de Dubois [13] en utilisant le glucose pour la courbe-étalon.

Le plan d'expériences est établi selon les matrices de Plackett et Burman [9]. Il est à N=8, soit à 8 expériences et N-1, soit 7 facteurs dont 5 sont réels (les facteurs de supplémentation cités plus haut) et 2 irréels (les erreurs). Les signes (+) ou (-) indiquent la présence ou l'absence du facteur X (Tab. 2).

Expérience	Facteurs						
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 2: Plan d'expériences.

La liste des facteurs et leurs niveaux d'utilisation sont présentés dans le tableau 1.

Analyse statistique et modélisation. A la fin de chaque expérience, les coefficients de chaque facteur explicatif sur la production de l'enzyme et de la biomasse sont estimés par la méthode des moindres carrés et assortis de tests t de Student à un certain seuil critique α . Des sous-modèles sont alors sélectionnés pour chacun des facteurs à expliquer, en gardant les termes qui sont significativement différents de 0 au seuil 5%. Les calculs ont été effectués en utilisant le logiciel GENSTAT V.

La réponse théorique μ , pour chaque facteur analysé, est de la forme:

$$\mu = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7$$

où β_0 représente la constante, $\beta_1 \dots \beta_7$ les coefficients de régression et les X_i , les facteurs explicatifs.

Les contributions dues aux facteurs erreurs X_3 et X_5 sont introduites dans le but de fournir une estimation de la variance résiduelle s^2 . Celle-ci a pour expression:

$$s^2 = \frac{8(\hat{\beta}_3^2 + \hat{\beta}_5^2)}{2}$$

Ainsi chaque estimateur $\hat{\beta}_i$ a pour variance $s_i^2 = \frac{s^2}{8}$

[9], et la statistique test t de Student pour tester les coefficients est alors donnée par :

$$\frac{\hat{\beta}_i}{s_i} \sim T_{2\alpha} \text{ (sous l'hypothèse } \beta_i = 0 \text{) au seuil } \alpha \text{ donné.}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des résultats expérimentaux est résumé dans le tableau 3 ; il exprime l'effet des facteurs testés sur chacun des paramètres mesurés (pH, biomasse et activité enzymatique).

Rôle du pH. Les résultats montrent que le pH de chaque culture augmente dans les milieux contenant l'urée et/ou le sulfate d'ammonium (expériences n° 2, 4, 5 et 6). Au contraire, il diminue dans les autres cultures (Tab. 3). Ces milieux, par leur richesse en source azotée, entraînent une adaptation de la moisissure qui synthétise les enzymes nécessaires à la dégradation de ces composés telles que l'uréase [14]. La plus forte augmentation du pH (6,36) est observée dans le milieu n°5 contenant le sulfate d'ammonium, l'urée et la lactosérum (facteurs 2, 5 et 6). La présence combinée des deux premiers facteurs (urée et

sulfate d'ammonium) est responsable de cette forte augmentation du pH.

Les moisissures peuvent se développer dans une zone de pH très étendue (de 4,5 à 8,0) [14]; mais la production de la protéase acide nécessite un pH initial compris entre 4 et 5 Lenoir et al. [15]. Dans notre cas, la meilleure production protéasique est observée avec un pH initial de 4.7.

Production de biomasse. Le poids de mycélium sec varie de 0,25 à 12,5 g/l de milieu initial avec une moyenne arithmétique de 6,37 g/l (Tab. 3). Le plus faible rendement est obtenu dans le milieu de base sans aucune supplémentation (exp. 8) et le plus élevé dans le milieu contenant le CSL, l'urée, les dattes et le lactosérum (exp. 7). Ce dernier milieu est donc le plus équilibré. En effet, le rapport C/N doit-être égal à 20 pour une meilleure croissance de la moisissure [14].

Les données ajustées sur un modèle de régression montrent que les facteurs les plus influents sur la biomasse sont X_1 (le CSL avec un coefficient de régression $\beta_1 = 2.375$) et X_2 (le sulfate d'ammonium avec un coefficient de régression $\beta_2 = 2.0$), tous deux significatifs au seuil 1%. Les deux autres facteurs X_7 (le lactosérum) et X_4 (les déchets de dattes) ont aussi été sélectionnés car significatifs aux seuils de 2% et 5% respectivement (Tab. 4).

Une régression progressive confirme ces résultats et permet d'exprimer le sous-modèle retenu sous forme d'équation (Tab. 5).

Expérience	PH initial	pH final	Biomasse (PS en g/l)	Activité AP (unités)	Protéines (mg/ml)	Sucres (mg/ml)
1	4.69	3.60	9.00	1832	3.79	2.25
2	4.91	5.40	5.50	418	0.39	2.11
3	4.89	3.02	3.75	437	0.39	2.31
4	4.72	5.65	6.75	1881	4.07	1.44
5	4.87	6.36	6.50	342	0.31	1.28
6	4.72	5.53	6.75	1748	0.31	1.81
7	4.72	3.41	12.50	1729	4.39	2.25
8	4.85	3.18	0.25	532	0.24	2.18

Tableau 3: Résultats du pH de fin de culture, de la biomasse, de l'activité AP, des protéines totales et des sucres totaux de l'ensemble des expériences.

Poids sec (PS)			Activité (AP)		
Estimations des β_i	Valeur du t test	Seuil de signification	Estimations des β_i	Valeur du t test	Seuil de signification
2375	19.0	1%	682.625	94.875	1‰
2000	16.0	1%	-34.625	-4.812	5%
-0.125	---	---	-6.125	---	---
0.750	6.0	5%	1.375	0,191	---
0.125	---	---	8.125	---	---
0.0	0.0	---	-17.625	-2.450	---
1.00	8.0	2%	-50.875	-7.071	2%

Tableau 4: Régressions avec le modèle complet du rendement en mycélium sec et de l'activité AP.

(La première et la quatrième colonne représentent les estimations des coefficients β_i ; la deuxième et la cinquième colonne représentent le test de l'hypothèse selon laquelle le coefficient du facteur considéré n'est pas significativement différent de 0 ; la troisième et la sixième colonne représentent la probabilité de rejeter cette hypothèse).

Facteur mesuré	Equation	R ²	Facteurs sélectionnés
Poids sec	$Y_{ps} = 6.375 + 2.375X_1 + 2.000X_2 + 0.750X_4 + X_7 + \varepsilon$	0.99	X_1, X_2, X_4, X_7
Activité AP	$Y_{AP} = 1114.88 + 682.63 X_1 + \varepsilon$	0.99	X_1

Tableau 5: Sous modèles de régressions retenus pour le rendement en mycélium sec (PS) et l'activité protéasique (AP).

Production d'aspartyl-protéase (AP)

L'activité protéasique varie de 342 unités (exp. 5) à 1881 u. (exp. 4) avec une moyenne de 1115 u. La plus faible activité correspond au milieu où le pH final est le plus élevé. Dans ces conditions, l'enzyme produite est dénaturée par un pH proche de la neutralité (pH 6,36).

La meilleure activité est produite dans le milieu contenant le CSL, les déchets de dattes et l'urée (exp.4). Cependant, ce milieu ne correspond pas à celui qui a donné le meilleur rendement en biomasse (exp.7). En effet, toute substance produite par un microorganisme nécessite un milieu ayant un rapport C/N donné. Au-delà de ce rapport, la production diminue comme cela a été noté pour la production de cellulase par *Penicillium occitanis* [16].

Les analyses statistiques montrent que la production d'enzyme est expliquée de façon hautement significative par le facteur X_1 , c'est-à-dire le CSL avec un coefficient de régression $\beta_1 = 682.625$ (Tab. 4). La production d'enzyme est également expliquée par les facteurs X_2 (sulfate d'ammonium) et X_7 (lactosérum) avec des seuils respectifs de 5% et 2%. Cependant, les coefficients de régression de ces deux facteurs étant négatifs (respectivement -34.625 et -7.071), ils ont pour effet de diminuer la production. Cet effet s'observe dans le tableau 3 où toutes les expériences en présence de sulfate d'ammonium ou du lactosérum ou des deux et en absence du corn-steep liquor (exp. 2, 3 et 5) donnent les activités AP les plus faibles. Le but de ce travail étant d'augmenter l'activité de l'AP, ces deux facteurs sont donc éliminés.

L'effet négatif du lactosérum est lié à la présence du lactose. En effet, ce sous-produit de l'industrie laitière est la source principale de ce disaccharide (environ 5% pour 8% de matières sèches). Cet effet peut s'expliquer par 2 théories:

- la première est que la moisissure ne possède pas la β -galactosidase, et ne peut donc pas hydrolyser le lactose. Le milieu, dans ce cas, ne fournit pas suffisamment de source carbonée nécessaire à la croissance de la moisissure et à la production d'enzyme.

- La deuxième se rapporte au galactose issu de l'hydrolyse du lactose. Celui-ci a un effet inhibiteur sur certains microorganismes. Chez les levures, il est dégradé par la voie de Leloir-Kalchar où il est phosphorylé par la galactokinase, puis transformé en glucose-1-phosphate qui est directement utilisable par la cellule [5].

Le facteur X_1 (le corn-steep-liquor) semble apporter les substrats qui permettent à la fois une bonne croissance et une bonne production de l'enzyme. Comme pour la biomasse, le meilleur sous-modèle retenu après régression progressive permet d'exprimer l'activité enzymatique sous forme de l'équation présentée dans le tableau 5.

Les facteurs sélectionnés pour la biomasse sont le CSL, le sulfate d'ammonium, les déchets de dattes et le lactosérum et, pour l'activité protéasique, le CSL.

Les protéines totales et les sucres totaux. Mesurés à la fin de chaque expérience, ils indiquent l'activité biochimique de la moisissure par rapport aux différentes conditions de culture.

Le tableau des résultats (Tab. 3) montre que le taux de

protéines le plus bas (0.24 mg/ml) correspond au milieu de base (exp. 8) et le taux le plus élevé (4.39 mg/ml) au milieu 7 contenant le CSL, l'urée, les dattes et le sulfate d'ammonium, ce qui fait de ce dernier un milieu initialement très enrichi. Tous les milieux contenant le CSL donnent à la fin les taux de protéines les plus élevés ainsi que les activités aspartyl-protéase les plus fortes. La présence de ce composé favorise donc la synthèse de protéines parmi lesquelles la protéase acide.

Par ailleurs, le taux de sucre le plus bas correspond au milieu n°5 ne contenant ni dattes, ni CSL. Le taux le plus élevé est mesuré dans le milieu n°3 enrichi en dattes et en lactosérum, les deux sources principales de sucre. Comme déjà observé dans certains travaux la concentration de 50 g/l [17] est favorable à la croissance de *Penicillium camemberti*. Par leur contenu en sucre facilement utilisables (88% de saccharose, glucose et fructose), les dattes sont donc un bon substrat pour les fermentations par des moisissures [14].

CONCLUSION

La richesse des déchets d'oranges en sucre permet leur utilisation comme substrat pour les cultures de moisissures. L'emploi de ces déchets comme milieu de culture nécessite leur enrichissement en protéines et en facteurs de croissance. Pour cela, deux types de substrat ont été utilisés en suivant une méthode de planification expérimentale. Les uns sont des substrats naturels issus de l'industrie agro-alimentaire (corn-steep liquor, lactosérum et dattes déclassées), les autres sont des substrats chimiques (urée et sulfate d'ammonium).

Le plan d'expériences de Plackett et Burman et l'analyse statistique de l'ensemble des résultats avec modélisation selon une régression linéaire, ont permis de mesurer l'effet de chaque substrat utilisé dans les milieux de culture sur la production de l'activité aspartyl-protéase par *Aspergillus niger*.

La meilleure production de l'enzyme a été obtenue dans le milieu 4 en présence de CSL, d'urée et de dattes avec un résultat de 1881 u. d'activité protéasique mais les résultats statistiques ont permis de sélectionner uniquement le CSL comme facteur d'enrichissement du milieu. En effet, c'est le seul facteur ayant un coefficient de régression avec l'activité AP le plus élevé, de manière très significative (1%). Le coefficient de détermination (R^{**2}), de l'ordre de 0.99 exprime la plausibilité des sous-modèles retenus.

REFERENCES

- [1]- Demain A.L., "Microbial biotechnology (Feature)", *Trends in Biotechnology*, 18(1), (2000), pp. 26-31.
- [2]- Blain J.A., "Industrial enzyme production. The filamentous fungi", Vol. 1, Ed. J. E. Smith & B. R. Berry, London, (1975), pp. 193-211.
- [3]- Durand G., Monsan P., Les enzymes: Production et utilisations industrielles. Costes, Bordas, Paris, (1982), pp. 26-150.
- [4]- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., Lenoir J., "Recherche d'une optimisation pour la production d'enzymes protéolytiques par *Penicillium camemberti*",

- Science des Aliments*, 19, (1999), pp. 663-675.
- [5]- Scriban R., "Biotechnologie", 4^e Ed., Tec. & Doc., Lavoisier, Londres, N.Y., Paris, (1993).
- [6]- Chrzanowska J., Kolaczkowska M., Dryanski M., Stachowiak D., Polanowski A., "Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: Purification, properties and substrate specificity", *Enzyme Microbiol. Technol.*, 17(8), (1995), pp. 719-724.
- [7]- Hadziyev D., "Food chemistry", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, (1987), pp. 58-121.
- [8]- Aunstrup K., Andersen O., Falch E. A., Nielsen T.K., "Production of microbial enzymes", In: Pepler H.T., Perlman D. Microbial technology. Microbial process. 2^e ed. Academic Press, N.Y., San Francisco, Londres, (1979), pp. 281-302.
- [9]- Plackett R.L., Burman J.P., "The design of optimum multifactorial experiment", *Biometrika*, 33, (1946), pp. 305-325.
- [10]- Mechakra A., "Optimisation et modélisation de la production d'enzymes protéolytiques par *Penicillium camemberti*", Thèse de Doctorat ès-Sciences, Univ. Mentouri, Constantine, (2001).
- [11]- Anson M.L., "The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin", *J. Gen. Physiol.*, 22, (1938), pp. 79-89.
- [12]- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193, (1954), pp. 265-275.
- [13]- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.*, 28, (1956), pp. 350-356.
- [14]- Botton B., Breten A., Fevre M., Gauthier S., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., "Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle", Masson, Paris, (1990), pp. 38-300.
- [15]- Lenoir J., Auberger B., Gripon J.C., "Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III- Caractérisation d'une protéase acide", *Lait*, 59, (1979), pp. 244-268.
- [16]- Ellouz-Chaabouni S., Belghith H., Hassani I., M'Rad K., Ellouz R., "Optimisation of cellulase production by *Penicillium occitanis*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, (1995), pp. 267-269.
- [17]- Lenoir J., Glenza A., Bergere L., Cerf O., Choisy C., Desmazand M., Hervier J., "Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*", *Lait*, 53, (1973), pp. 246-279. □