

## ISIYA DAYANIKLI MİKROORGANİZMALAR VE ENZİMLERİ

### THERMOPHILIC MICROORGANISMS AND THEIR ENZYMES

Sibel SUNGUR

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA

**ÖZET:** Birçok hücrel bileşimin denatüre olduğu sıcaklıklarda bazı organizmaların varlığını sürdürebilmesi onların farklı mekanizmalara sahip olduğunu düşündürmektedir. Isıya dayanıklı mikroorganizmalar ve onların enzimleri diğerlerine göre önemli derecede farklıdır. Son yıllarda ısıya dayanıklı enzimlerin yapı ve fonksiyon özelliklerini bulmak, onların bu özelliklerini kullanabilecek yeni teknolojileri geliştirebilmek için birçok çalışma yürütülmektedir.

Bu makalede, ısıya dayanıklı mikroorganizmalar ve onların enzimlerinin yapı ve fonksiyon özellikleri ile endüstriyel uygulamalardaki kullanımlarına ilişkin yapılan çalışmalara örnekler verilmiştir.

**SUMMARY:** The idea of different mechanisms of some organisms is supported by their survival under high temperatures at which most of the cellular compounds are denaturated. Thermophilic microorganisms and their enzymes are comparably different from others. In last years many investigations have been performed to discover the structural and functional characteristics of thermophilic enzymes and to develop new technologies to use their features.

In this article, some samples about the structural and functional specifications and industrial applications of thermophilic microorganisms and their enzymes are given.

#### GİRİŞ

Mikroorganizmalar optimum büyüme yaptıkları sıcaklıklara göre 4 grup altında incelenmektedir; düşük sıcaklık optimasına sahip olan psychrophiller, orta sıcaklık optimasına sahip olan mesophiller, yüksek sıcaklık optimasına sahip olan thermophiller ve çok yüksek sıcaklık optimasına sahip olan ekstra thermophiller (BROCK ve MADIGAN, 1988).

Mikroorganizmalar, değişik çevre koşullarına uyum sağlayabilme yeteneğine sahiptir. Bu ekstrem koşulların biri de sıcaklıktır. Yaşam için gerekli birçok protein, nükleik asit ve düşük molekül ağırlıklı bileşimin denatüre olduğu sıcaklıklarda organizmaların varlığını sürdürebilmesi oldukça ilgi çekmekte ve bu organizmaların normalin dışında mekanizmalara sahip oldukları düşünülmektedir (TANAKA ve Ark., 1971; SINGLETON ve AMELUNXEN, 1973; BROCK, 1985).

Yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmaların yaşayabilmesini sağlayan nedenler konusunda başlıca üç temel görüş bulunmaktadır;

- 1.) Lipit etkileşimi ile sağlanan kararlılık
- 2.) Isı ile denatüre olmuş hücrel bileşiklerin hızlı bir şekilde tekrar sentezlenebilmesi
- 3.) Bu organizmaların ısıya karşı kararlı makromoleküler kompleksler içermesi

#### LİPİTLER

Araştırmalar sonucunda ısıya dayanıklı mikroorganizmaların yüksek erime noktasına sahip lipitler içerdiği tesbit edilmiştir. Bu hücrel lipitlerin erime noktasının hücre büyümesi için sıcaklık sınırını belirlediği öne sürülmektedir. Bazı araştırmacılar da büyüme sıcaklığının artması ile beraber doymuş ve dallanmış yağ asit zincirlerinin yüzdelerinin arttığını öne sürmekte ve bu değişikliklerin daha kararlı bir hücre zarı oluşumuna yol açacağını belirtmektedirler. Yapılan çalışmalar 55°C ta büyüyen termofillerden hazırlanan hücre zarının 37°C ta büyüyen mezofilik mikroorganizmalardan elde edilene göre ısıya daha dayanıklı olduğunu ortaya çıkartmıştır (RAY ve Ark., 1971; RAY ve Ark., 1971; CHAN ve Ark., 1972; NOVITSKY ve Ark., 1972).

#### HIZLI TEKRAR SENTEZ

İncelemeler organizmaların, büyük organizmalara göre yüksek sıcaklıklara daha dirençli olduklarını göstermektedir. Küçük organizmaların yüzey alanlarının hacimlerine oranı daha yüksek olduğu için,

substratın ve atıkların hücre zarından hareketi birim hacim için daha hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve bunun sonucu olarak küçük organizmaların metabolizmaları büyük olanlara göre daha hızlı bir şekilde cereyan etmektedir. Bu bilgilere dayanılarak yüksek sıcaklıklarda büyümenin ısı ile denatüre olmuş hücresel bileşiklerin hızlı bir şekilde tekrar sentezlenmesinden kaynaklandığı öne sürülmektedir. Bu görüşü *B.starothermofilus* bakterisinin protein ve nükleik asit sentezinin *E.coli*'ye göre oldukça hızlı olduğunu belirleyen araştırmalar da desteklemektedir (BUBELA ve HOLDSWORTH, 1966).

## ISIYA DAYANIKLI MAKROMOLEKÜLLER

Bu üç görüş arasında araştırmacılar tarafından en çok desteklenen ısıya dayanıklı makromoleküllerin varlığına üç farklı şekilde yaklaşmaktadır;

- 1.) Termofiller makromoleküllerin ısıya dayanıklılıklarını arttıracak bir faktör içeriyor olabilir
- 2.) Mezofiller makromoleküllerin ısıya dayanıksız olmalarını sağlayan bir faktör içeriyor olabilir
- 3.) Termofillerin hücre bileşenleri ısıya dayanıklı olabilir

Bu hipotezlerle ilgili yapılan araştırmalarda termofillerin hücre dışı bileşenleri ekstrakte edilmiş ve aynı şey mezofilik organizmalar için de yapılarak iki ekstrakt karıştırılarak ısıtılmış ve denatürasyonları incelenmiştir. İnceleme sonucunda termofilik ekstraktlarda belirgin bir şekilde ısıya dayanıklılık olduğu, fakat bu özelliğin mezofilik ekstraktların ısıya dayanıklılığını arttırmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç termofilik organizmalarda kararlılığı sağlayan bir faktör varsa bile bunun başka bir yere aktarılamayacak şekilde hücresel bileşenlere bağlı olduğunu göstermektedir (AMELUNXEN ve LINS, 1968). Bugüne kadar kararlılığı arttırıcı bir faktör olarak bulunabilen tek örnek katalaz enzimindeki (EC 1.11.1.6) 'S' faktörüdür. Termofilik kaynaklardan elde edilen bu enzim 65°C ta optimum aktivite göstermekte iken 'S' faktörü tamamen izole edilip uzaklaştırıldığı takdirde optimum sıcaklık 60°C ta düşmektedir (NAKAMURA, 1960).

Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler endüstriyel olarak oldukça önemlidir (PARVARESH ve Ark., 1990; ZEIKUS, 1979). Bugüne kadar birçok termofilik bakteri incelenmiş ve alfa-amilaz, proteaz, selüloz, hemiselüloz, pektinaz, glukoz izomeraz, beta-glukosidaz, alkol dehidrogenaz ve lipaz gibi birçok enzimin bu mikroorganizmalar tarafından üretildiği tesbit edilmiştir (COWAN ve Ark., 1987; HAGERMAN ve Ark., 1985; SCHOFIELD ve Ark., 1988; BRAGGER ve Ark., 1989).

Isıya dayanıklı mikroorganizmalar mikrobiyal teknoloji için bazı avantajlar sunmaktadır (SONNLEITNER ve FICCHTER, 1983). Mikrobiyolojik fermentasyonda daha yüksek sıcaklıklar birçok bileşimin çözünürlüğünü, difüzyon kapasitesini arttırır, ortamın viskozitesini düşürür. Eğer sıcaklık yeteri kadar yüksekse hücre büyümesini engelleyen bazı uçucu ürünlerde ouharlaştırılarak ortamdaki uzaklaştırılmış olur. Termofillerin ürettiği enzimlerin raf ömürlerinin diğerlerine göre oldukça uzun olması ve daha yüksek sıcaklıklarda biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilmesi bu organizmaları oldukça cazip hale getirmiştir.

Mikroorganizmaların metabolik aktivitesi özellikle büyük ölçekteki fermentasyonlarda önemli bir problem olan sıcaklığın yükselmesi ile durmaktadır. Geleneksel mezofilik organizmaların kullanıldığı fermentasyon proseslerinde, sıcaklığı düşürmek için büyük çaba harcanır ve sistemin toplam enerji harcamasının % 10 gibi bir miktarı ısı transferi için kullanılmaktadır. Termofilik fermentasyonlarda ise soğutmaya gerek olmadığı için % 10 enerji tasarrufu sağlanmış olur.

Termofilik mikroorganizmalar endüstride birçok ürünün üretiminde kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak; laktik asit, asetik asit, etanol, karotenoitler, amino asitler, antibiyotikler vs sayılabilmektedir. Özellikle asitler ve alkoller gibi kimyasalların büyük miktarlarının üretimi için termofilik organizmaların kullanımına çok fazla ilgi gösterilmektedir (ROSSI, 1987; DANIEL ve Ark., 1986; UYAMA ve Ark., 1981; LYUBLINSKAYA ve Ark., 1986).

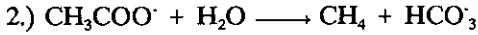
Büyük potansiyele sahip mikrobiyal proses; motorlu taşıtlarda ilave bir yakıt olarak kullanım amacıyla etanol üretimidir. Etanol aynı zamanda Amerika'da en fazla üretilen organik kimyasal olan etilen üretimi için kaynak olarak büyük bir endüstriyel kullanıma sahiptir. Günümüzde Amerika'da mikrobiyal olarak üretilen etanolün büyük kısmı şekerin, maya ile fermentasyonu ile yapılmaktadır. Bazı termofilik anaerobik bakteriler son yıllarda etanol üretiminde çok sık bir şekilde kullanılmaktadır. Etanol üretimi için termofilik mikroorganizmaların en cazibedici yönü bitkisel kaynaklardan elde edilen organik materyalin kaynak olarak değerlendirilebilmesidir. Tarım ve orman endüstrisinden elde edilen selülozik materyal çok

büyük miktarlardadır ve karbonhidrat fermentasyonu için tüketilemeyecek bir kaynaktır. Yaygın bir şekilde kullanılan diğer bir karbonhidrat kaynağı, esas olarak mısırdan elde edilen nişastadır.

Termofilik mikroorganizmaların etanol üretiminde kullanılmasının üç avantajı vardır;

- 1.) Yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı ürün olarak elde edilen etanolün distilasyonunu daha verimli bir şekilde yapmaktadır.
- 2.) Sistemi soğutmak gerekmez, halbuki maya fermentasyonunda gereklidir.
- 3.) Maya polisakkarit polimerlerinin hidrolizini yapamaz. Bazı termofilik bakteriler ise direk olarak polisakkaritlerden etanol elde edilmesi fermentasyonunu gerçekleştirebilir. Bu konu ile ilgili *Clostridium thermocellum* bakterisi örnek olarak verilebilir. Bu organizma selülozdan direkt olarak etanol üretiminde kullanılmaktadır.

Termofilik organizmalar atıkların işlenmesinde ve değerlendirilmesinde de önemlidir. Bu mikroorganizmalar birçok endüstriyel ve kanalizasyon atıklarından metan gazı üretiminde kullanılmaktadır. Bu proseslerin amacı kompleks ve suda çözünmeyen organik materyalleri yüksek enerjili bir yakıt olan metan gazına dönüştürmektir. Termofilik metan gazı bakterileri iki ana reaksiyonun oluşmasını sağlayabilmektedir;



Bu reaksiyonlarda metan bakterilerinin substratları olan hidrojen gazı ve asetat sisteme ilave edilen diğer termofilik bakteriler tarafından yine kompleks organik atıklardan üretilmektedir (WOLIN, 1963). Günümüzde birçok büyük ölçekte termofilik atık işleme prosesi 50-60°C taki sıcaklıklarda dünyanın çeşitli şehirlerinde kullanılmaktadır.

Mezofilik proseslere göre termofilik atık işleme proseslerinin avantajları;

- 1.) Reaksiyon hızlı ve süresi kısadır
- 2.) Kanalizasyonda bulunabilecek bazı istenmeyen mikroorganizmalar yüksek sıcaklıklarda tahrip olmaktadır
- 3.) Karıştırma için daha az enerji gereksinimine neden olacak düşük viskozite
- 4.) İşlem sonunda oluşacak çamurun daha kolay bir şekilde su kaybederek kuruması

Enzimlerin besin maddelerinin katkılarında ve özelliklerini değiştirmede kullanımı uzun yıllardan bu yana bilinmektedir. İkinci Dünya Savaşından beri yeni enzim ve enzim kaynaklarını bulma konusunda büyük çabalar harcanmaktadır. Yeni enzim geliştirmelerinin önündeki en büyük engel yüksek maliyetleridir. Enzimlerin üretim ve kullanım maliyetlerini düşürebilmek için üç önemli konuda araştırmalar sürdürülmektedir (WASSERMAN, 1984; AUNSTRUP, 1983); mikrobiyal strain geliştirme, enzim ve hücre immobilizasyonu, enzim kararlılığını artırıcı çalışmalar. Bu makalede bahsedilen ısıya dayanıklılık 60°C ve üzerindeki bir sıcaklıkta enzimin uzun süre aktivitesini koruması anlamındadır. Bu iki yönden önemlidir; Öncelikle her 10°C sıcaklık artışında reaksiyon hızları yaklaşık iki katına çıkmaktadır, böylece reaksiyon ortamının sıcaklığının 10°C artması ile teorik olarak ihtiyaç duyulan enzim miktarı yarıya düşmekte veya reaksiyon süreleri kısaltılabilmektedir. İkinci olarak 60°C ve üzerindeki sıcaklıklar mikrobiyolojik büyüme için inhibitördür. Birkaç gün süren serbest enzim reaksiyonları ve immobilize enzim reaktörleri, bu konuda kirliliğin önlenmesi açısından önem verilmesi gereken yerlerdir. Proseslerde ısıya dayanıklı mikroorganizma veya enzim kullanılması ile bu problem kendiliğinden bir ölçüde çözülmüş olmaktadır (GODFREY, 1983).

Isıya dayanıklı mikroorganizmalar ve onların enzimleri diğerlerine göre önemli derecede farklıdır. Termofilik organizmalardan elde edilen enzimler mezofiliklerden elde edilen benzer katalizörlere göre; ısıya, protein denatürantlarına (organik çözücüler, asitler, bazlar, çeşitli anyonlar vs) karşı daha dayanıklıdır (ZAKS ve KLIVANOV, 1984; GUAGLIARDI ve Ark., 1989).

Günümüzde, ısıya dayanıklı enzimlerin yapı ve fonksiyon özelliklerini bulmak, ısıya dayanıklılığın genetik temellerini araştırmak ve mezofilik mikroorganizmaların ısı nedeniyle inaktivasyonunu engelleyebilmek için yapılması gereken genetik değişiklikleri tesbit edebilmek amacı ile bir çok çalışma yürütülmektedir (FONTANA, 1988; PATCHETT ve Ark., 1989; GREENBERG ve MAHONEY, 1982; KINDLE, 1983).

Isı ile temas sonucunda biyolojik aktivitelerinin azalması, bütün bilinen enzimlerin temel

karakteristigidir. Enzim kararlılığını belirleyen temel kavram proteinlere onların doğal ikincil ve üçüncül yapılarını veren kovalent olmayan güçtür. Bunlar elektrostatik iyon çiftlemesi, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerdir. Bir enzimdeki kovalent olmayan bu etkileşimlerin sayısı tamamiyle onun birincil yapısından kaynaklanmaktadır. Artan ısı dayanıklılığının nedenlerini açıklayabilmek konusunda iki değişik yaklaşım vardır. Bunlardan birincisi sıcaklığı kullanılabilir yüzey alanı ve hidrofobisite gibi istatistiki parametrelere dayandırır, bu yaklaşım amino asit bileşimini, içerdiği moleküllerin dağılımını dikkate almadan değerlendirdiği için birçok uyumsuz olduğu durum vardır ve yararlılığı kısıtlıdır. Bundan daha başarılı olan diğer yaklaşım ise ısıya dayanıklı ve dayanıksız enzimleri, onların özel amino asit bağlantılarına bakarak karşılaştırma yöntemidir. Bu çalışma amino asit sıra analizlerini ve bazan x-ray kristallografi çalışmalarını içermektedir. Çalışmalar çok ufak yapısal değişikliklerin bile enzimlerde önemli ölçüde ısıya dayanıklılığı etkilediğini göstermektedir (GRUTTER ve Ark., 1979; IKAI, 1980; RUEGG ve Ark., 1982).

## SONUÇ

Isıya dayanıklı mikroorganizmaların bulunması ile endüstride daha gelişmiş uygulamalarda kullanılacak yeni bir sınıf biyokatalist devreye girmeye başlamıştır. Yüksek sıcaklıklarda, yüksek tuz konsantrasyonlarında, uç pH'larda, organik çözücülerde kararlı olabilen biyokatalistlerin varlığı, onların bu özelliklerini kullanabilecek yeni teknolojilerin geliştirilmesine yol açacağı açıktır (PULVIN ve Ark., 1988; PULVIN ve Ark., 1986; MOZHAEV ve Ark., 1991; ROY ve Ark., 1989; PISANI ve Ark., 1990).

## KAYNAKLAR

- AMELUNXEN, R.E., LINS, M., 1968. Comparative thermostability of enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*. Arch. Biochem. Biophys., 123: 765-769.
- AUNSTRUP, K. 1983. Enzymes of industrial interest-Traditional products. Chpt. 7 in "Annual Reports on Fermentation Processes, Vol. 6", G.T. Tsao, M.C. Flickinger, and R.K. Finn, Eds., Academic Press, New York.
- BRAGGER, J.M., DANIEL, R.M., COOLBEAR, T., MORGAN, H.W. 1989. Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and cubacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31:556-561.
- BROCK, T.D. 1985. Life at high temperatures. Sci. 230, 132-138.
- BROCK, T.D., MADIGAN, M.T. 1988. Biology of microorganisms. Prentice Hall International, Inc., USA.
- BUBELA, B. and HOLDSWORTH, E.S. 1966. Amino acid uptake, protein and nucleic acid synthesis and turnover in *Bacillus stearothermophilus*. Biochim. Biophys. Acta, 123:364-375.
- CHAN, M., VIRMANI, Y.P., HIMES, R.H., and AKAGI, J.M. 1972. Spin-Labening studies on the molecular environment in the cell membrane of a facultative thermophilic bacterium. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 72nd, Philadelphia, 177.
- COWAN, D.A., SMOLENSKI, K.A., DANIEL, R. M., MORGAN, H.W. 1987. An extremely thermostable extracellular proteinase from a strain of the archaeobacterium *Desulfurococcus* growing at 88°C. Biochem. J., 247:121-133.
- DANIEL, R.M., MORGAN, H.W., MARTIN, A.M. 1986. The industrial potential of extreme thermophiles. Ind. Biotechnol., 6:89-91.
- FONTANA, A. 1988. Structure and stability of thermophilic enzymes. Studies on thermolysin. Biophys. Chem., 29: 181-193.
- GODFREY, T., REICHEL, J. 1983, "Industrial Enzymology" Nature Press, New York.
- GREENBERG, N.A., MAHONEY, R.R. 1982. Production and characterization of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. J. Food Sci., 47:1824-1830.
- GRUTTER, M.G., HAWKES, R.B., MATTHEWS. B.W. 1979. Molecular basis of thermostability in the lysozyme from *Bacteriophage T4*. Nature, 277:667-675.
- GUAGLIARDI, A., MANCO, G., ROSSI, M., BARTOLUCCI, S. 1989. Stability and activity of a thermostable malic enzyme in denaturants and water-miscible organic solvents. Eur. J. Biochem., 183:25-30.
- HEGERMAN, A.E., BLAU, D.M., CLURE, A.L. 1985. Plate assay for determining the time of production of protease, cellulase, and pectinases by germinating fungal spores. Anal. Biochem., 151:334-342.
- IKAI, A. 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. J. Biochem., 88:1895-1900.
- KINDLE, K.L. 1983. Characteristics and production of thermostable alpha-amylase. Appl. Biochem. Biotech., 153-158.
- LYUBLINSKAYA, L.A., BOYSTSOVA, S.E., STEPONOV, V.M. 1986. Thermolysin catalyzed synthesis of methyl esters of acylated peptides in concentrated aqueous solutions using enzyme from *Bacillus thermoproteolyticus*. Bioorg. Khim., 12(10): 1301-1305.
- MOZHAEV, V.V., POLTEVSKY, K.G., SLEPNEV, V.I., BADUN, G.A., LEVASHOV, A.V. 1991. Homogeneous solutions of hydrophilic enzymes in nonpolar organic solvents. FEBB, 92(1,2):159-161.
- NAKAMURA, Y. 1960. Studies on the catalase of a thermophilic bacterium. J. Biochem. 48: 296-307.
- NOVITSKY, T.J., CHAN, M., HIMES, R.H., AKAGI, J.M. 1972. Studies on the cell wall of two facultative thermophilic bacteria. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 72 nd, Philadelphia, 65.

- PARVARESH, F., VIC, G., THOMAS, D., LEGOY, M.D. 1990. Uses and potentialities of thermostable enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 303-312.
- PATCHETT, M.L., DANIEL, R.M., MORGAN, H.M. 1987. Purification and properties of a stable beta-glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium. *Biochem. J.*, 243: 779-787
- PISANI, A., RELLA, R., ROZZO, C., RAIÀ, C.A., NUCCI, R., GAMBACORTA, A., ROSA, M., ROSSI, M. 1990. Purification and properties of a new beta-galactosidase isolated from the extreme thermophilic archaeobacterium *S.solfataricus*. *Eur. J. Biochem.*, 187: 321-328.
- PULVIN, S., LEGOY, M.D., LORTIC, R., PENZA, M., THOMAS, D. 1986. Enzyme technology and gas phase catalysis: alcohol dehydrogenase example. *Biotechnol. Lett.*, 8(11): 783-784.
- PULVIN, S., PARVARESH, F., THOMAS, D., LEGOY, M.D. 1988. Solid-gas reactors: a comparison between the horse liver and the thermostable *Sulfalobus solfataricus* ADH. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 342:434-439.
- RAY, P.H., WHITE, D.C., BROCK, T.D. 1971. Effect of temperature on the fatty acid composition of *Thermus aquaticus*. *J. Bacter.*, 106: 25-30.
- RAY, P.H., WHITE, D.C., BROCK, T.D. 1971. Effect of growth temperature on the lipid composition of *Thermus aquaticus*. *J. Bacter.*, 108: 227-235.
- ROSSI, M. 1987. Applications potentielles des procaryotes thermophiles. *Biofutur.*, January, 39-40.
- ROY, S.K., RAHA, S.K., DEY, S.K., CHAKRABARTY, S.L. 1989. Immobilization of beta-glucosidase from *Myceliophthora thermophila* D-4; *Enzyme Microb. Technol.*, 11:431-435.
- RUEGG, C., AMMER, D., LERCH, K. 1982. Comparison of amino acid sequence and thermostability of tyrosinase from three wild type strains of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 257: 6420-6431.
- SCHOFIELD, L.R., NEAL, T.L., PATCHETT, M.L., STRANGE, R.C., DANIEL, R.M., MORGAN, H.W. 1988. The purification of cellulase and hemicellulase components from an extreme thermophile by the cloning of enzymes into *E. coli*. *Proceedings of the IXth Enzyme engineering Conference, Santa Barbara, USA. Ann. NY Acad. Sci.*, 542: 240-243.
- SINGLETON, R., AMELUNXEN, R.E. 1973. Proteins from thermophilic microorganism. *Bacter. Rev.*, sept., 320-342.
- SONNLEITNER, B., FIECHTER, A. 1983. Advantages of using thermophiles in biotechnological processes. *Trends Biotechnol.*, 1:74-80.
- TANAKA, M., HANIU, M., MATSUEDA, G., YASUNOBU, K., HIMES, R.H., AKAGI, J.M., BARNES, E.M., DEVANATHAN, T. 1971. The primary structure of the *Clostridium tartarivorum* ferredoxin, a heat-stable ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 246:3953-3960.
- UYAMA, K., NISHIMURA, S., NONAKA, Y.K., KIHARA, K., HASHIMOTO, T. 1981. Synthesis of an aspartame precursor by immobilized thermolysin in an organic solvent. *J. Org. Chem.*, 46:5241-5242.
- WASSERMAN, B.P. 1984. Thermostable enzyme production, *Food Technol.*, feb., 78-98.
- WOLIN, E.A., WOLIN, M.J., WOLFE, R.S. 1963. Formation of methane by bacterial extract. *J. Biol. Chem.*, 238:2882-2886.
- ZAKS, A., KLIBANOV, A.M. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, 224:1249-1251.
- ZEIKUS, J.G. 1979. Thermophilic bacteria: ecology, physiology, and technology. *Enzyme Microb. Technol.*, 1:243-252.