

Ekstraselüler *Bacillus* Proteazlarının Bazı Özellikleri ve Enzim Üretiminin Optimizasyonu

Araş. Gör. Melike BALK — Doç. Dr. Sedat DÖNMEZ

ÖZET

Bu araştırmada çeşitli gıda maddelerinden izole edilen *Bacillus sp.*'lerin proteolitik özellikleri araştırılmıştır. 12 farklı *Bacillus sp.*'nin bazı sıvı ve katı ortamlardaki toplam proteaz aktiviteleri (TPA) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en fazla TPA gösteren iki *Bacillus sp.* seçilerek değişik bileşimlerdeki besi yerlerinde, enzim üretimleri için uygun koşullar araştırılmıştır.

Katı besiyerinde en fazla TPA gösteren *B. cereus* ve *B. subtilis*'in deneneni sıvı besiyerinde de en yüksek TPA'ları gösterdikleri belirlenmiştir. Enzim üretimi amacıyla 5 farklı sıvı besiyeri kullanılmış ve FC broth besiyerinin bir modifikasyonu ile 37°C'de 48 saat inkübasyon sonunda *B. cereus*'un pH 9,0-10,0 aralığında 600 U/ml, *B. subtilis*'in ise aynı koşullarda, ancak pH 7,0-9,0 aralığında 525 U/ml TPA gösterdikleri saptanmıştır.

Seçilen 2 *Bacillus sp.*'nin ürettiği ekstraselüler proteazlarının özelliklerini belirlemek amacıyla, her iki bakteri proteazına çeşitli konsantrasyonlardaki etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve ZnSO₄'ün etkileri incelenmiştir. Buna göre *B. subtilis* proteazını 200 µ M EDTA, % 65 oranında inhibe etmiş, ancak 0,2 mM ZnSO₄ ile yeniden aktivasyon sağlanabilmiştir. *B. cereus* proteazı ise bu iki ajandan hemen hemen hiç etkilenmemiştir. Elde edilen bulgulardan, *B. subtilis*'in bir metalloproteaz, *B. cereus*'un ise bir alkali proteaz ürettiği sonucuna varılmıştır.

Bakteri proteazlarının izolasyon çalışmalarında *B. cereus* proteazı % 49, *B. subtilis* proteazı ise % 47 oranında geri kazanılabilmektedir.

SUMMARY

Some Properties of Extracellular *Bacillus* Proteases and Optimisation of Enzyme Production.

In this study, extracellular proteases of some *Bacillus* species were investigated. 12 *Bacillus sp.* were firstly tested with agar and

broth media maximum total protease activities (TPA) were showed by *B. cereus* and *B. subtilis* and these bacteria were used for protease production 5 different broth media were prepared for this purpose. Among the media, maximum activities were obtained from a modification of FC broth medium. After 48 hours incubation time at 37°C, TPA from *B. cereus* on FC broth medium was obtained about 600 U/ml at 9,0-10,0 pH range. At the same conditions, *B. subtilis* protease showed 525 U/ml activity at pH 7,0-8,0.

Effects of various concentrations of ZnSO₄ and EDTA on crude protease solutions were detected. The protease activity of *B. subtilis* was inhibited about 65 % with 200 µM EDTA but this activity could be reactivated with 0,2 mM ZnSO₄. These agents didn't very much inhibit the protease activity of *B. cereus*. These results indicated that *B. subtilis* protease was a metalloprotease but *B. cereus* protease was not.

The enzyme protein in crude enzyme solutions were partially recovered. *B. cereus* protease was isolated up to 49 % and *B. subtilis* protease was isolated up to 47 %.

GİRİŞ

Enzimler, başta gıda ve deterjan sanayii olmak üzere birçok alanda çeşitli amaçlarla yıllardır kullanılmaktadır. Gıda sanayiinde enzim uygulamaları ile gıdaların işlenmeleri kolaylaştırılmakta, tad, flavor, tekstür v.b. gibi pek çok özellikleri değiştirilebilmekte veya istenilen özellikler kazandırılabilir. Gıda sanayinde kullanılan enzimlerin hemen hemen hepsi hidrolaz grubu enzimler olup en önemlileri ise proteaz'lar ve amilaz'lardır. Çeşitli özelliklerdeki proteaz enzimleri uzun yıllardır bazı bitkisel, hayvansal ve mikrobiyel kaynaklardan elde edilebilmesine karşın son yıllarda, mikrobiyel kaynaklardan üretilen proteaz miktarı artış göstermiştir. Buna karşın papain, bromelin ve fisin gibi proteaz enzim-

leri bitkilerden, rennin buzağuların 4. mide'lerinden, nötral ve bazik proteazlar bakterilerden, asit proteazlar ise bazı küf mantarlarından endüstriyel ölçekte üretilmektedir.

Anlaşılabacağı gibi proteaz enzimlerinin üretiminde bakteriler daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı *Bacillus* ve *Clostridium*'lar üretimde kullanılan bakterilerdir. Bununla birlikte çeşitli bakterilerden elde edilen çeşitli özelliklerdeki proteaz'lar ve bunların kullanım alanları da giderek artış göstermektedir. Ülkemizde de enzim kullanımı her geçen gün artmakta ve dışalım yoluyla sağlanan enzimler için ödenen döviz miktarı da giderek artış göstermektedir.

Bu çalışmada bazı gıda maddelerinden izole edilmiş olan çeşitli *Bacillus* suşlarının proteolitik enzimlerinin özellikleri ve bunların üretim koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çeşitli yöntemlerle, toplam proteaz aktivitelerine göre seçilen *Bacillus* suşlarının proteaz enzimini üretim koşulları belirlenmiş ve suşların proteaz enzimlerinin özellikleri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Mikroorganizmalar

Bacillus cereus, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. pumillus*, *B. licheniformis* ve türü saptanmamış 5 *Bacillus* sp. kullanılmıştır.

Kültürler, yatık Nutrient Agar (Oxoid)'da 4°C'de saklanmışlar ve aylık periyotlarda yenilenmişlerdir.

2.2. Besiyerleri

2.2.1. Proteaz aktivitesi belirlemek için kullanılan besiyerleri

- DN Agar (Başoğlu 1988)
- Yağsız - süt Agar (Carlisle ve Falkinham 1989)
- Nutrient Broth (Oxoid)

2.2.2. Enzim üretim besiyerleri

Proteaz üretimi amacıyla farklı bileşimlerdeki 5 besiyeri kullanılmıştır. Bunlar,

- FC Broth (Keay vd. 1972)
- SFS Broth (Keay vd. 1972)
- SCS Broth (Aunstrup 1980)
- DN Broth (Başoğlu 1988)
- MPG Broth (Jensen 1972)

2.3. Bakteri Gelişiminin İzlenmesi

Bakteri gelişmesi, optik yoğunluk ölçülmesi ve protein miktarı tayinleri ile belirlenmiştir. 37°C sıcaklıkta 1000 ml'lik erlenmeyerlerdeki 250 ml besiyerinde ve 150 rpm çalkalamalı koşulda 24 saat süre ile inkübasyona bırakılan kültürlerden, ikişer saat aralıklarda alınan örneklerdeki optik yoğunluk (OD) ve protein tayinleri yapılmıştır.

Bakteri gelişmesinin izlenmesi için, alınan örneklerde 620 nm'de taze besiyerine karşı OD ölçülmüştür (Başoğlu 1988). Protein miktarının saptanmasında ise Lowry yöntemi uygulanmıştır (Lowry vd. 1951).

2.4. Toplam Proteaz Aktivitesinin (TPA) Belirlenmesi

2.4.1. Katı ortamlarda TPA ölçümü

Nutrient Broth ortamında 37°C'de geliştirilen 16-18 saat'lik kültürler katı besiyerlerine sürme, damlatma ve disk yöntemleriyle ekilmiş ve oluşan koloniler veya diskler etrafındaki zonların çapları mm olarak ölçülerek belirlenmiştir (Başoğlu 1988, Carlisle ve Falkinham 1989).

2.4.2. Sıvı ortamlarda TPA ölçümü

Örnekler, 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, hücreler ayrılmış ve süpernatantta TPA ölçülmüştür (Keay ve Wildi, 1970).

Hesaplamalarda 0-60 µg/ml tirozin (Merck) ile hazırlanan standart eğri kullanılmış ve 1 µg/ml tirozin 2 U/ml enzim aktivitesi olarak değerlendirilmiştir.

2.5. Proteaz Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Seçimi

Seçilen bakteriler, üretim besiyerlerinde 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Üretim ortamlarında 8 saatlik zaman aralıklarında alınan örneklerde TPA ölçümleri yapılmış ve her iki bakteri için en fazla TPA gösteren besi ortamı seçilmiştir.

2.6. Üretilen Enzimlerin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

Üretim besiyerlerinde geliştirilen bakterilerin bulunduğu ortamlar substrat ilave edilme-

den önce katlı filtre kağıtlarından geçirilerek kaba partiküller uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 6000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek hücresiz ekstraktlar elde edilmiş ve bu sıvılarda enzimlerin bazı özellikleri araştırılmıştır.

2.6.1. Optimum sıcaklığın saptanması

Kaba enzim ekstraktları 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C'lerdeki su banyosunda substratla birlikte 10 dk. tutulmuş ve bu süre sonundaki enzim aktivitesi 2.4.2.'deki gibi ölçülmüştür.

2.6.2. Kaba enzim ekstraktlarında ZnSO₄'ün ve EDTA'nın etkisi

ZnSO₄'ün etkisi Tan ve Konings (1990)'e göre EDTA'nın etkisi ile Manachini vd. (1988)'e göre saptanmıştır.

2.7. Enzimin Geri Kazanılması

Uygun üretim ortamında geliştirilen bakteri süspansiyonundan 50 ml örnek alınarak katlı filtre kağıtlarından geçirilmiş ve daha sonra santrifüjle hücresiz enzim ekstresi elde edilmiştir. Bu ekstrede bulunan enzim proteini etil alkol (% 96) ve amonyum sülfatla ayırmaya çalışılmıştır. Bu aşamada amonyum sülfat ve etil alkol ayrı ayrı ve birlikte denenmiştir. Etil alkol ve amonyum sülfat sürekli olarak karıştırılan süspansiyona çözelti oluşana kadar azar azar ilave edilmiştir. Çökelti 6000 rpm'de 10 dk. santrifülenerek ayrılmış ve 7,0-9,0 pH'larda hazırlanan 0,05 M fosfat tamponda çözülerek her kademede spesifik aktivite değerleri belirlenmiştir. Daha sonraki aşamada enzim çözeltileri fosfat tampona karşı diyaliz edildikten sonra TPA değerleri saptanmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Katı besiyerlerine ekim yöntemlerinden disk yöntemine göre en belirgin ve düzgün zonlar, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis* ve 7 no.lu *Bacillus sp.*'de saptanmıştır. Bakterilerin oluşturdukları zon çaplarının 48 saat inkübasyon süresince özellikle 24. ve 36. saatler arasında maksimum artış gösterdikleri gözlenmiştir. Diğer 7 bakteri ile yapılan denemelerde ise zon oluşumları net şekilde gözlenemediğinden ölçüm yapılamamıştır.

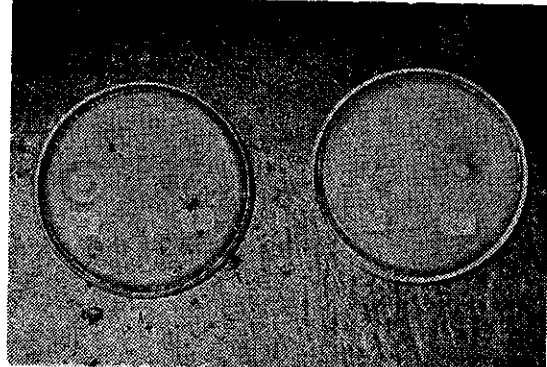
Sıvı ortam olarak kullanılan Nutrient Broth besiyerinde ise *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. pumilis*'in diğer *Bacillus sp.*'lerden

daha fazla TPA gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Nutrient Broth besiyerinde 150 rpm çalkalamalı koşulda, 37°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda elde edilen maksimum TPA değerleri

	TPA (U/ml)
<i>B. cereus</i>	79
<i>B. subtilis</i>	63
<i>B. licheniformis</i>	32
<i>B. pumilis</i>	24

Maksimum TPA'lar *B. cereus* ve *B. subtilis* proteazlarında belirlendiğinden daha sonraki üretim çalışmalarında bu bakteri kullanılmıştır.



Şekil 1. *B. cereus* ve *B. subtilis*'in DN agar (A) ve yağsız - süt agardan (B) 37°C'de 20. saatte oluşturdukları zonlar (*B. cereus* 1, *B. subtilis* 2).

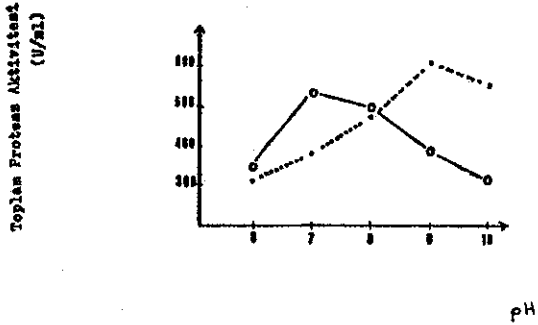
Seçilen bakterilerin proteaz üretimlerini incelemek amacıyla çeşitli bileşimdeki sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Bu besiyerlerinde 37°C'de 48 saat inkübasyon sonunda ve 150 rpm çalkalamalı koşulda elde edilen maksimum TPA değerleri Çizelge 2'deki gibidir.

B. cereus ve *B. subtilis* ile maksimum TPA değerleri FC Broth besiyerinde elde edildiği için daha sonraki çalışmalarda bu besiyeri kullanılmıştır. Bakterilerin 48 saat inkübasyon sonunda FC Broth ortamlarından ayrılmasıyla elde edilen sıvı kısımlar kaba enzim ekstresi olarak adlandırılmıştır. Bu sıvılar, değişik pH'larda hazırlanan kazein çözeltileriyle reaksiyona sokulmuşlardır. Bulgulara göre *B. cereus* proteazı pH 9,0-10,0 aralığında, *B. subtilis* proteazı ise

Çizelge 2. Farklı bileşimlerdeki sıvı besiyerlerinde geliştirilen *B. cereus* ve *B. subtilis*'in TPA değerlerinin karşılaştırılması.

	<i>B. cereus</i> proteazı (U/ml)	<i>B. subtilis</i> proteazı (U/ml)
1 - DN Broth	238	217
2 - FC Broth	610	537
3 - SCS Broth	205	221
4 - MPG Broth	77	62
5 - SFS Broth	162	181

pH 7,0-8,0 aralığında maksimum aktivite göstermişlerdir (Şekil 2).

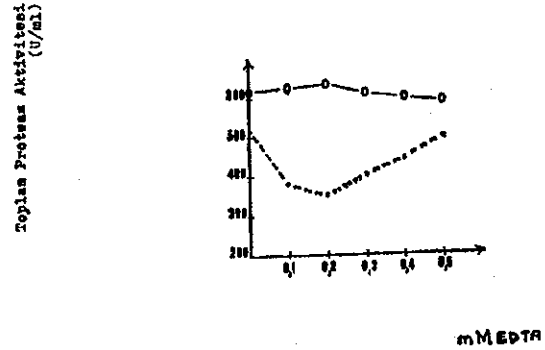


Şekil 2. Değişik pH'ların kaba enzim ekstraktındaki TPA'ya etkisi (0-0 *B. subtilis*, ...; *B. cereus*), FC besiyeri, 37°C

Halpern (1981), değişik besiyerlerinde *Bacillus sp.*'lerle yaptığı proteaz aktivitesi çalışmalarında, tanımlanmamış bir *Bacillus sp.*'den 2700 U/ml, Keay vd. (1970) ise *B. cereus* ATCC 14579'dan 1280 U/ml, *B. cereus* NTCC 945'den 447 U/ml ve *B. subtilis* 941'den ise 1110 U/ml proteaz aktivitesi elde edebilmişlerdir. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında, çalışmamızda seçilen bakterilerin çeşitli proteaz enzimlerinin üretiminde kullanılabilecekleri anlaşılmıştır.

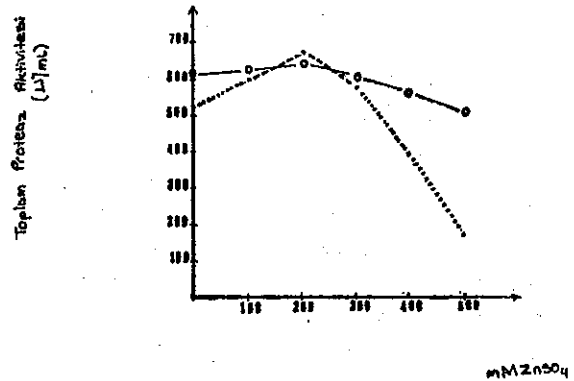
Başoğlu (1988)'nin yaptığı bir çalışmada, kazein içeren katı besiyerlerine 0,1-0,5 mM arasında değişen konsantrasyonlarda EDTA ilave edilmiş ve bakterilerin oluşturduğu zon çaplarının EDTA içermeyen aynı besiyerindeki zon çaplarına oranla çok daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Bosman vd. (1990) sıvı besiyerinde bir *Lactococcus lactis* suşundan elde edip saflaştırdıkları nötral tripeptidazı 0,2 mM EDTA ile % 79 oranında inaktive etmişlerdir.

Bu çalışmada *B. cereus* proteazının aktivitesi değişik konsantrasyonlarda hazırlanan EDTA çözeltilerinden hemen hemen hiç etkilenmediği, *B. subtilis* proteazının ise 20 μ M'lık EDTA çözeltisi ile aktivitesinin % 65 oranında kaydettiği saptanmıştır (Şekil 3).



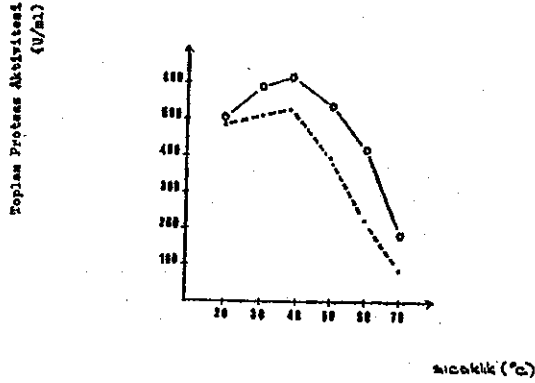
Şekil 3. Çeşitli EDTA konsantrasyonlarının toplam proteaz aktivitesine etkisi (0-0; *B. cereus*, ...; *B. subtilis*). FC Broth, 37°C.

Manachini vd. (1988) ve Bosman vd. (1990), EDTA ile inaktive olmuş bir proteazın yeniden aktivasyonunun bazı metal iyonlarıyla sağlanabileceğini bildirmişlerdir. Bu amaçla çalışmamızda kullanılan 200 μ M EDTA ve daha sonra 0,2 mM $ZnSO_4$ uygulanmış *B. subtilis* proteazı aktivitesini yeniden kazanırken, *B. cereus* proteazı için değişik $ZnSO_4$ konsantrasyonları denenmiş fakat aktivite değişmemiştir. Bu bakterilerin aktivite gösterdikleri pH aralıkları da dikkate alındığında, *B. cereus*'un alkali-serin proteaz, *B. subtilis*'in ise nötral metalloproteaz ürettikleri sonucuna varılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Değişik $ZnSO_4$ konsantrasyonlarının *B. cereus* ve *B. subtilis* kaba enzim aktivitelerine etkisi (0-0; *B. cereus*, ...; *B. subtilis*) FC Broth, 37°C.

Sıcaklıkla ilgili çalışmalarda, her iki bakterinin de TPA'larının 30-40°C'ler arasında maksimum değerlere ulaştıkları sıcaklık arttıkça aktivitenin azaldığı saptanmıştır, 70°C'de *B. subtilis*, aktivitesini % 81, *B. cereus* % 69 oranında kaybetmiştir. Enzimlerin aktivitelerini tamamen kaybetmemeleri, stabilize edici maddelerin ilavesiyle başlangıçta gıda endüstrisi dışındaki bazı endüstrilerde kullanım olanakları bulunabileceğini göstermiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Değişik sıcaklıkların *B. cereus* ve *B. subtilis* kaba enzim aktivitelerine etkisi (o-o; *B. cereus*, ---; *B. subtilis*) FC Broth.

Enzimin geri kazanılması çalışmalarında ise, amonyum sülfat çöktürmesiyle daha yüksek aktivite değerleri elde edilmiştir. Çöktürülen enzim proteini fosfat tampon içinde alkol ile çöktürülen örneğe göre daha kolay çözünmüştür. Ancak bu yöntemde tuz konsantrasyonu arttığından çöktürülmüş enzim, fosfat tampona karşı diyaliz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3 a. ve 3.b.'deki gibidir.

Benzer izolasyon çalışmaları yapan Whitaker (1970) ve Cihangir (1987) in bulgularıyla bu çalışmada elde edilen sonuçların uyum gösterdiği belirlenmiştir. Böylece basit ekstraksiyonla elde edilen enzim sıvılarının yeterli aktiviteye sahip oldukları ve bazı endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceği düşünülmüştür.

Çalışmalarımızda, yüksek proteaz aktivitesine sahip olduğu saptanan *B. cereus*'un FDA'ya göre GRAS mikroorganizmalar arasında olması bunların gıda endüstrisi dışında bazı endüstrilerde kullanılabileceğini göstermiştir. *B. subtilis* ise GRAS organizma olmasına karşın daha az enzim üretmektedir.

Sonuç olarak, bu iki bakteri ile ülkemiz koşullarında daha kısa sürede ve basit yön-

Çizelge 3 a. *B. cereus* Kaba Enzim Ekstresinde Çeşitli İzolasyon Çalışmaları

	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Proteaz Aktivitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Geri Kazanç (%)	Saflaştırma Katsayısı
Kaba Enzim	250	253,32	610	602	100,0	1,00
Çöktürme	50	155,30	2725	877	89,0	1,46
Diyaliz	25	56,00	3002	1340	49,0	2,23

Çizelge 3 b. *B. subtilis* Kaba Enzim Ekstresinde Çeşitli İzolasyon Çalışmaları

	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Proteaz Aktivitesi (U/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Geri Kazanç (%)	Saflaştırma Katsayısı
Kaba Enzim	250	255,70	537	525	100,0	1,00
Çöktürme	50	147,30	1983	673	74,0	1,28
Diyaliz	25	61,80	2530	1024	47,0	1,95

temlerle değişik özellikteki proteazların elde edilebileceği anlaşılmıştır. Özellikle çevre kirlenici etkilerinden dolayı deri sanayinde uygulanan ve giderek terk edilen kimyasal yöntem-

ler yerine enzimatik uygulamaların kullanılması, çeşitli endüstriler için uygun proteazların eldesi ve bu yolla döviz kaybının önlenmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- AUNSTRUP, K. 1980. Proteinases. ROSE, A.H. (Ed.) Economic Microbiology. Microbial Enzymes and Bioconversions. 5 (2): 50-114.
- BAŞOĞLU, A. 1988. Ekstrasellüler Proteazların *Bacillus subtilis* 168 Tarafından Üretilmesi. ODTÜ, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 75 s. (Basılmamış).
- BOSMAN, W.B., TAN, T.S.P. ve KONINGS, N.W. 1990. Purification and Characterisation of a Tripeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology. 56 (6): 1839 - 1843.
- CARLISLE, G.E. ve FALKINHAM, O.J., 1989. Enzyme Activities and Antibiotic Susceptibility of Colonial Variants of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*. Applied and Environmental Microbiology. 55 (11): 3026-3028.
- ÇEHANGİR, N., 1987. Proteaz Enziminin Bakteriye Kaynaklardan Safılaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. H.Ü. Mikrobiyoloji Programı, Bilim Uzmanlığı Tezi, 53 s. (Basılmamış).
- HALPERN, M.G. 1981. Proteolytic Enzymes from Bacteria. Industrial Enzymes from Microbial Sources. Recent Advances. New York, 186-5070.
- JENSEN, E.D. 1972. Continuous Production of Extracellular Protease by *Bacillus subtilis* in a Two-stage Fermentor. Biotechnology and Bioengineering. 14: 647 - 662.
- KALISZ, M.H. 1988. Microbial Proteinases. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 36: 3 -- 29.
- HEAY, L. ve WILDI, S.B. 1970. Proteases of the Genus *Bacillus* I. Neutral Proteases. Biotechnology and Bioengineering. 12: 179 - 212.
- KEAY, L., MOSELEY, W.P. ve WILDI, B.S. 1970. Proteases of the Genus *Bacillus* II. Alkaline Proteases. Biotechnology and Bioengineering. 12: 213 - 249.
- KEAY, L., MOSELEY, W.P., ANDERSON, R.G., O'CONNOR, R.J. ve WILDI, E.S., 1972. Production and Isolation of Microbial Proteases, WINGARD, B.L. (Ed.) Enzyme Engineering. Biotechnology and Bioengineering Symposium. New York, 3: 63 - 92.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.I., FARR, A.L. ve RANDAL, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin - Phenol Reagent. Journal of Chemistry. 193: 265 - 275.
- MANACHINI, P.L., FORTINA, G.F. ve FARINI, C. 1988. Thermostable Alkaline Protease Produced by *Bacillus thermoruber*. Applied Microbiology and Biotechnology. 28: 409 - 413.
- TAN, P.S. ve KONINGS, W.N., 1990. Purification and Characterisation of an Aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology. 56 (2): 526 - 532.
- USLAN, H., 1988. Protein İzolasyon ve Safılaştırılmasında Temel Yöntemler. TELEFONCU, A. (Ed.) Protein Yapısı ve Fonksiyonu. E.Ü. Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Lisansüstü Yaz okulu. 2: 15 - 44.
- WHITAKER, J.R., 1970. Protease of *Endothia parasitica*. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, London, 436 - 446.