

**LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS ZN541 VE  
STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS Z1052 SUŞLARINDA BETA  
GALAKTOZİDAZ AKTİVİTESİ VE OPTİMİZASYON**

**Hazer Yüksekdağ<sup>1\*</sup>, Zehranur Yüksekdağ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gölbaşı Kampusu, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD, Teknikokullar, Ankara, Türkiye

Geliş / Received: 30.03.2021; Kabul / Accepted: 06.09.2021; Online baskı / Published online: 14.10.2021

Yüksekdağ, H., Yüksekdağ, Z. (2021). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *Streptococcus thermophilus* Z1052 suşlarında beta galaktozidaz aktivitesi ve optimizasyon. *GIDA* (2021) 46 (6) 1331-1342 doi: 10.15237/gida.GD21059.

Yüksekdağ, H., Yüksekdağ, Z. (2021). Beta galactosidase activity in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 and *Streptococcus thermophilus* Z1052 strains and optimization. *GIDA* (2021) 46 (6) 1331-1342 doi: 10.15237/gida.GD21059.

**ÖZ**

Çalışmada, 31 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve 34 *Streptococcus thermophilus* bakterisi kültürlerinde, o-nitrofenil-beta-D-galaktosit (o-NPG) substrat olarak kullanılarak, β-galaktosidaz enzim ve spesifik aktiviteleri taranmıştır. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları 0.186-6.500 U/mg arasında spesifik aktivite gösterirken, *S. thermophilus* suşları 0.172-5.064 U/mg arasında spesifik aktivite göstermiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 (6.500 U/mg) ve *S. thermophilus* Z1052 (5.064 U/mg) suşlarının yüksek spesifik aktivite yeteneğine sahip oldukları tespit edilmiştir. Yüksek spesifik β-galaktozidaz aktivitesi gösteren ZN541 ve Z1052 suşları seçilerek, farklı koşulların (pH, sıcaklık, laktoz konsantrasyonu ve fermantasyon süresi) bu suşlara ait β-galaktozidaz enzimlerin aktivitelerine etkileri belirlenmiştir. ZN541 suşunda optimum enzim aktivitesi için gereken pH'nın 6.2, sıcaklığın 42°C, laktoz konsantrasyonunun %2 ve fermantasyon süresinin 24 saat olduğu tespit edilmiştir. Z1052 suşunda ise optimum enzim aktivitesi için gereken pH'nın 6.8, sıcaklığın 42°C, laktoz konsantrasyonunun %4 ve fermantasyon süresinin 24 saat olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, β-galaktosidaz, optimizasyon

**BETA GALACTOSIDASE ACTIVITY IN *LACTOBACILLUS DELBRUECKII*  
SUBSP. *BULGARICUS* ZN541 AND *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* Z1052  
STRAINS AND OPTIMIZATION**

**ABSTRACT**

In this study, thirty-one *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and thirty-four *Streptococcus thermophilus* were screened for β-galactosidase enzyme activities and specific activities. The β-galactosidase enzyme activities were determined by using o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (o-NPG) as a substrate. *L. delbrueckii* *bulgaricus* strains showed specific activity between 0.186-6.500 U/mg, while *S. thermophilus* strains exhibited specific activity between 0.172-5.064 U/mg. The highest specific enzyme activities among bacteria cultures were determined at *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 (6.500

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: hazer@gazi.edu.tr, zehranur@gazi.edu.tr

☎: (+90) 312 484 5635

☎: (+90) 312 484 3649

Hazer Yüksekdağ; ORCID no: 0000-0001-7953-2920

Zehranur Yüksekdağ; ORCID no: 0000-0002-0381-5876

U/mg) and *S. thermophilus* Z1052 (5.064 U/mg) strains. The ZN541 and Z1052 strains that showed high specific  $\beta$ -galactosidase activity were selected and the effects of different conditions (pH, temperature, lactose concentration, and fermentation time) on the activities of  $\beta$ -galactosidase enzymes of these strains were determined. It was determined that the pH required for optimum enzyme activity in ZN541 strain was 6.2, the temperature was 42°C, the lactose concentration was 2% and the fermentation time was 24 hours. In the Z1052 strain, the pH required for optimum enzyme activity was 6.8, the temperature was 42°C, the lactose concentration was 4%, and the fermentation time was 24 hours.

**Keywords:** *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*,  $\beta$ -galactosidase, optimization.

## GİRİŞ

Yaygın olarak laktaz olarak bilinen  $\beta$ -galaktosidazlar ( $\beta$ -D-galaktosid galaktohidrolazlar, EC 3.2.1.23), laktozun galaktoz ve glikoz monomerlerine hidrolizini katalize eden glikozit hidrolazlardır ve gıda endüstrisindeki çeşitli biyoteknolojik süreçler için önemli bir enzimdir. Süt ve peynir altı suyunda laktoz hidrolizi için yaygın olarak kullanıldığından ticari açıdan önemlidir (Carević vd., 2015; Delgado-Fernandez vd., 2020). Hidrolitik aktivitelere ek olarak,  $\beta$ -galaktosidazlar, laktozdan galakto-oligosakkaritler (GOS) oluşturmak için transgalaktozilasyon aktivitesine sahiptirler. Ayrıca, laktoz intoleransı olan bireyler için düşük laktozlu ve laktozsuz süt ürünlerinin geliştirilmesi, laktoz içeren gıdaların teknolojik ve duyuşal özelliklerinin iyileştirilmesi ve peynir üretim proseslerindeki peynir altı suyu yan ürünlerindeki laktoz seviyelerini azaltmak gibi uygulamaları mevcuttur (Kittibunchakul vd., 2020; Deng vd., 2020).

$\beta$ -galaktosidaz enzimi kaynakları arasında bitkiler, hayvanlar ve maya, küf ve bakteri gibi mikroorganizmalar yer almaktadır (Deng vd., 2020). Biyoteknolojik uygulamalarda enzim kaynağı olarak *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis* ve *K. fragilis* yaygın olarak kullanılmaktadır (Inchaurredo vd., 1998). Yüksek aktiviteyi nedeniyle *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. infantis* ve *B. longum*) (Venkateswarulu vd., 2017) ve laktik asit bakterileri (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* vb.) bakterileri de kullanılmaktadır (Gobinath ve Prapulla, 2015; Kim ve Rajagopal, 2000; Yu vd., 2020). Süt endüstrisi uygulamalarında, fermentasyon kolaylığı, yüksek enzim aktiviteyi ve iyi stabilite olmaları nedeniyle bakteriler ve

özellikle laktik asit bakterileri daha çok tercih edilmektedir (İbrahim, 2018).

Bu çalışmada yoğurt kaynaklı 31 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve 34 *Streptococcus thermophilus* suşlarının öncelikle  $\beta$ -galaktosidaz aktivitelerinin taranması amaçlanmıştır. Daha sonra yüksek spesifik  $\beta$ -galaktosidaz aktiviteye sahip *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052 suşları seçilerek, bu suşlardan elde edilen  $\beta$ -galaktosidaz enzimine farklı koşulların (pH, sıcaklık, laktoz konsantrasyonu ve fermentasyon süresi) etkisinin belirlenerek enzim aktivitesinin yüksek olduğu optimum koşullar tespit edilmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada geleneksel yoğurt kaynaklı 31 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve 34 *S. thermophilus* bakteri kültürlerine ait toplam 65 suş, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının geliştirilmesinde MRS besiyeri, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde ise MRS içeriğinde bulunan glikoz yerine %2 oranında laktozun ilave edildiği Lac-MRS besiyeri kullanılmıştır. *S. thermophilus* suşlarının geliştirilmesinde Elliker besiyeri, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde ise Elliker içeriğinde bulunan dekstroz yerine %2 oranında laktozun ilavesi edildiği Lac-EL besiyeri kullanılmıştır.

### Enzim Aktivitesi

Bakteriler uygun besiyortamlarında iki kez aktifleştirildikten sonra 5000 rpm'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilerek Mc Farland 6 bulanıklığına ayarlanan kültürlerden elde edilen

pellet 0.03 M potasyum fosfat tamponuyla (pH 6.8) yıkanmıştır. 1 mL tamponda çözülen bakterilerin hücre duvarı ultrasonikasyon (50 MHz, Vibra-Cell, Sonics&Materials Inc. Danbury, CT marka) ile parçalanmıştır. 1000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüjlenen örneklerden hücre atıkları uzaklaştırılmış ve süpernatant ham enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır (Zhang vd., 2012).

Bradford Reagent Kit (Amresco) kullanılarak kültürlerin protein miktarları belirlenmiştir. Standart olarak 0.0025-0.05 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda Bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

$\beta$ -galaktozidaz aktivitesi soğuk şartlarda o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozit (o-NPG, Sigma) substrat olarak kullanılarak tespit edilmiştir. 1 mL enzim ekstraktına 0.2 mL 15 mM o-NPG içeren 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) eklenmiş ve 37°C'da 15 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 1 M 0.5 mL sodyum karbonat (Merck) solüsyonu ilave edilerek 1000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüjden sonra spektrofotometre cihazı ile (Hitachi UV-1800) 420 nm dalga boyunda absorbanans değeri okunmuştur. Kör olarak, ham ekstrakt yerine 1 mL 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) kullanılmıştır. 1 ünite  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi dakikada 1  $\mu$ mol o-nitrofenolü serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Spesifik aktivite, bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı olarak kabul edilmiştir.  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Shah ve Otieno, 2007).

$$\text{Enzim aktivitesi (U/mL)} = \frac{OD_{420}}{k} \times \frac{1}{t} \times [V_t/V_e] \times D$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg)} = \left[ \frac{\text{Enzim aktivitesi (U/mL)}}{\text{Protein miktar (mg/mL)}} \right]$$

V<sub>t</sub> = Tüpte hazırlanan toplam reaksiyon hacmi  
V<sub>e</sub> = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmi  
k = Standart eğrinin eğimi  
t = Reaksiyon zamanı  
D = Dilüsyon faktörü

### Optimizasyon

Enzim aktivitesi tespit edilen 65 suş arasında yüksek spesifik  $\beta$ -galaktozidaz aktivite gösteren *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052 suşları, farklı koşulların (pH, sıcaklık, laktoz konsantrasyonu ve fermantasyon süresi) enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla seçilmiştir.

ZN541 ve Z1052 suşlarından elde edilen enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 suşunda, pH'sı 5.0, 6.2, 7.0 ve 8.0 değerlerine ayarlanan 0.03 M potasyum fosfat tamponu kullanılmış ve reaksiyon 42°C'de gerçekleştirilirken, *S. thermophilus* Z1052 suşunda tamponun pH'sı 5.5, 6.8, 7.5 ve 8.5 değerlerine ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Kara, 2004). Suşlarından elde edilen enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için, 1 mL hücre süspansiyonuna 15 mM 0.2 mL o-NPG eklenmiş ve her iki örnekte de reaksiyon 30°C, 37°C, 42°C ve 50°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir (Ismail vd., 2010). Laktoz (substrat) konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisini belirlemek için, ZN541 suşunda Lac-MRS besiyerine, %2, %4, %6 ve %8 oranlarında laktoz (Merck), Z1052 suşunda ise Lac-EL besiyerine %2, %4, %6 ve %8 oranlarında laktoz (Merck) kullanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir (Hsu vd., 2005). Fermantasyon süresinin enzim aktivitesine etkisini belirlemek için ZN541 ve Z1052 suşlarından, 18, 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra elde edilen enzimlerin aktiviteleri yukarıda verilen enzim aktivitesi yöntemine göre belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri relatif aktivite olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Relatif aktivite (%) = İncelenen parametredeki enzim aktivitesi/Optimum koşullardaki enzim aktivitesi x100

### İstatistiksel Analiz

Tüm çalışmalar 3 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve çalışmaların ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS (IBM SPSS Statistics Data Editor, version 22) kullanılmıştır. Suşların enzim ve spesifik

aktiviteleri arasında korelasyon olup olmadığı araştırılmasında Parametrik testlerden Pearson korelasyonu kullanılmıştır.

### SONUÇ ve TARTIŞMA

$\beta$ -Galaktosidaz, gıda endüstrisinde; sütün sindirilebilirliğini iyileştirmede, süt ürünlerinin tatlılığını, çözünürlüğünü ve lezzetini geliştirmede ve dondurulmuş konsantre tatlılarda laktoz kristalizasyonunun önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Süt endüstrisinden sonra elde edilen hidrolize süt, laktoz intoleransı olan kişiler için yoğurt, peynir ve dondurma (konsantre tatlılar) yapımında da kullanılabilir (Xin vd., 2019).  $\beta$ -Galaktosidaz, gıda endüstrisi dışında, ilaç endüstrisinde laktozdan kaynaklanan problemlerin hafifletilmesinde ve prebiyotik özellikleriyle bilinen galaktooligosakkaritlerin sentezi gibi birçok uygulamaları olan önemli ticari enzimlerden biridir (Gomaa, 2018). Ticari olarak çok farklı kullanım potansiyeline sahip  $\beta$ -Galaktosidaz enziminin en önemli kaynakları probiyotik özelliklerinden dolayı laktik asit bakterileridir. Bu nedenden dolayı, bu çalışmada yüksek enzim aktivitesine sahip güvenilir ve yeni laktik asit bakterileri (LAB)'nin araştırılması amaçlanmıştır.

LAB'nde,  $\beta$ -Galaktosidaz enzimi intrasellüler bir enzim olduğundan (Carević vd., 2015; Son vd., 2017; Deng vd., 2020; Özkan vd., 2021; Mahadevaiah vd., 2020), çalışmamızda enzim ekstraksiyonunda bakterilerin hücre duvarını parçalamak için mekanik yöntemlerden yaygın olarak kullanılan (Carević vd., 2015) ultrasonikasyon kullanılmıştır. 31 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve 34 *S. thermophilus* bakteri kültürlerine ait toplam 65 suşun  $\beta$ -galaktozidaz enziminin intrasellüler olduğunu desteklemek amacıyla kültür süpernatantlarında da enzim aktivitesine bakılmış ve sonikasyon uygulanmayan kültür süpernatantında aktiviteye rastlanılmamıştır. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları, 0.011 U/mL (ZN142)-0.247 U/mL (ZN541) arasındaki değişen değerlerde  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi, 0.186 U/mg (ZN142)-6.500 U/mg (ZN541) arasında  $\beta$ -galaktozidaz spesifik aktivite göstermişlerdir. *S. thermophilus* suşları, 0.007 U/mL (Z14)-0.238 U/mL (Z1052) arasındaki değişen değerlerde  $\beta$ -galaktozidaz

aktivitesi, 0.172 U/mg (Z1152)-5.064 U/mg (Z1052) arasında  $\beta$ -galaktozidaz spesifik aktivite göstermişlerdir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları arasında, ZN541 (0.247 U/mL), ZN661 (0.149 U/mL) ve ZN641 (0.121 U/mL) suşları yüksek enzim aktivitesi gösterirken, *S. thermophilus* suşları arasında, Z1052 (0.238 U/mL), Z752 (0.221 U/mL) ve ZN641 (0.217 U/mL) suşları yüksek enzim aktivitesi göstermiştir (Çizelge 1). Bakterilerin spesifik aktiviteleri değerlendirildiğinde, her iki türde de suşlar arasında aktivitede önemli farklılıklar gözlemlenmiş ancak *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının daha yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Yüksek enzim aktivitesine sahip suşların yüksek spesifik aktiviteye sahip olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının enzim ve spesifik enzim aktivitesi arasında 0.01 düzeyinde bir korelasyon tespit edilirken ve *S. thermophilus* suşlarının enzim ve spesifik enzim aktivitesi arasındaki anlamlılık düzeyi ise 0.05 olarak belirlenmiştir. Carević vd., (2015) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 suşunda 0.011 IU/mL enzim aktivitesi olduğunu; Deng vd., (2020) ise *S. thermophilus* ST61 suşunda 78.85 U/mg spesifik aktivitenin olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların, diğer araştırmacıların sonuçlarından düşük olmasının nedeni, bakterilerin izolasyon kaynağı, karbon kaynağı, kullanılan enzim ekstraksiyon metodlarının farklılığı (sıcaklık, pH, tampon, ekstraksiyon yöntemi, enzim ve substrat konsantrasyonu) ve aktivite hesaplanma yöntemlerindeki farklılıklar olabilir.

Geniş bir kullanım potansiyeline sahip  $\beta$ -galaktozidaz enziminin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi için yüksek enzim aktivitesinin yanında enzimin aktivite gösterdiği en uygun koşullarının da belirlenmesi gerekmektedir (İsmail vd., 2010; Kılıç vd., 2014; Carević vd., 2015; Deng vd., 2020). Bu amaçla çalışmamızda spesifik  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi belirlenen suşlar arasından yüksek spesifik aktiviteye sahip iki suş seçilmiş (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052) ve farklı pH, sıcaklık, laktoz konsantrasyonları ve fermantasyon sürelerinde enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Çizelge 1. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının β-galaktozidaz enzim ve spesifik aktiviteleri

Table 1. The β-galactosidase enzyme and specific activity in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*

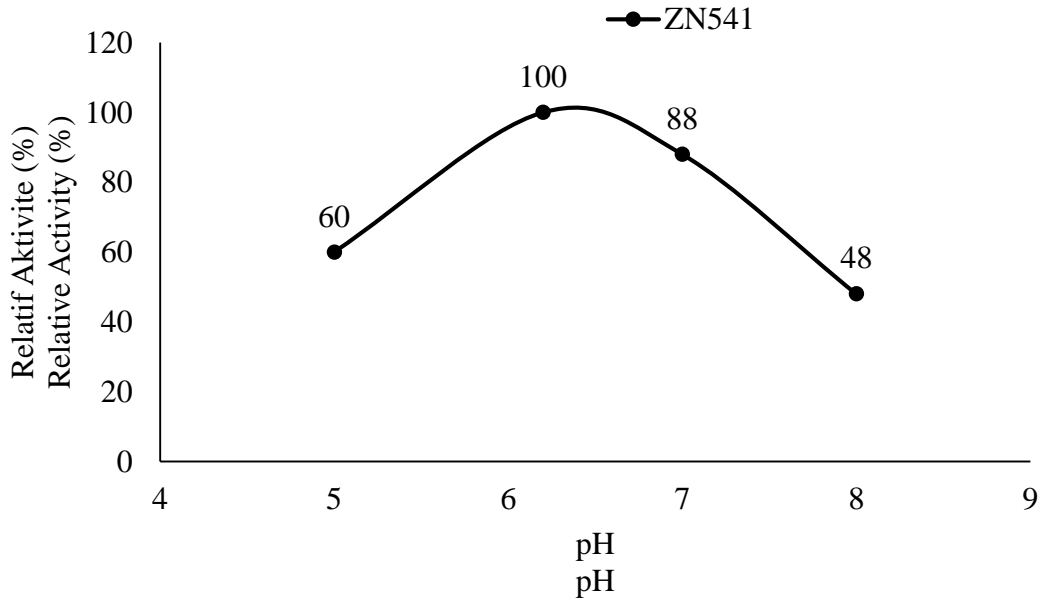
Bakteriler <i>Bacteria</i>	Protein Miktarı (mg/mL) <i>Protein content</i> (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL) <i>Enzyme</i> <i>activity</i> (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg) <i>Specific activity</i> (U/mg)	Bakteriler <i>Bacteria</i>	Protein Miktarı (mg/mL) <i>Protein content</i> (mg/mL)	Enzim Aktivitesi (U/mL) <i>Enzyme</i> <i>activity</i> (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg) <i>Specific activity</i> (U/mg)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (n=31)*				<i>S. thermophilus</i> (n= 34)**			
ZN171	0.023±0.002	0.020±0.001	1.150±0.002	Z15	0.024±0.001	0.032±0.000	0.750±0.001
ZN19	0.019±0.003	0.059±0.001	0.322±0.002	Z14	0.007±0.000	0.009±0.000	0.778±0.000
ZN141	0.017±0.001	0.029±0.003	0.586±0.002	Z151	0.217±0.000	0.096±0.000	2.260±0.000
ZN172	0.042±0.000	0.025±0.000	1.680±0.000	Z18	0.009±0.000	0.025±0.000	0.360±0.000
ZN18	0.036±0.003	0.059±0.002	0.610±0.003	Z173	0.063±0.002	0.074±0.002	0.851±0.002
ZN142	0.011±0.000	0.059±0.001	0.186±0.001	Z171	0.034±0.000	0.059±0.001	0.576±0.001
ZN252	0.033±0.000	0.024±0.002	1.375±0.001	Z272	0.088±0.000	0.074±0.000	1.189±0.000
ZN272	0.021±0.000	0.041±0.000	0.512±0.000	Z261	0.014±0.000	0.041±0.000	0.341±0.000
ZN251	0.048±0.000	0.068±0.000	0.706±0.000	Z271	0.018±0.000	0.041±0.000	0.439±0.000
ZN281	0.054±0.000	0.041±0.000	1.317±0.000	Z372	0.112±0.000	0.089±0.000	1.317±0.000
ZN362	0.030±0.003	0.034±0.003	0.883±0.003	Z361	0.030±0.003	0.034±0.000	1.258±0.002
ZN382	0.029±0.000	0.054±0.001	0.537±0.001	Z351	0.092±0.000	0.045±0.000	2.044±0.000
ZN341	0.039±0.004	0.043±0.002	0.907±0.003	Z472	0.096±0.000	0.067±0.002	1.433±0.001
ZN342	0.018±0.000	0.032±0.000	0.563±0.000	Z482	0.104±0.000	0.082±0.000	1.268±0.000
ZN361	0.015±0.000	0.026±0.003	0.577±0.002	Z662	0.052±0.000	0.062±0.000	1.339±0.000
ZN461	0.095±0.000	0.041±0.001	2.302±0.001	Z651	0.083±0.000	0.062±0.000	0.839±0.000
ZN442	0.082±0.000	0.062±0.003	1.323±0.002	Z672	0.105±0.000	0.091±0.000	1.150±0.000
ZN471	0.021±0.005	0.031±0.002	0.677±0.003	Z682	0.069±0.000	0.080±0.000	0.862±0.000
ZN552	0.015±0.001	0.027±0.000	0.556±0.001	Z752	0.221±0.000	0.071±0.000	3.113±0.000
ZN572	0.061±0.000	0.042±0.000	1.452±0.000	Z743	0.052±0.000	0.073±0.000	0.712±0.000
ZN551	0.018±0.001	0.026±0.001	0.692±0.001	Z861	0.014±0.000	0.034±0.000	0.412±0.000
ZN543	0.021±0.004	0.043±0.000	0.553±0.002	Z862	0.088±0.001	0.080±0.001	1.100±0.001
ZN541	0.247±0.000	0.038±0.001	6.500±0.000	Z1062	0.009±0.001	0.043±0.001	0.209±0.001
ZN662	0.022±0.001	0.059±0.001	0.373±0.001	Z1083	0.120±0.000	0.098±0.000	1.224±0.000
ZN661	0.149±0.000	0.071±0.001	2.099±0.001	Z1061	0.098±0.001	0.095±0.001	1.032±0.001
ZN652	0.073±0.000	0.058±0.001	1.259±0.001	Z1081	0.049±0.000	0.091±0.000	0.538±0.000
ZN641	0.121±0.000	0.043±0.004	2.814±0.002	Z1051	0.039±0.000	0.081±0.001	0.481±0.001
ZN672	0.096±0.000	0.034±0.001	2.823±0.001	Z1052	0.238±0.000	0.047±0.000	5.064±0.000
ZN82	0.061±0.001	0.038±0.001	1.605±0.001	Z1161	0.072±0.000	0.056±0.001	1.288±0.001
ZN942	0.097±0.000	0.067±0.002	1.448±0.001	Z1152	0.010±0.001	0.058±0.001	0.172±0.001
ZN951	0.124±0.000	0.071±0.000	1.746±0.001	Z1171	0.107±0.000	0.067±0.000	1.597±0.000
				Z1151	0.054±0.000	0.081±0.000	0.667±0.000
				Z1153	0.084±0.000	0.081±0.000	1.037±0.000
				Z1162	0.100±0.000	0.064±0.000	1.563±0.000

\* P<0.01 düzeyinde anlamlı (Korelasyon)

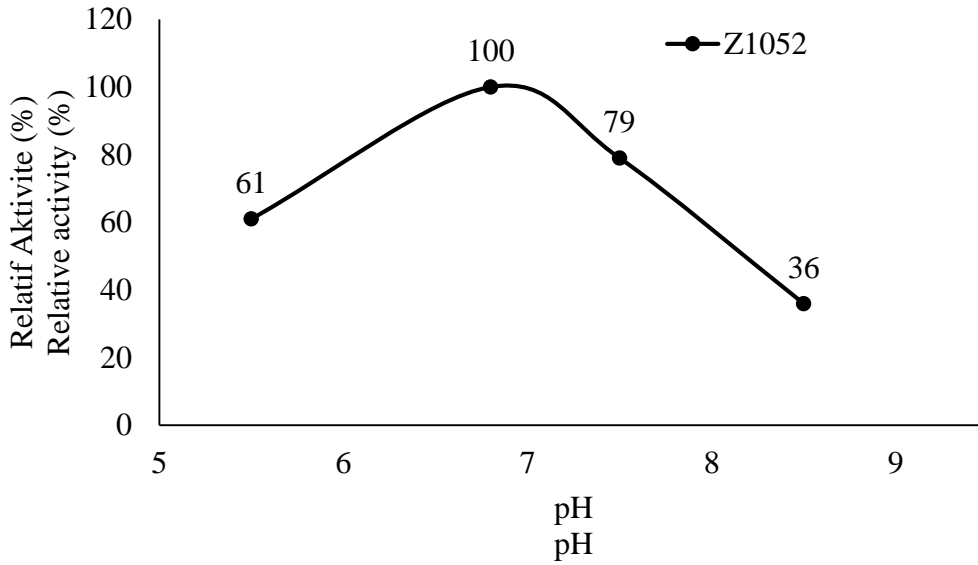
\*\* P<0.05 düzeyinde anlamlı (Korelasyon)

$\beta$ -Galaktosidazların optimum çalışma pH'ları, kaynaklarına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilmektedir. Genel olarak, pH profillerine göre asidik  $\beta$ -galaktosidazlar (mantarlarda) ve nötr  $\beta$ -galaktosidazlar (bakterilerde ve mayalarda) olarak iki gruba ayrılabilirler (Panesar ve ark., 2010). pH, enzimle katalize edilen bir reaksiyonun hızını etkilediği için, bir enzimin aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki etkisini bilmek gerekmektedir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 suşunda, farklı pH'lardaki (pH 5.0, 6.2, 7.0, 8.0) enzim aktivitesinin sırasıyla, 0.148 U/mL (relatif aktivite: %60), 0.247 U/mL (5100), 0.218 U/mL (%88) ve 0.119 (%48) U/mL olduğu belirlenmiştir. ZN541 suşundan elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.2 olarak bulunmuştur (Şekil 1). *S. thermophilus* Z1052 suşunda, pH 5.5, 6.8, 7.5 ve 8.5'de  $\beta$ -galaktozidaz enzim aktivitesi sırasıyla, 0.145 U/mL (relatif aktivite: %61), 0.238

U/mL (%100), 0.189 U/mL (%79) ve 0.086 U/mL (%36) olarak tespit edilmiştir. Z1052 suşundan elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.8 olarak bulunmuştur (Şekil 2). Optimum pH değerinden asidik ve alkali ortamlarda relatif aktivitede düşüş gözlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde, enzimin en aktif olduğu pH değerinin, *L. acidophilus* için 6.8 (Carević vd., 2015), *S. thermophilus* 95/2 suşu için pH 7.0, *L. bulgaricus* 77 suşu için pH 7.0-7.5 arasında (Ustok vd., 2010) ve *Lactococcus lactis* için pH 6.0 (Mozumder vd., 2012) olduğu rapor edilmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 (pH 6.2) ve *S. thermophilus* Z1052 (pH 6.8) suşlarından elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz enzimi nötr pH'a yakın değerlerde yüksek relatif aktivite gösterdiklerinden, sütte (pH 6.6) ve peynir altı suyunda (pH 6.2) laktozun hidrolizinde kullanım potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülmüştür.



Şekil 1. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541'den elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz enzimine pH'ın etkisi  
Figure 1. Effect of pH on  $\beta$ -galactosidase enzyme activity in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541



Şekil 2. *S. thermophilus* Z1052'den elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz enzimine pH'ın etkisi  
Figure 2. Effect of pH on  $\beta$ -galactosidase enzyme activity in *S. thermophilus* Z1052

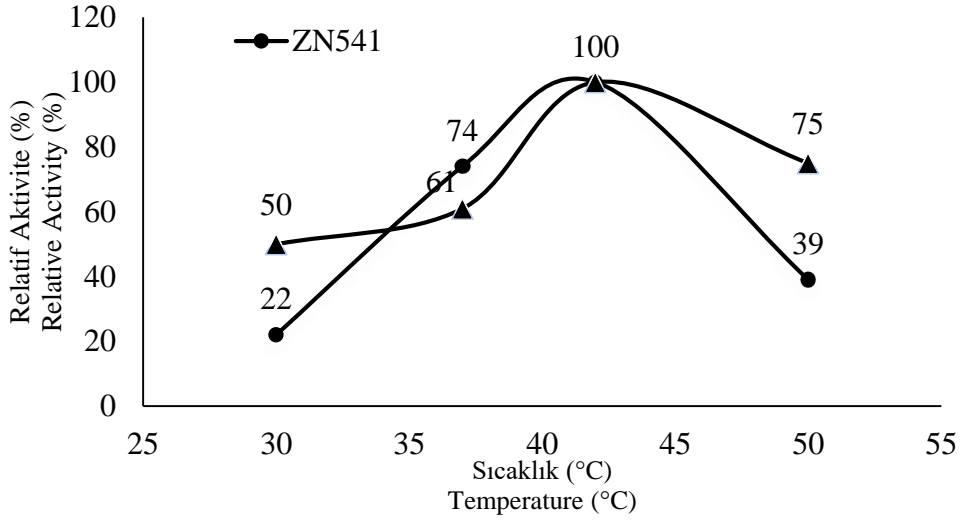
Bakterilerden elde edilen  $\beta$ -galaktosidazın kullanım kaynağını belirlemedeki seçim kriterlerinden biri de reaksiyon sıcaklığıdır (Mahadevaiah vd., 2020). Reaksiyon süresi, pH, enzimin elde edildiği kaynak, substrat gibi birçok faktör enzimin optimum sıcaklığını etkilemektedir (Ustok vd., 2010). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 suşunda enzim aktivitesi, 30°C'de 0.055 U/mL (relatif aktivite: %22), 37°C'de 0.184 U/mL (%74), 42°C'de 0.247 U/mL (%100) ve 50°C'de 0.097 U/mL (%75) olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). *S. thermophilus* Z1052 suşunda enzim aktivitesi, 30°C'de 0.120 U/mL (relatif aktivite: %50), 37°C'de 0.144 U/mL (%61), 42°C'de 0.238 U/mL (%100) ve 50°C'de 0.178 U/mL (%39) tespit edilmiştir. Her iki suşdan elde edilen enzimin optimum sıcaklık değeri 42°C olarak belirlenmiştir. Enzimlerin relatif aktivitesinin 30°C'de en düşük değerde olduğu görülmüştür (Şekil 3). Benzer şekilde, farklı laktik asit bakterileri ile yapılan çalışmalarda,  $\beta$ -galaktozidazın en aktif olduğu sıcaklığın, *L. crispatus* ATCC 33820 için 45°C (Kim ve Rajagopal, 2000), yoğurttan izole edilen *S. thermophilus* suşu için 40°C (Princely vd., 2013), *L. plantarum* 70810 suşu için 60°C (Zhang vd., 2013) ve *S. thermophilus* 95/2 suşu için 50°C, *L. bulgaricus* 77 suşu için 45°C (Ustok vd., 2010) olduğu rapor edilmiştir. Süt endüstrisinde laktozun hidrolizinde

yüksek sıcaklıklarda istenmeyen mikroorganizmalar çoğalmadan  $\beta$ -galaktozidaz elde edilebileceğinden çalışmamızda belirlenen yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitelerinin fazla olması bir avantaj olarak değerlendirilmiştir.

LAB'de  $\beta$ -galaktosidaz üretimi için substrat konsantrasyonu, enzimin reaksiyon hızını arttıran en önemli faktörlerden birisidir (Deng vd., 2020). Lac baskılayıcı proteinine bağlanarak lacZ geninin ekspresyonunu destekleyen ve bu proteinin lac operonun operatör bölgesine bağlanmasını engelleyen laktoz,  $\beta$ -galaktosidaz sentezini uyaran optimum karbon kaynağıdır (Wheatley vd., 2013). Bu nedenle bu çalışmada substrat kaynağı olarak laktoz kullanılmış ve farklı konsantrasyonlardaki laktozun (%2, 4, 6 ve 8) enzim aktivitesine etkisi rapor edilmiştir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ZN541 suşunda, farklı laktoz konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesinin sırasıyla, 0.247 U/mL (relatif aktivite: %100), 0.155 U/mL (%62), 0.134 U/mL (%54) ve 0.121 U/mL (%49); Z1052 suşunda ise sırasıyla, 0.136 U/mL (relatif aktivite: %57), 0.238 U/mL (%100), 0.142 U/mL (%60) ve 0.137 U/mL (%58) olarak belirlenmiştir. ZN541 suşundan elde edilen enzimin optimum laktoz konsantrasyonu %2, Z1052 suşundan elde edilen enzimin optimum laktoz konsantrasyonu ise %4 olarak tespit edilmiştir. ZN541 suşundan

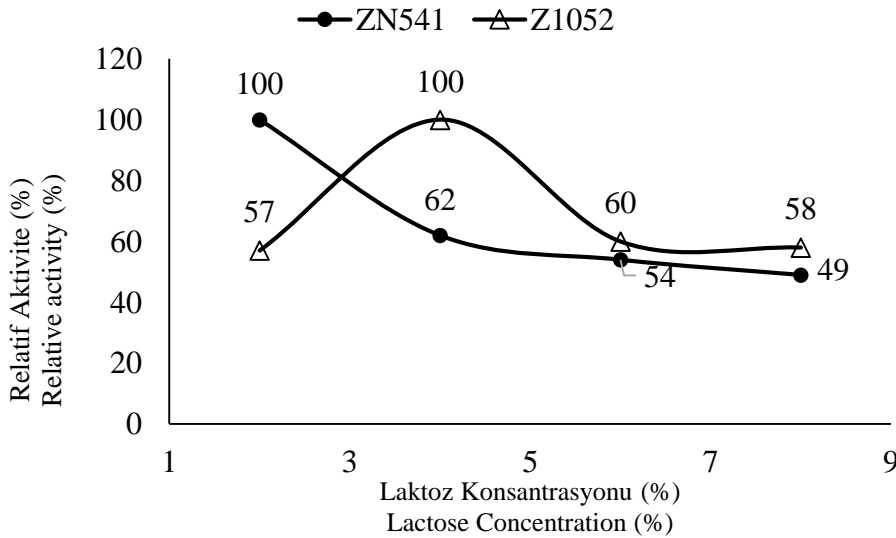
elde edilen enzimde, laktoz konsantrasyonu arttıkça relatif aktivitenin düştüğü görülmüştür (Şekil 4). Kılıç (2013), *L. fermentum* ZYN17 ve *L. acidophilus* BAZ36 suşları için %4, *L. casei* LB65 ve *L. rhamnosus* GD11 suşları için %2 oranında laktozun enzim aktivitesinin en uygun, Akolkar vd., (2005) *L. acidophilus* suşundan elde ettikleri β-

galaktozidaz enziminin maksimum β-galaktozidaz aktivitesini %1,5 laktoz konsantrasyonunda ve Zhang vd., (2013), *L. plantarum* 70810 suşunun ise %4 laktoz konsantrasyonunda aktivitenin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, β-galaktozidaz enzim aktivitesi farklı laktoz konsantrasyonlarında farklılık göstermiştir.



Şekil 3. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052 suşlarından elde edilen β-galaktozidaz enzime sıcaklığın etkisi

Figure 3. Effect of temperature on β-galactosidase enzyme in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 and *S. thermophilus* Z1052



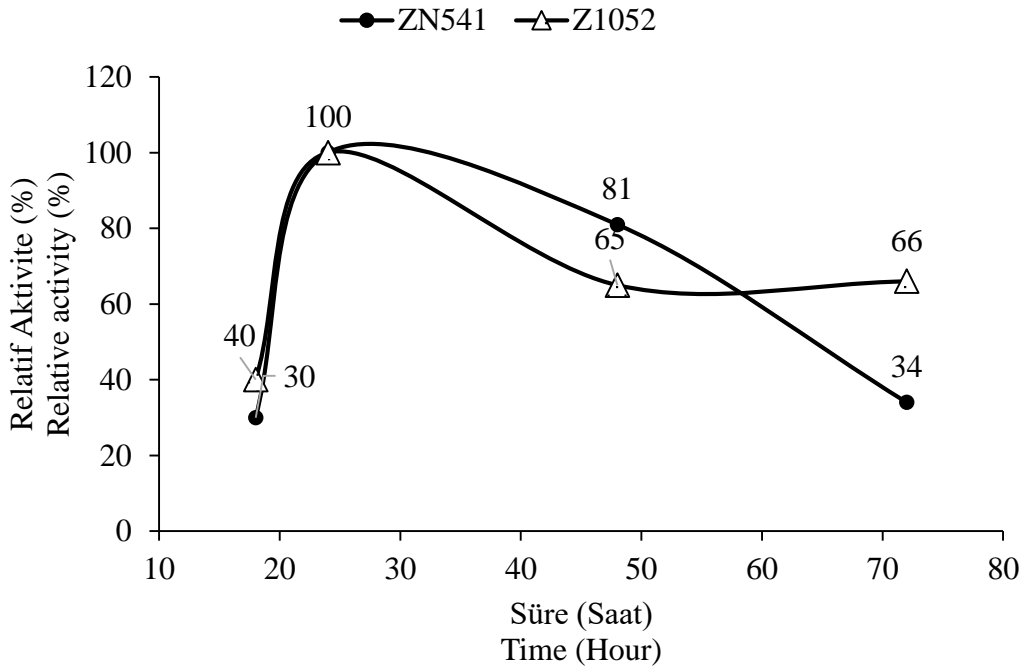
Şekil 4. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052 suşlarından elde edilen β-galaktozidaz enzime laktoz konsantrasyonunun etkisi

Figure 4. Effect of lactose concentration on β-galactosidase enzyme in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 and *S. thermophilus* Z1052



Mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri üzerinde, fermantasyon süresi önemli bir etkiye sahiptir. Bakterilerin fermantasyon süresinin kısa olması enzim üretim maliyetini azaltan bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Serin ve Akcan, 2019). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 suşunda, enzim aktivitesi 18. saatte 0.074 U/mL (relatif aktivite: %30), 24. saatte 0.247 U/mL (%100), 42. saatte 0.201 U/mL (%81) ve 72. saatte 0.084 U/mL (%34) olduğu belirlenirken, *S. thermophilus* Z1052 suşunda enzim aktivitesi 18. saatte 0.095 U/mL (%40), 24. saatte 0.238 U/mL (%100), 42. saatte 0.154 U/mL (%65) ve 72. saatte 0.157 U/mL (%66) olarak tespit edilmiştir. ZN541 ve Z1052 suşlarından elde edilen enzimlerin optimum enzim aktivitesi için gereken fermantasyon süresinin 24 saat olduğu belirlenmiştir. Her iki suştan elde edilen enzimlerin relatif aktivitenin 18. saatte en düşük değerde olduğu görülmüştür (Şekil 5). Benzer

şekilde, Makwana vd., (2017) 10 *Lactobacillus* kültüründe  $\beta$ -galaktozidaz aktivitenin 24. saatte 48. ve 72. saate göre daha yüksek olduğunu, Carević vd., (2015) *L. acidophilus* suşunda 48. saatte enzim aktivitesinin maksimum düzeyde olduğunu ve soya ieeğinden (Das vd., 2020) izole edilen 8 *Lactobacillus* suşunun, optimum enzim aktivitesini 24. saatte gösterdiklerini bildirmişlerdir. Birçok bakterinin maksimum  $\beta$ -galaktozidaz enzim üretimini durgunluk fazının başlangıcında gösterdiği rapor edilmektedir (Carević vd., 2015; Alves vd., 2010). Bu durum, durgunluk fazında, ortamda bulunan laktoz hidrolizinin sonucu olarak düşük laktoz konsantrasyonu ve daha büyük miktarlarda serbest glikozun,  $\beta$ -galaktozidaz üretiminin baskılanmasına neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Murad vd., 2011). Çalışmamızdaki her iki bakterilerinin de enzim aktivitesinin durgunluk fazının başlangıcında yüksek çıktığı görülmüştür.



Şekil 5. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052 suşlarından elde edilen  $\beta$ -galaktozidaz enzime fermantasyon süresinin etkisi

Figure 5. Effect of fermentation time on  $\beta$ -galactosidase enzyme in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 and *S. thermophilus* Z1052

Bu çalışmada,  $\beta$ -galaktozidaza duyulan endüstriyel ilgiden dolayı, yoğurt kaynaklı *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının  $\beta$ -galaktozidaz üretimi için potansiyel kaynak olabilirliği araştırılmıştır. Optimizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bakterilerimizden elde edilen enzimlerin biyoteknolojik uygulamalar için umut verici adaylar olabileceği düşünülmüştür.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların makale ile ilgili başka kişiler veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### YAZAR KATKILARI

ZY ve HY, araştırmanın planlanması, yürütülmesi, değerlendirilmesi ve yazımında görev almıştır.

#### TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Akademik Yazma Uygulama Ve Araştırma Merkezi'ne makalenin İngilizce dil bilgisini kontrol ettiği için teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

Alves, F.G., Filho, F., Medeiros Burkert, J., Kalil, S. 2010. Maximization of  $\beta$ -Galactosidase production: A simultaneous investigation of agitation and aeration effects. *Appl Biochem Biotech*, 160, 1528–1539. doi: 10.1007/s12010-009-8683-z

Akolkar, S.K., Sajgure, A., Lele, S.S. 2005. Lactase Production from *Lactobacillus acidophilus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 21, 1119–1122. doi: 10.1007/s11274-005-0079-9

Carević, M., Vukašinović-Sekulić, M., Grbavčić, S., Stojanović, M., Mihailović, M. Dimitrijević, A., Bezbradica, D. 2015. Optimization of  $\beta$ -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hem Ind*, 69 (3), 305–312. doi: 10.2298/HEMIND140303044C

Das, S., Mishra B.K., Hati, S. 2020. Effect of nutritional factors on growth behaviour, proteolytic,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activities of *Lactobacillus* cultures during soy-drink fermentation. *Curr Res Nut Food Sci*, 8 (3), 877-888. doi: http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.8.3.18

Delgado-Fernandez, P., Plaza-Vinuesa, L., Lizasoain-Sánchez, S., de las Rivas, B., Muñoz, R., Jimeno, M.L., García-Doyagüez, E., Moreno, F.J., Corzo, N. 2020. Hydrolysis of lactose and transglycosylation of selected sugar alcohols by LacA  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *J Agric Food Chem*, 68, 7040–7050. doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02439

Deng, Y., Xu, M., Ji, D., Agyei, D. 2020. Optimization of  $\beta$ -galactosidase production by batch cultures of *Lactobacillus leichmannii* 313 (ATCC 7830). *Ferment*, 6, 27. doi.org/10.3390/fermentation6010027

Gobinath, D. and Prapulla, S.G. 2015. Transgalactosylating  $\beta$ -galactosidase from probiotic *Lactobacillus plantarum* MCC2156: Production and permeabilization for use as whole cell biocatalyst. *J Food Sci Technol-Mysore*, 52 (9), 6003–6009. doi:10.1007/s13197-014-1656-4

Gomaa, E.Z. 2018. Beta-galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus reuteri*: Optimization, characterization and formation of galactooligosaccharides. *Indian J Biotechnol*, 17 (3), 407-415.

Hsu, C.A., Yu, R.C., Chou, C.C. 2005. Production of  $\beta$ -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *Int J Food Microbiol*, 104 (2), 197–206. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.010

Ibrahim, A.H. 2018. Enhancement of  $\beta$ -galactosidase activity of lactic acid bacteria in fermented camel milk. *Emirates J Food Agric*, 30 (4), 256-267. doi: 10.9755/ejfa.2018.v30.i4.1660

Inchaurrondo, V.A., Flores, M.V., Voget, C.E. 1998. Growth and  $\beta$ -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 20, 291–298.

Ismail, S.A.A., El-Mohamady, Y., Helmy, W.A., Abou-Romia, R., Hashem, A.M. 2010. Cultural condition affecting the growth and production of  $\beta$ -galactosidase by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495. *Aust J Basic Appl Sci*, 4 (10), 5051-5058.

Kara F. 2004. Release and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*.

- M.C. Thesis, Department of Biotechnology, Middle East Technical University, 89p.
- Kılıç, Y. 2013. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin beta galaktosidaz enzim aktiviteleri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 103 s.
- Kılıç, Y., Yüksekdağ, Z.N., Yüksekdağ, H. 2014. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin beta galaktosidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi. *GIDA*, 39 (4), 211-218. doi: 10.5505/gida.29491
- Kim, J.W. and Rajagopal, S.N. 2000. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol*, 45, 29–34. doi: 10.1007/BF02817446
- Kittibunchakul, S., van Leeuwen, S.S., Dijkhuizen, L., Haltrich, D., Nguyen. T.H. 2020. Structural comparison of different galactooligosaccharide mixtures formed by  $\beta$ -Galactosidases from Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J Agric Food Chem*, 68, 4437–4446. doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08156
- Mahadevaiah, S., Basavaiah, R., Parida, M., Batra, H.V. 2020. Optimal production of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides (GOS). *J Pure Appl Microbiol*, 14(4), 2769-2780. doi.org/10.22207/JPAM.14.4.53
- Makwana, S., Hati, S., Parmar, H., Aparnathi, K.D. 2017. Process optimization for the production of  $\beta$ -galactosidase using potential *Lactobacillus* cultures. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6(8), 1454-1469. doi:10.20546/ijcmas.2017.608.176
- Mozumder, N.H.M.R., Akhtaruzzaman, M., Bakr, M.A., Tuj-Zohra, F. 2012. Study on isolation and partial purification of lactase ( $\beta$ -galactosidase) enzyme from *Lactobacillus* bacteria isolated from yogurt. *J Sci Res*, 4 (1), 239-249. doi: https://doi.org/10.3329/jsr.v4i1.8478
- Murad, H.A., Refaea, R.I., Aly, E.M. 2011. Utilization of UF-permeate for production of  $\beta$ -galactosidase by Lactic Acid Bacteria. *Pol J Microbiol*, 60, 139–144. doi:10.33073/pjm-2011-019
- Özkan, E.R., Demirci, T., Öztürk, H.İ., Akına, N. 2021. Screening *Lactobacillus* strains from artisanal Turkish goatskin casing Tulum cheeses produced by nomads via molecular and *in vitro* probiotic characteristics. *J Sci Food Agric*, 101 (7), 2799-2808. doi 10.1002/jsfa.10909
- Panesar, P.S., Kumari, S., Panesar, R. 2010. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res*, 473137. doi: 10.4061/2010/473137
- Princely, S., Basha, N.S., Kirubakaran, J.J., Dhanaraju, M.D. 2013. Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Eur J Exp Biol*, 3(2), 242-251.
- Serin, B ve Akcan, N. 2019. Katı faz fermantasyon tekniği ile *Bacillus circulans* ATCC 4516'dan ekstrasellüler  $\beta$ -galaktosidaz üretimi. *KSU J Agric Nat*, 22(3), 480-486. doi:10.18016/KSUTARIMDOGA.VI.503414
- Shah, N.P. and Otieno, D.O. 2007. Endogenous  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activities from selected probiotic microorganisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk. *J Appl Microbiol*, 103 (4), 910-917. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03438.x
- Son, S.H., Jeon, H.L., Jeon, E.B., Lee, N.K., Park, Y.S., Kang, D.K., Paik, H.D. 2017. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of  $\beta$ -galactosidase and antioxidant activities. *LWT-Food Sci Technol*, 85, 181-186. doi: 10.1016/j.lwt.2017.07.018
- Ustok, F.I., Tari, C., Harsa, S. 2010. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chem*, 119, 1114–1120. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.08.022
- Venkateswarulu, T.C., Prabhakar, K.V., Kumar, R.B. 2017. Optimization of nutritional components of medium by response surface methodology for enhanced production of lactase. *3 Biotech*, 7, 202. doi: 10.1007/s13205-017-0805

- Wheatley, R.W., Lo, S., Jancewicz, L.J., Dugdale, M.L., Huber, R.E. 2013. Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by lacZ-galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *J Biol Chem*, 288, 12993–13005. doi: 10.1007/s13205-017-0805-7
- Xin, Y., Guo, T., Zhang, Y., Wu, J., Kong, J. 2019. A new  $\beta$ -galactosidase extracted from the infant feces with high hydrolytic and transgalactosylation activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(20), 8439-8448. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10092-x>
- Yu, P., Li, N., Geng, M., Liu, Z., Liu X., Zhang, H., Zhao, J., Zhang, H., Chen W. 2020. Lactose utilization of *Streptococcus thermophilus* and correlations with  $\beta$ -galactosidase and urease. *J Dairy Sci*, 103 (1), 166–171. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17009>
- Zhang, H., Li, W, Rui, X., Sun, X., Dong, M. 2013. *Lactobacillus plantarum* 70810 from Chinese paocai as a potential source of  $\beta$ -galactosidase for prebiotic galactooligosaccharides synthesis. *Eur Food Res Technol*, 236, 817–826. doi: 10.1007/s00217-013-1938-5
- Zhang, W., Wang, C., Huang, C.Y., Yu, Q., Liu, H.C., Zhang, C.W., Pei, X.F., Xu, X., Wang, G.Q. 2012. Analysis of  $\beta$ -galactosidase production and their genes of two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol Lett*, 34 (6), 1067-1071. doi: 10.1007/s10529-012-0870-2