

1-1-1999

## Production of $\alpha$ -Galactosidase using *Bacillus stearothermophilus* var. *caldiloactis* C953

E. Esin KOCABAŞ

Mücahit DİZBAY

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology>



Part of the [Biology Commons](#)

---

### Recommended Citation

KOCABAŞ, E. Esin and DİZBAY, Mücahit (1999) "Production of  $\alpha$ -Galactosidase using *Bacillus stearothermophilus* var. *caldiloactis* C953," *Turkish Journal of Biology*. Vol. 23: No. 1, Article 6. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol23/iss1/6>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Biology by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact [academic.publications@tubitak.gov.tr](mailto:academic.publications@tubitak.gov.tr).

## ***Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953'ten $\alpha$ -Galaktosidaz Üretimi\***

E. Esin KOCABAŞ, Mücahit DİZBAY

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 16.09.1997

**Özet:** Intraselüler, termostabil  $\alpha$ -galaktosidaz ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase) (EC 3.2.1.22). *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 suşundan üretilmiştir. Fermentasyon besiyerlerinde  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bulunmasının mikrobiyal büyümede ve enzim üretiminde önemli bir etkisi olduğu ve temel inorganik azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün kullanıldığı; farklı organik azot kaynaklarında maksimum  $\alpha$ -galaktosidaz üretiminin pepton ile sağlandığı; ve bunu sırasıyla tripton, soya fasulyesi unu, soya nötrale pepton ve casamino asidin izlediği belirlenmiştir. Farklı karbon kaynaklarında ise rafinozun en yüksek  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi verdiği bunu sırasıyla mellibiyoz, D-galaktoz ve melasın izlediği, soya unu ekstraktının kullanıldığı besiyerinde ise aktivitenin rafinozdan sonra ikinci sırada yer aldığı belirlenmiştir. Düşük ticari değeri nedeniyle, soya fasulyesi oligosakkaritleri (rafinoz benzeri şekerler)  $\alpha$ -galaktosidaz üretiminde tek çözüm olabilir.

**Anahtar Sözcükler:**  $\alpha$ -Galaktosidaz, Mikrobiyal enzim üretimi, *Bacillus stearothermophilus*.

### **Production of $\alpha$ -Galactosidase using**

#### ***Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953**

**Abstract:** An intracellular, thermostable  $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase EC 3.2.1.22.) was produced from a strain of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953. It was found that the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in the fermentation medium affected microbial growth and that optimum enzyme production occurred with peptone in various sources of nitrogen where  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was used as the main inorganic nitrogen source. After peptone, in decreasing order of enzyme productivity, came tryptone, soybean meal, soya-neutralized peptone and casamino acid. It was determined that, in various carbon sources, raffinose produced the highest  $\alpha$ -galactosidase activity, followed by melibiose, D-galactose and molasses, and that in the medium with soybean meal extract the second highest level of activity occurred. Soybean oligosaccharides (raffinose-like sugars), because of their present low commercial value, could be of practical use in the production of  $\alpha$ -galactosidase.

**Key Words:**  $\alpha$ -Galactosidase, Microbial enzyme production, *Bacillus stearothermophilus*.

---

\*Bu çalışma, Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

## Giriş

Ekzoglikosidaz olan  $\alpha$ -galaktosidaz ( $\alpha$ -D galaktosid galaktohidrolaz), (EC 3.2.1.22.) polimerden terminal parçalanamayan  $\alpha$ -galaktosidik bağların hidrolizini gerçekleştirebilir.  $\alpha$ -Galaktosidazların hidroliz reaksiyonlarının yanında transgalaktosil reaksiyonlarını da katalizleyebildiği ve *de Novo* sentezini gerçekleştirdiği bilinmektedir.  $\alpha$ -Galaktosidaz hidroliz reaksiyonlarında sadece basit oligo- ve polisakkaritleri değil, aynı zamanda terminal  $\alpha$ -D-galaktosid içeren çeşitli glikolipid ve glikoprotein gibi kompleks biyolojik moleküllerinde hidrolizini katalizler (1). Şeker pancarı endüstrisinde kullanılan  $\alpha$ -galaktosidaz, şeker pancarı ekstraktında bulunan rafinozu, sukroz ve galaktoza parçalayarak kristalize sukroz verimini artırır (1-7). Birçok fasulye ve bezelye çeşidinde bulunan rafinoz ve onun galaktoz içeren yüksek homologları insan ve evcil hayvanlarda gaz oluşumuna sebep olur;  $\alpha$ -galaktosidaz bu etkiyi azaltmada, örneğin; hayvan besiciliğinde kullanılan soya fasulyesinin iyileştirilmesinde kullanılır (4). Gaz oluşumu şikayetlerin en yaygınıdır ve abdominal rahatsızlık nedenlerinden biridir; aynı zamanda hazımsızlık, peklilik ve diyare ile de ilgilidir. Gaz oluşumunun sindirilemeyen rafinoz ve stakiyoz gibi galakto-oligosakkaritlerin mikrobiyal fermentasyonu sonucu olduğu ileri sürülmektedir, zira insan sindirim sistemi bu oligosakkaritleri parçalayacak  $\alpha$ -galaktosidaz enzimine sahip değildir.  $\alpha$ -Galaktosidazın ticari preperasyonları, ekonomik uygulanabilirliği ve etkisi nedeniyle, soya fasulyesi sütünde bulunan rafinoz ve stakiyozun parçalanmasında kullanılarak; gaz oluşturma düzeyleri azaltılmaktadır (5, 6, 8-10). Çeşitli kompleks karbohidratların oligosakkarit zincirlerindeki  $\alpha$ -galaktozidlerin yapısal analizlerinin ve biyolojik fonksiyonlarının aydınlatılmasında  $\alpha$ -galaktosidazlar büyük değere sahiptir (11).  $\alpha$ -Galaktosidaz kan nakli uygulamalarında B grubu eritrositlerdeki antijenlerin, terminal olarak parçalanamayan  $\alpha$ -D-galaktopiranozil artığını hidroliz ederek; bu eritrositleri O kan grubu eritrositlerine dönüştürebilir (6).

## Materyal ve Metot

**Mikroorganizma ve Kimyasal Maddeler:**  $\alpha$ -Galaktosidaz üretimi için, *Bacillus stearothersophilus* var. *calidolactis* C953 kullanılmıştır. Rafinoz, mellibiyoz, D-galaktoz, p-nitrofenol- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (pNPG); Sigma (St. Louis, ABD). Bovin Serum Albümin, Folin Ciocalteu Fenol Reaktif; Merc (Darmstadt Almanya) firmalarından sağlanmıştır.

**Besiyerleri ve Kültür Koşulları:** Kültürler %0.1 rafinoz içeren nutrient agarda stoklanmıştır (2, 12). İnokulum ortamı (%0.5 pepton, %0.25 yeast ekstrakt ve %0.1 glukoz) stok ortamında 55°C'de 24 saatte aktif hale getirilen mikroorganizmadan bir öze dolusu hücre ile aşılanmıştır (13). İnokulum kültürü 50°C'de 10 saat (2) 200 rpm çalkalama hızında inkübe edildikten sonra %10 (v/v) fermentasyon ortamına aşılanmıştır. Fermentasyon ortamı ise M-9 minimal ortamına (%0.6 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.3 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0.1 NH<sub>4</sub>Cl, %0.002 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, %0.02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O w/v) temel karbon kaynağı olarak %0.4 rafinoz (14), temel azot kaynağı olarak %0.5 pepton (2) içermektedir. Ortamların pH'sı 1 N HCl ve 1 N NaOH ile 7'ye ayarlanmış, sterilizasyon ise 1.1 atmosfer basınçta, 121°C'de 15 dakika tutularak sağlanmıştır. Fermentasyonlar 250 ml'lik erlenlerde 50 ml ortam içerecek şekilde 200 r.p.m. çalkalama hızında (15) 10 saat süresince 50°C'de gerçekleştirilmiştir (2).

Hücreler 6000 x g.'de 15 dakika santrifüjlenerek (Simplex G2894) ayrılmış ve 50 mM sodyum sitrat tamponu (pH 7) ile yıkanarak (16) tekrar santrifüjlenmiş ve yine aynı tamponda süspansiyon edilerek sonifikatör (Branson Sonifier Ultra Sonic Cell Distruptor) ile bir dakika boyunca 40 watt güç uygulanarak parçalanmıştır. Daha sonra 6000 x g.'de 20 dakika santrifüjlenerek hücre partikülleri uzaklaştırılmış ve tampona geçmiş olan proteinler, miktarları tayin edilinceye kadar 0°C'de saklanmıştır.

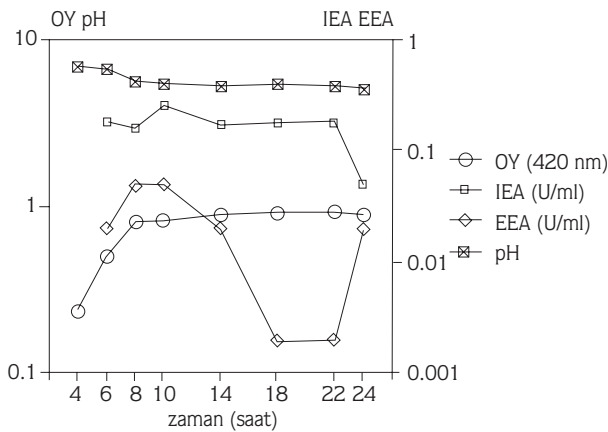
**Enzim Aktivitesinin Tayini:**  $\alpha$ -Galaktosidaz aktivitesi tayini için 250 $\mu$ l. ham enzim çözeltisi 250 $\mu$ l. 2mM pNPG çözeltisi, 500 $\mu$ l. 50 mM sodyum sitrat tamponu (pH 7), tepkime tüplerine konulmuş ve 30 dakika 70°C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3.5ml 0.2 M sodyum borat tamponu (pH 9.8) ilave edilerek 400nm.'de absorbansları okunmuştur. Bir unit  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi, yukarıdaki koşullarda 1 dakikada 1  $\mu$ mol p-nitrofenolü açığa çıkaran miktar olarak tanımlanmıştır. Spesifik aktivite ise mg proteindeki unit cinsinden  $\alpha$ -galaktosidaz miktarı olarak tanımlanmıştır (17).

**Protein Tayini:** Total protein tayini LOWRY ve arkadaşlarının modifiye edilmiş yöntemine göre belirlenmiştir. Protein standard grafiği hazırlanmasında kristal Bovin Serum Albümin kullanılmıştır (18).

## Bulgular

Fermentasyon boyunca üreme,  $\alpha$ -galaktosidaz üretimi ve pH değişimi 24 saat boyunca belli aralıklarla alınan örneklerde ölçülmüştür (Şekil 1). Az miktarda belirlenen ekstrasellüler  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi bundan sonraki fermentasyonlarda ölçülmemiştir. Bu fermentasyon ile intrasellüler  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesinin en yüksek 10. saatte olduğu belirlendiğinden bundan sonra yapılan çeşitli karbon ve azot kaynağı konsantrasyonlarının enzim üretimine etkisinin incelenmesinde 10. saat kullanılmıştır (Şekil 3, 4, 5, 6, 7).

Üretimi sağlayan enzimin sıcaklığa bağlı aktivite değişimini incelemek için enzim aktivitesi farklı sıcaklıklarda ölçülmüş ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir (Şekil 2).

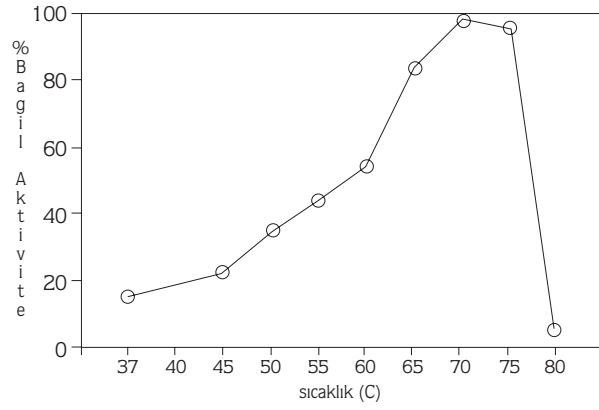


Şekil 1. OY(420 nm): *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953'in fermentasyon ortamındaki optik yoğunluğu, IEA (U/ml): Intrasellüler  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi, EEA (U/ml): Ekstrasellüler  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi, pH: Fermentasyon ortamının pH değişimi

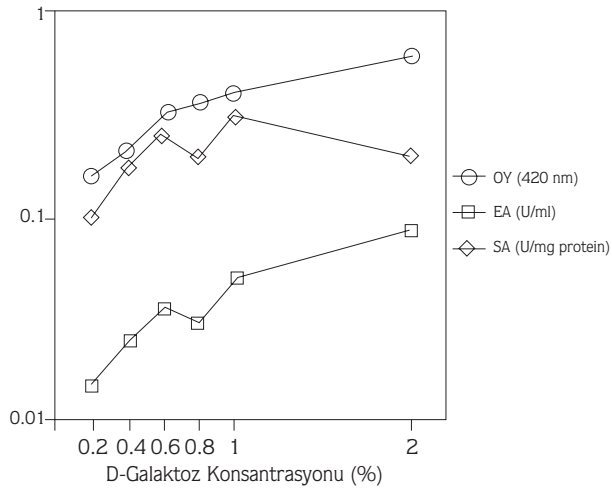
*Bacillus stearothersophilus* var. *calidolactis* C953'ten  $\alpha$ -Galaktosidaz Üretimi\*

Azot Kaynağı	Mikrobiyal Üreme (420nm)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
Pepton+NH <sub>4</sub> Cl	1.066	0.276	0.28	0.99
Tripton+NH <sub>4</sub> Cl	0.980	0.240	0.26	0.92
Soya Nötralize	0.535	0.142	0.17	0.84
Pepton+NH <sub>4</sub> Cl				
Casamino Asit+NH <sub>4</sub> Cl	0.204	0.054	0.11	0.49
Soya unu Ekstraktı+NH <sub>4</sub> Cl	0.458	0.210	0.18	1.17
Pepton	0.612	0.068	0.2	0.34

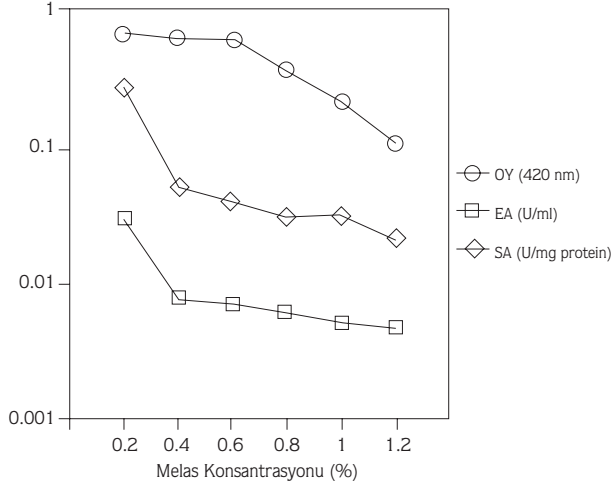
Tablo 1. Farklı azot kaynakları kullanılan fermentasyonların 10. saatindeki mikrobiyal üreme ve enzim aktivitesi (%12 Soya fasulyesi unu ekstraktı hem azot hem karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Diğer ortamlar M-9 minimal ortam, %0.4 rafinoz ve %0.5 azot kaynağı içermektedir).



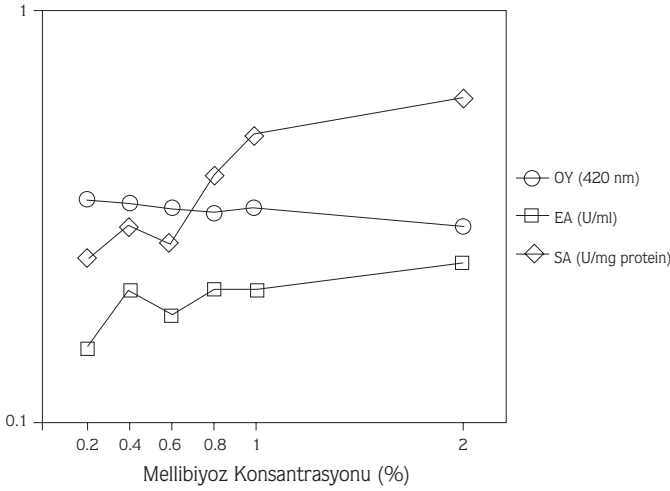
Şekil 2.  $\alpha$ -Galaktosidaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.



Şekil 3. OY(420 nm): Optik yoğunluk, EA (U/ml):  $\alpha$ -Galaktosidaz aktivitesi, SA (U/mg protein): Spesifik aktivite. Fermentasyon ortamları M-9 minimal ortam, pepton ve değişen konsantrasyonlarda D-galaktoz içermektedir.



Şekil 4. OY (420 nm): Optik yoğunluk, EA (U/ml):  $\alpha$ -Galaktosidaz aktivitesi, SA (U/mg protein): Spesifik aktivite. Fermentasyon ortamları M-9 minimal ortam, pepton ve değişen konsantrasyonlarda melas içermektedir.

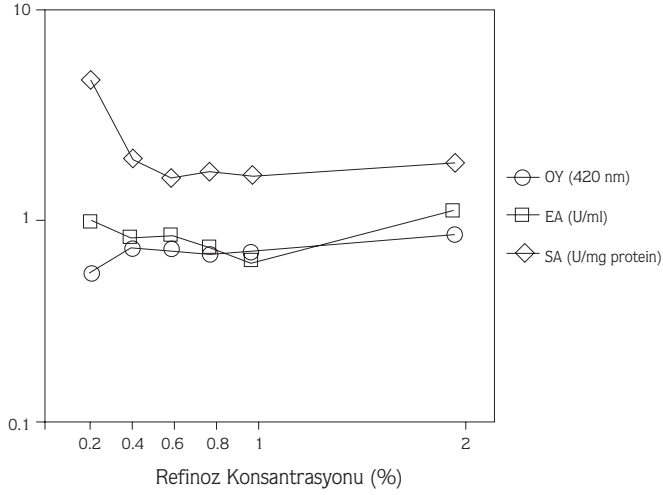


Şekil 5. OY (420 nm): Optik yoğunluk, EA (U/ml):  $\alpha$ -Galaktosidaz aktivitesi, SA (U/mg protein): Spesifik aktivite. Fermentasyon ortamları M-9 minimal ortam, pepton ve değişen konsantrasyonlarda mellibiyoz içermektedir.

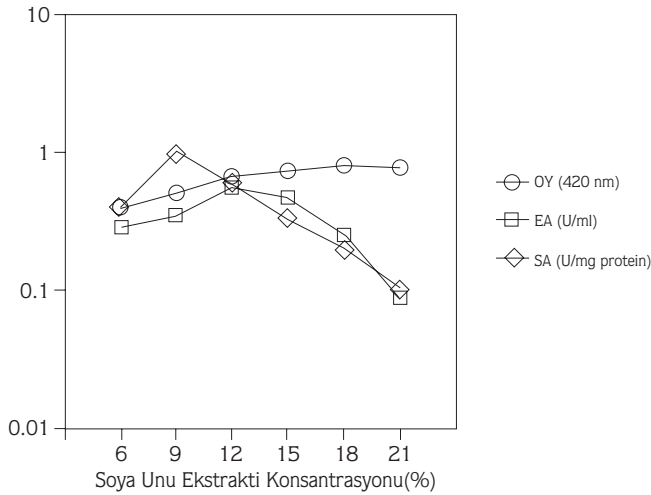
## Tartışma

$\alpha$ -Galaktosidaz üretiminin fermentasyon boyunca değişimi incelenmiş ve en yüksek intra- ve ekstrasellüler  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesinin organizmanın durgunluk fazına geçmeye başladığı fermentasyonun 10. saatinde gerçekleştiği ve ekstrasellüler  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesinin intrasellüler aktiviteye oranla oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Enzimatik tayin işlemi farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilerek  $\alpha$ -galaktosidazın pNPG üzerinde optimum sıcaklığının 70°C olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Bu konudaki bir diğer çalışmada *Bacillus stearothermophilus* AT-7 ile  $\alpha$ -galaktosidaz üretimi yapılmış ve izozimlerine farklı sıcaklıkların

*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953'ten  $\alpha$ -Galaktosidaz Üretimi\*



Şekil 6. OY (420 nm): Optik yoğunluk, EA (U/ml):  $\alpha$ -Galaktosidaz aktivitesi, SA (U/mg protein): Spesifik aktivite. Fermentasyon ortamları M-9 minimal ortam, pepton ve değişen konsantrasyonlarda rafinoz içermektedir.



Şekil 7. OY (420): Optik yoğunluk, EA (U/ml):  $\alpha$ -Galaktosidaz aktivitesi, SA (U/mg protein): Spesifik aktivite. Fermentasyon ortamları %6, 9, 12, 15, 18 ve 21 v/v oranlarında %20'lik soya unu ekstrakti, M-9 minimal ortamı ve %0.5 Yeast ekstrakt içermektedir.

etkisi incelenerek  $\alpha$ -galaktosidaz I için 73°C ve  $\alpha$ -galaktosidaz II için 69°C olduğu bulunmuştur (16).

Karbon kaynağı olarak D-galaktozun çeşitli konsantrasyonlarının kullanıldığı fermentasyonlarda, en yüksek  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi %2 oranında D-galaktoz ile, en yüksek spesifik aktivite ise %1 oranında D-galaktoz ile sağlanmıştır (Şekil 3). Karbon kaynağı olarak ön işlemden geçirilmiş melas konsantrasyonlarının (19) kullanıldığı fermentasyonlarda, artan melas konsantrasyonunun mikrobiyal üremeyi olumsuz etkilediği; bu sebepten melasın düşük konsantrasyonlarında az miktarda  $\alpha$ -galaktosidaz üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4). Karbon kaynağı olarak mellibiyozun çeşitli konsantrasyonlarının kullanıldığı

fermentasyonlarda ise en yüksek  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi ve spesifik aktivite %2 mellibiyoz konsantrasyonu ile sağlanmıştır (Şekil 5). *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -galaktosidazı üzerinde yapılan bir diğer çalışmada gliserol, glukoz, sukroz ve mellibiyoz ile yapılan fermentasyonlar sonucu en yüksek üretimin mellibiyoz ile sağlandığı belirtilmiştir (2). Mikrobiyal büyümenin artan mellibiyoz konsantrasyonu ile azalması buna karşılık  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesinin az da olsa artmaya devam etmesi, spesifik aktivitenin artmasına neden olmuştur. Karbon kaynağı olarak rafinozun çeşitli konsantrasyonlarının kullanıldığı fermentasyonlarda ise en yüksek  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi %2 rafinoz konsantrasyonu ile en yüksek spesifik aktivite de %0.2 rafinoz konsantrasyonunda sağlanmıştır. %0.2 rafinoz içeren besiyeri en az mikrobiyal üreme sağlamasına rağmen, enzim üretimi açısından en çok mikrobiyal üremenin gerçekleştiği %2 rafinoz içeren besiyerine yakın enzim üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 6). Bu da %0.2 rafinoz içeren besiyerindeki fermentasyonlarda hücre başına enzim biyosentezinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Yapılan fermentasyonlarda bu iki  $\alpha$ -galaktosidin (mellibiyoz ve rafinoz) kullanılması enzim üretimindeki etkilerini kıyaslayabilme imkanı vermiştir. Şekil 5 ve 6'dan da görüldüğü gibi rafinoz ile daha fazla indüksiyon meydana gelmiş ve daha fazla enzim üretimi gerçekleşmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak soya unundan hazırlanmış ekstrakt (20) konsantrasyonlarını içeren fermentasyonlarda en yüksek  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesi %12 v/v ekstrakt içeren ortamlarda, en yüksek spesifik aktivite değerleri ise %9 v/v ekstrakt içeren ortamlarda sağlanmıştır. %18 oranına kadar mikrobiyal üremenin hızla arttığı bundan sonraki %21'de bir düşüş meydana geldiği ancak  $\alpha$ -galaktosidaz aktivitesinin %12'ye kadar arttığı bundan sonraki konsantrasyonlarda ise düşüşe geçtiği belirlenmiştir (Şekil 7).

Organik ve inorganik azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde; soya fasulyesinin *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -galaktosidazı için etkili bir substrat olduğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca az olan mikrobiyal üremeye karşılık iyi bir  $\alpha$ -galaktosidaz üretiminin olması, yani hücre başına daha fazla  $\alpha$ -galaktosidaz eldesi enzimin spesifik aktivite değerini yükseltmektedir. Benzer etki soya fasulyesinden elde edilen soya nötrale peptonda da gözlenmiştir (Tablo 1). İnorganik azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün mikrobiyal üremeye ve enzim üretimine etkisi de açıkça görülmektedir (Tablo 1).

Sonuç olarak çeşitli organik azot ve karbon kaynakları ile yüksek  $\alpha$ -galaktosidaz üretimi gerçekleştirilebilir. Ancak ucuz substratın oldukça önemli olduğu endüstriyel proseslerde soya fasulyesi kullanılarak ve termostabil bir organizma olan *Bacillus stearothermophilus* ile ucuz ve termostabil  $\alpha$ -galaktosidaz üretimi mümkündür.

## Kaynaklar

1. Zaprometova, O.M. and Ulezlo, I.V. Isolation and Purification of a mold  $\alpha$ -Galactosidase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10: 232-241, 1981.
2. Delente, J., Johnson, J.H., Kuo, M.J., O'Connor, R.J. Production of a New Thermostable Neutral  $\alpha$ -Galactosidase from a strain of *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* 16: 1227-1243, 1974.
3. Mitsutomi, M. and Ohtakara, A. A Simplified Procedure for Purification and Crystallization of Thermostable  $\alpha$ -Galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.*, 48(12): 3153-3155, 1984.



*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953'ten  $\alpha$ -Galaktosidaz Üretimi\*

4. Frost, G.M. and Moss, D.A. Biotechnology In H.J. Rhem and G. Reed (eds) vol.7a, Weinheim, 1983, Verlag Chemie, p.65-211, 1987.
5. Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Kitahata, S. Purification and Some Properties of  $\alpha$ -Galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(3): 372-373, 1993.
6. Cavazzoni, V., Adami, A. and Craveri, R.  $\alpha$ -Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 555-559, 1987.
7. Mitsutomi, M., Uchida, Y., Ohtakara, A. Immobilization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme. *J. Ferment. Technol.*, 63(4): 325-329, 1985.
8. Thananunkul, D., Tanaka, M., Chichester, C.O., Lee, T-C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *J. Food. Sci.*, 41: 173-175, 1985.
9. Mitsutomi, M. and Ohtakara, A. Isolation and identification of oligosaccharides produced from raffinose by transgalactosylation reaction of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.*, 52(9): 231105-23111, 1988.
10. Mathew, C.D. and Balasubramaniam, K. Mechanism of action of  $\alpha$ -Galactosidase. *Indian Journal of Biochem. Biophysics.*, 24: 29-32, 1987.
11. Itoh, T., Uda, Y. and Nakagawa, H. Purification and characterization of  $\alpha$ -Galactosidase from Watermelon. *J. Biochem.* 99: 243-250, 1986.
12. Slepecky, R.A. and Hemphill, H.E. *The Procaryotes*, A.Balows et al. (eds), vol.III, New York, 1992, Springer Verlag, p.1663-1689.
13. Srivastava, R.A.K. Purification and Chemical Characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme. Microb. Technol.*, 9: 749-754, 1987.
14. Nadkarni, M.A., Nair, C.K.K., Fandey, V.N., Pradham, D.S. Characterization of Alfa-Galactosidase from *Corynebacterium murisepticum* and Mechanism of its Induction. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38: 23-24, 1992.
15. Fogarty, W.M., Brosnan, M.P., Doyle, E.M., Kelly, C.T. The carbohydrases of *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11412 and NCIB 10814. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 191-196, 1992.
16. Pederson, D.M. and Goodman, R.E.. Isozymes of  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Can. J. Microbiol.*, 26: 978-984, 1980.
17. Itoh, T. and UDA, Y.  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase from Squid Liver: Purification and Characterization of two Enzymes. *J. Biochem.* 95: 959-970, 1984.
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 2655-2755, 1951.
19. Karaboz, I. Batık kültür yöntemi ile melastan THP üretiminde *Morchella conica* var. *costaca* miselyumunun kullanılması. Doktaro tezi, E.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. Bornova, İzmir, 1986.
20. Çetin, E.T., Büğet, N. ve Ötük, G. Soya fasulyesi ve soya küspesinden hazırlanan besiyerleri. *KÜKEM Dergisi, Cilt. 2, Sayı.1, s.56-59, 1979.*