

Katı Faz Fermantasyon Tekniği ile *Bacillus circulans* ATCC 4516'dan Ekstrasellüler β -Galaktosidaz Üretimi

Besi SERİN¹, Nurullah AKCAN²

¹Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 21280, Diyarbakır, ²Siirt Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Siirt, TÜRKİYE.

¹<https://orcid.org/0000-0002-7659-3813>, ²<https://orcid.org/0000-0003-3960-9553>

✉: beserin@hotmail.com

ÖZET

Çoğu mikrobiyal enzim, derin fermantasyonu ile üretilmesine rağmen, katı faz fermantasyonu (KFF) ile tarımsal atıkların substrat olarak kullanılmasıyla enzimlerin üretimi daha ekonomik hale gelir. Enzim üretim sürecini KFF açısından kayda değer ölçüde ucuz hale getirmek için, maliyeti düşük substratların kullanımı büyük ilgi görmektedir. Bu çalışmada, KFF yönteminde substrat olarak pirinç kepeği kullanılarak *Bacillus circulans* ATCC 4516'dan β -galaktosidaz üretimi ve enzim üretimine etki eden bazı parametrelerin etkisi incelendi. İnkübasyon zamanı, inkübasyon sıcaklığı, inokülüm seviyesi, başlangıç pH'sını içeren belirli fermantasyon parametreleri ayrı ayrı incelendi. Maksimum miktarda β -galaktosidaz üretimi; %35 inokülüm oranı, pH 7.5, 37°C'de ve 48. saatte elde edildi. Ayrıca fermantasyon ortamına çeşitli karbon ve azot kaynakları eklenerek β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlara göre ortama eklenen karbon ve azot kaynakları enzim üretimini baskıladı. Son zamanlarda endüstriyel önemi olan enzimlerin daha ekonomik bir şekilde üretilmesine yönelik çalışmalara olan ilgi artmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre pirinç kepeği substrat olarak kullanılarak *Bacillus circulans* ATCC 4516'dan düşük maliyetle β -galaktosidaz enzimi üretilebilir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 27.12.2018

Kabul Tarihi : 22.02.2019

Anahtar Kelimeler

Bacillus circulans ATCC 4516

β -galaktosidaz

Katı faz fermantasyon

Optimizasyon

Solid State Fermentation for Production of Extracellular β -Galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 4516

ABSTRACT

Although most microbial enzymes are produced by submerged fermentation, the use of agricultural wastes as substrates in solid state fermentation (SSF) makes the production of enzymes more economical. The use of economic substrates is of great interest for making the enzyme production process significantly cheaper for SFF. The aim of this study was to investigate the effect of some parameters on the production of β -galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 4516 using rice bran as substrate in solid state fermentation (SFF) method. Certain fermentation parameters involving incubation time, incubation temperature, inoculum level and initial pH were studied separately. Maximal amount of β -galactosidase production was obtained at 35% inoculum level, at initial pH of 7.5, at 37°C over 48 h. In addition, various carbon and nitrogen sources were added to fermentation medium and the effect on β -galactosidase production was investigated. According to the results, carbon and nitrogen sources which added to the environment suppressed the enzyme production.

Research Article

Article History

Received : 27.12.2018

Accepted : 22.02.2019

Keywords

Bacillus circulans ATCC 4516

β -galactosidase

Solid state fermentation

Optimization

To Cite : Serin B, Acan N 2019. Katı Faz Fermantasyon Tekniği ile *Bacillus circulans* ATCC 4516'dan Ekstrasellüler β -Galaktosidaz Üretimi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 22(3): 480-486. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.503414.

GİRİŞ

Hidrolazlar, endüstriyel uygulama alanı gittikçe artan enzimler arasında yer almaktadır. Özellikle

laktozun galaktoz ve glukoza hidrolizini katalizleyen β -galaktosidaz veya β -D-galaktosid galaktohidrolaz (EC 3.2.1.23), özel bir öneme sahiptir (Manera ve

ark., 2008). Bu enzim, dünya nüfusunun %70'inden fazlasında görülen laktoz intoleransı olan insanların süt ve süt ürün türevlerinin tüketimi için kullanılmaktadır (Liua ve ark., 2017). Ayrıca, donmuş ve yoğunlaştırılmış süt ürünlerindeki laktoz kristalizasyonunun önlenmesi, süt endüstrisinde atık olarak meydana gelen ve önemli çevre kirliliği sorunlarına neden olan peynir altı suyu (Geiger ve ark., 2016) kaynaklı su kirliliğinin azaltılması ve laktozun tatlandırıcı özelliklerinin artırılması amacıyla kullanılmaktadır (Furlan ve ark., 2000). Transglükosilasyon aktivitesine sahip olmalarıyla bu enzimler çok umut verici prebiyotik ajanlar olan oligosakkaritlerin üretimi için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Rycroft ve ark., 2001; Rhimi ve ark., 2010; Coulier ve ark., 2009).

β -Galaktosidaz, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklarda bulunmaktadır ve kaynaklarına göre özellikleri belirgin bir şekilde farklılık göstermektedir (Finocchiaro ve Olson, 1980; Mahoney, 1998). Bununla birlikte, laktozun hidrolizinde mikrobiyal kaynaklı enzimler kullanılmaktadır (Das ve ark., 2015). Bu yüzden, mikrobiyal kaynaklı β -galaktosidazlar büyük bir teknolojik ilgiye sahiptir. Mikroorganizmalar diğer kaynaklara göre kolay kullanım, kolay elde edilme, yüksek üretim verimi gibi bir dizi avantaj sunar. β -galaktosidaza duyulan ticari ilgiden dolayı, bu enzimin potansiyel kaynakları olan çok sayıda mikroorganizma değerlendirilmiştir (Panesar ve ark., 2006).

Bacillus circulans'den elde edilen β -galaktosidazın, oldukça fazla miktarda oligosakkarit ürettiği ve β -1-4 bağlantısının oluşumuna yönelik spesifik bir bölgesel seçicilik gösterdiği bilinmektedir (Vetere ve Paoletti, 1998). Bu enzim için artan endüstriyel talep, ticari ölçekte laktoz hidrolizini daha ekonomik olarak gerçekleştirmek için uygun maliyetli üretim yöntemleri gerektirir (Nor ve ark., 2001). β -galaktosidaz üretim maliyetinde azalma çok önemlidir. β -galaktosidaz üreten mikroorganizmaların kültürü için pirinç kabuğu, pirinç kepeği ve buğday kepeği gibi bol miktarda bulunan lignoselülozik mahsul artıklarının kullanımı bu amaca ulaşmak için bir fırsat sunmaktadır. β -galaktosidaz üretimi amacıyla, substratları değerlendirmede yüksek aktiviteye sahip olan ve seçilen mikroorganizma için optimize edilmiş fermantasyon koşullarını tanımlayan mikroorganizmaları seçmeye yönelik bazı araştırmalar yapılmıştır. (Manera ve ark., 2008; Domingues ve ark., 2004; Ramírez ve Rivas, 2003). Geleneksel derin fermantasyonda kullanılacak maksimum substrat konsantrasyonu sadece %2-10'dur. Substrat konsantrasyonunu %10'un üzerine çıkarmak için KFF en çekici alternatif olarak görülmektedir (Ng ve ark., 2010).

KFF katı matris içeren serbest halde suyun olmadığı ortamlarda yürütülen fermantasyon süreci olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, substrat organizmanın büyümesini ve metabolizmasını desteklemek için yeterli neme sahip olmalıdır (Singhania ve ark., 2009; Pandey, 2003). Bir yandan düşük maliyetli tarımsal artıkların kullanılmasıyla KFF, sürecin daha ekonomik olarak uygulanabilirliğine katkıda bulunurken, diğer yandan kirliliğe neden olan atık sorununu çözmektedir (Singhania ve ark., 2009). KFF, endüstriyel-tarım atıklarının işlenmesinde sayısız fırsatlar sunmaktadır ve enzimlerin üretimi için muazzam bir potansiyele sahiptir (Kunamneni ve ark., 2005; Pandey, 2003). KFF, daha geleneksel olan, Sıvı Faz Fermantasyonuna (SmF) göre düşük üretim maliyeti, su ve enerji tasarrufu, daha az atık sorunu ve daha konsantre ürün elde edilmesiyle ürünün stabilitesini koruması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Pandey, 2003; Holker ve Lenz, 2005). Yapılan çalışmalarla umut verici laboratuvar ölçekli KFF süreçleri periyodik olarak rapor edilmiştir (Vasiljevic ve Jelen, 2001; Lazim ve ark., 2009; Ng ve ark., 2010; Chapla ve ark., 2010).

Bu çalışmada, KFF yönteminde substrat olarak tarımsal bir atık olan pirinç kepeği kullanılarak *B. circulans* ATCC 4516'dan β -galaktosidaz üretimi ve enzim üretimi üzerine etki eden inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, pH, inokulum oranı, ortama eklenen azot ve karbon kaynakları gibi çevresel parametrelerin optimize edilmesi aynı zamanda düşük maliyetli uygun fermantasyon ortamının geliştirilmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Mikroorganizma

Biyolojik materyal olarak MicroBioLogics Inc'den temin edilen ve β -galaktosidaz üretiminden sorumlu olan *B. circulans* ATCC 4516 kullanıldı. *B. circulans* ATCC 4516 nutrient katı besiyerinde 37°C'de 24 saat boyunca üremeye bırakıldı. Yeterince üreyen hücreler daha sonra bir öze yardımıyla Luria broth (LB) (%1 maya özütü, %0.5 pepton, %0.5 NaCl, (w v⁻¹), pH 7.0) sıvı besiyeri ortamına transfer edildi.

Substrat

Çalışmada katı substrat olarak kullanılan pirinç kepeği Diyarbakır/Türkiye'de ki yerel pazardan temin edildi. Çalışmada kullanılan pirinç kepeği öğütüldükten sonra farklı çaplardaki elekler (500-2000 μ m çaplı) yardımıyla elendi ve 90°C'de 3 saat kurutuldu.

Katı Faz Fermantasyon (KFF)

Kurutulmuş substrat besiyeri ortamında %30 (w v⁻¹) olacak şekilde 3.0 g ve 1500 μ m parça

büyükliğindeki pirinç kepeği kullanılarak 100 mL'lik erlenmayerlere aktarıldı, üzerlerine 10 mL çeşme suyu eklendi ve 121°C'de 15 dk otoklavlandı. 3.0 mL spor suspansiyonu (2×10^7 KOB mL⁻¹) ile inoküle edildi şişeler 150 rpm'de 37°C'de 144 saat çalkalanmaya bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamı steril gazlı bezle (500 µm gözenek çapında) süzülükten sonra 7.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı alınarak enzim aktivite deneylerinde kullanıldı (Baysal ve ark., 2003).

Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivite tayininde, 0.1 M fosfat tamponu (pH 6.8) ve 200 µL enzim çözeltisi içinde 500 µL 6 mM o-nitrofenil-D-galaktopiranozit (ONPG) ihtiva eden reaksiyon karışımı, 30 dk boyunca 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon, 0.5 µL 1 M Na₂CO₃ eklenerek sonlandırıldı ve ONPG'den salınan o-nitrofenol (ONP) konsantrasyonu 420 nm'de absorbans ölçülerek (UV VIS⁻¹ 1601 spektrofotometre) belirlendi. Bir ünite β-galaktosidaz aktivitesi (U), dakikada 1 nmol ONP açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı (Vasiljevic ve Jelen, 2001). Tüm deneyler üç defa yapıldı ve ortalama standart sapma ile gösterildi.

Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini bovine serum albumin (BSA) standart olarak kullanılarak Lowry yöntemine göre belirlendi (Lowry ve ark., 1951).

KFF'de Bazı Parametrelerin B-Galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

KFF sırasında enzim üretimini etkileyen çeşitli süreç parametreleri optimize edildi. Strateji, her bir parametreyi diğerlerinden bağımsız olarak optimize etmek ve daha sonra tüm deneylerde optimal koşullar kullanmaktır. İnkübasyon zamanı (24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat), inkübasyon sıcaklığı (30, 37, 40, 45 ve 50°C), inokulum oranı (%5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60 ve 80), ortamın başlangıç pH'sı (pH: 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0) gibi parametrelerin etkisi incelendi. Ayrıca fermantasyon ortamına %1 oranında inorganik azot kaynakları (amonyum nitrat, sodyum nitrat, amonyum klorid ve amonyum sülfat), organik azot kaynakları (pepton, tripton, maya özütü, et özütü, üre ve kazein) ve karbon kaynakları (mannoz, ksiloz, sükroz, fruktoz, galaktoz, glukoz ve arabinoz) eklenerek β-galaktosidaz üretimi üzerine etkileri incelendi.

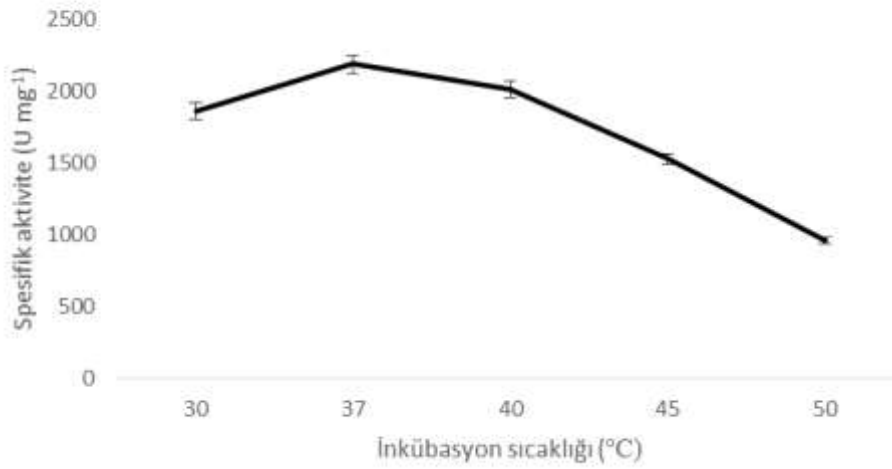
BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada β-galaktosidaz üretiminin maliyetini düşürmek amacıyla bir tarım atığı olan ve çevre kirliliğine neden olan düşük maliyetli pirinç kepeği kültür ortamı olarak seçildi. Substrat olarak pirinç

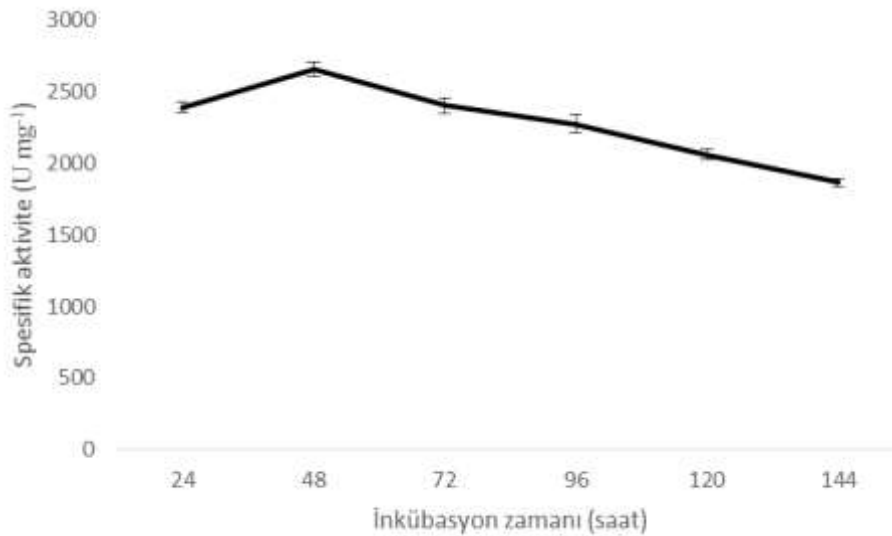
kepeği kullanılmasıyla yüksek oranda (3875.4±8.3) β-galaktosidaz üretimi elde edildi. Pirinç kepeği bileşimi yaklaşık %10 protein, %10 nem, %20 ham lif, %15 ham yağ ve %45 karbonhidrattır. (Amisshah ve ark., 2003). Pirinç kepeğinin karbonhidrat içeriğinin yüksek olması, muhtemelen bakterinin bu içeriği iyi bir şekilde metabolize etmesine, daha iyi üremesi için uygun ortam hazırlanmasına ve bu sayede ortamda enzim sekresyonunun artmasına neden olduğu söylenebilir. Pirinç kepeği, *T. reesei* ve *P. citrinum* YS40-5 tarafından selüloz ve beta glukosidaz üretimi için ideal bir substrat olarak kabul edilmiştir (Ng ve ark., 2010; Latifian ve ark., 2007).

Sıcaklık kontrolü, KFF'nin gerçekleştirilmesinde en önemli faktörlerden biridir ve dikkate alınmalıdır (Nizamuddin ve ark., 2008). Fermantasyon sırasında sıcaklığın enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde, maksimum β-galaktosidaz üretimi (2188.3±61.0 U mg⁻¹) için optimum sıcaklık 37°C olarak tespit edildi (Şekil 1). Çalışmada kullanılan mikroorganizma mezofil özellikte olduğundan daha yüksek inkübasyon sıcaklıklarına gerek duyulmaması, enzim üretim maliyetini azaltmaktadır. Furlan ve ark. (2000) *K. marxianus*'tan maksimum β-galaktosidaz üretimi için optimum 35°C'lik bir sıcaklık gerektiğini belirtmişlerdir. β-galaktosidaz üretimi üzerine inkübasyon süresi etkisi Şekil 2'de verilmiştir. Pirinç kepeği kullanılarak fermantasyon işlemi gerçekleştiğinde 48 saatlik inkübasyon süresinde en fazla enzim üretimi (2658.4±45.0 U mg⁻¹) gerçekleşti. Optimum sürenin üzerindeki inkübasyon zamanlarında enzim üretiminde azalma tespit edildi. Fermantasyon sürecinde inkübasyon zamanının kısa olması enzim üretim maliyetini azaltan bir etmendir. Bu azalmanın nedeni fermantasyon işlemi sırasında ortam pH değerindeki değişimlere bağlı olarak enzim denatürasyonuna bağlı olabilir (Ahmed, 2008). Mukesh Kumar ve ark. (2012) *Bacillus* sp. MPTK121'den maksimum β-galaktosidaz üretimini 48. saatte elde etmişlerdir.

İnokulum oranı, enzim üretiminde önemli bir rol oynar ve bu nedenle bu parametrenin de uygun bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Fermantasyon işlemi sırasında enzim üretimi için optimum inokulum oranı (2580.3±19.3 U/mg) %35 olarak bulunmuştur (Şekil 3). İnokulum oranındaki artış genelde organizmanın büyüme ve büyüme ile ilişkili aktivitelerine belirli bir seviyeye kadar olumlu etki yapar. Ancak inokulum oranındaki daha fazla artış besin sınırlanmasından dolayı mikrobiyal aktivitede azalmaya neden olabilir. Düşük inokulum oranı, istenen ürünü elde etmek için fermantasyon işleminde daha uzun bir süre gerektirebilir (Kashyap ve ark., 2002). Çoğu mikroorganizma, hücre büyümesi ve enzim üretimi için hücre dışı pH'ya güçlü bağımlılık gösterir (Kumar ve Takaki, 1999).



Şekil 1. İnkübasyon sıcaklığının β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisi



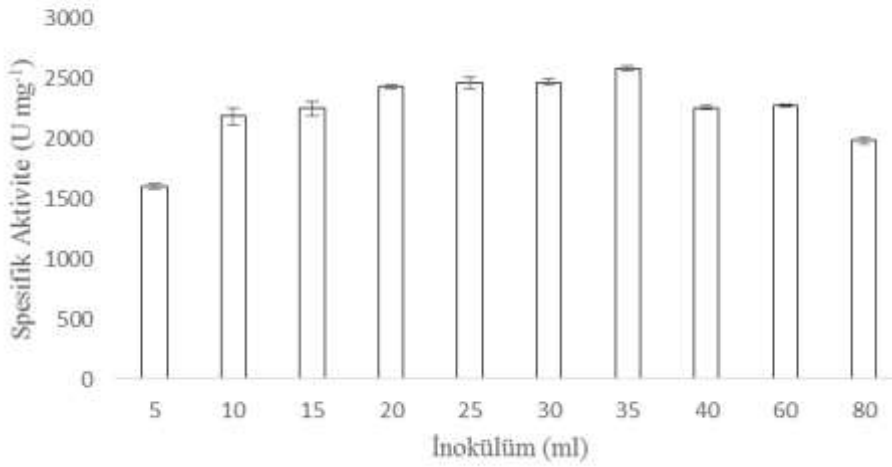
Şekil 2. İnkübasyon süresinin β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisi

Elde ettiğimiz sonuçlar, pH değerinin asidik aralıktan nötral aralığa doğru yükselmesiyle β -galaktosidaz üretiminin arttığını ve pH 7.5'te maksimum üretimin (3137.2 ± 21 U mg⁻¹) olduğunu gösterdi. pH değerindeki artış *B. circulans* ATCC 4516'dan elde edilen β -galaktosidaz üretiminde azalmaya neden oldu (Şekil 4). β -galaktosidaz üretimi ortamın doğasından meydana gelen besinlerin çözünmesi ve transferinden kaynaklanan pH değişimlerine bağlı olarak etkilenebilir. Elde edilen sonuçlar enzim üretiminde ve *B. circulans* ATCC 4516'nın fermantasyon ortamında büyümesinde pH'nın hassas bir rol oynadığını gösterdi. Benzer bir şekilde, Hsu ve ark. (2005) *B. longum* CCRC 15708'den başlangıç pH 6.5'te maksimum β -galaktosidaz üretimi olduğunu bildirmişlerdir.

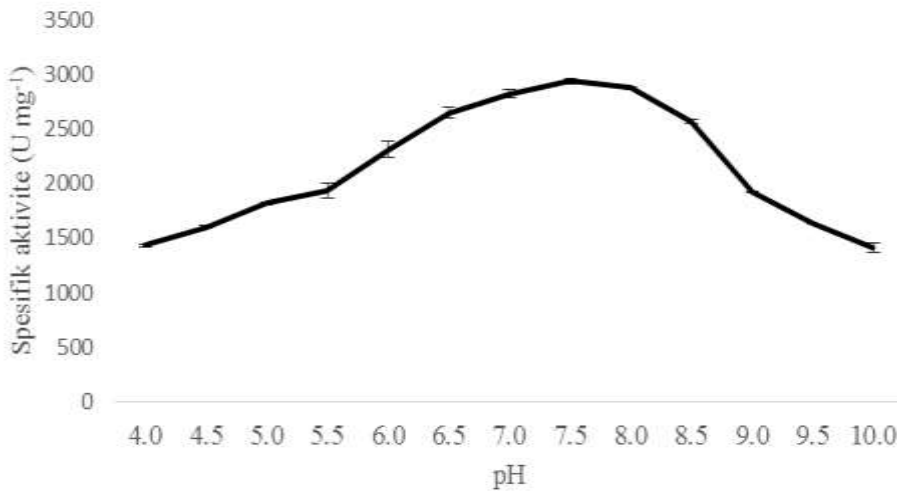
Otoklav sonrası, fermantasyon ortamının pH değeri değişebilir ancak genel olarak KFF işleminde kullanılan endüstriyel-tarım atıkları eşsiz bir tamponlama etkisine sahip olmalarıyla enzim üretimi için avantajlara sahiptirler (Murthy ve ark., 2009).

B. circulans ATCC 4516'dan β -galaktosidaz üretimi üzerine KFF ortamına %1 oranında eklenen karbon kaynaklarının etkisi incelendiğinde kolayca metabolize edilebilir şekerlerin enzim üretimini baskıladığı tespit edildi (Çizelge 1).

Benzer şekilde Konsoula ve Liakopoulou-Kyriakides (2007) *B. subtilis* tarafından β -galaktosidaz üretiminin, mikroorganizmanın kolayca metabolize edilebilir şekerlerin varlığında kültür edildiğinde baskılandığını rapor etmişlerdir.



Şekil 3. İnokülüm oranının β-galaktosidaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 4. Başlangıç pH'nın β-galaktosidaz üretimi üzerine etkisi

Çizelge 1. Karbon kaynaklarının β-galaktosidaz üretimi üzerine etkisi

Karbon kaynağı (%1)	Spesifik aktivite (U mg ⁻¹)
Kontrol*	3875.4±8.3
Mannoz	779.3±26.0
Arabinoz	219.1±12.8
Sukroz	1508.3±13.0
Glukoz	49.7±15.7
Galaktoz	2228.2±12.1
Fruktoz	3071.6±14.9
Laktoz	777.1±13.8
Ksiloz	1060.7±15.6

*Kontrol olarak kullanılan örneğe herhangi bir karbon kaynağı eklenmedi (p < 0.05).

Buna karşın, Nizamuddin ve ark. (2008) pirinç kepeğinin substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamına eklenen kolay metabolize edilebilen

karbonhidratların *A. oryzae*'dan β-galaktosidaz üretimini arttırdığını tespit etmişlerdir.

KFF ortamına %1 oranında eklenen inorganik ve organik azot kaynakları kontrol ile karşılaştırıldığında enzim veriminde önemli bir artışa neden olmadı (Çizelge 2). Bu çalışmada kullanılan pirinç kepeği iyi bir karbon kaynağı olmasının yanında aynı zamanda iyi bir azot kaynağı olarak hizmet etmekte ve böylece fermantasyon ortamına eklediğimiz kompleks azot kaynağındaki artış ile birlikte β-galaktosidaz üretimi olumsuz yönde etkilenmiş olabilir. Bu da enzim üretim maliyeti açısından önemlidir. Bunun yanında daha önce yapılan bir çalışmada, ortama eklenen farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının β-galaktosidaz üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (Nizamuddin ve ark. 2008).

Çizelge 2. Azot kaynaklarının β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisi

Azot kaynağı (%1)	Spesifik aktivite (U mg ⁻¹)
Kontrol*	3875.4±8.3
Sodyum nitrat	1387.0±16.8
Amonyum sülfat	1756.4±10.0
Amonyum nitrat	1081.1±11.6
Amonyum klorür	2502.8±15.8
Et özütü	749.6±2.0
Tripton	582.0±10.4
Pepton	940.5±13.5
Maya özütü	1553.8±16.9
Üre	571.9±18.5
Kazein	702.3±15.4

*Kontrol olarak kullanılan örneğe herhangi bir azot kaynağı eklenmedi ($p < 0.05$).

SONUÇ

Substrat olarak pirinç kepeğinin KFF yönteminde kullanılması, *B. circulans* ATCC 4516'dan β -galaktosidaz üretimine önemli bir avantaj sağladığını göstermiştir. Enzim üretim parametreleri ve yöntemin ekonomik olması süreç teknolojisini ve nispi maliyetleri belirleyen temel niteliklerdir. β -galaktosidaz'ın fiyatı oldukça yüksektir. Bu sorun, substrat olarak çeşitli tarımsal atıkların kullanıldığı KFF yöntemi ile aşılabılır. Mevcut çalışmaya dayanarak, ucuz ve hali hazırda temin edilebilen tarımsal bir madde olan pirinç kepeğinin, yüksek verimde β -galaktosidaz elde etmek için uygun ve ekonomik bir fermantasyon ortamının geliştirilmesi ile ticari ve daha pahalı işlemlerin yerini alabileceği, elde edilen enzimin olası endüstriyel kullanımları için önemli avantajlar oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmed SA, 2008. Optimization of production and extraction parameters of *Bacillus megaterium* levansucrase using solid-state fermentation. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(10): 1199-1204.

Amissah JGN, Ellis WO, Oduro I, Manful JT, 2003. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control*, 14(1): 21-24.

Baysal Z, Uyar F, Aytakin Ç, 2003. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-springwater. *Process Biochemistry*, 38(12): 1665-1668.

Chapla D, Divecha J, Madamwar D, Shah D, 2010. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3): 361-369.

Coulier L, Timmermans J, Bas R, Van Den Dool R, Haaksman I, Klarenbeek B, Slaghek T, Van

Dongen W, 2009. In-depth characterization of prebiotic galacto-oligosaccharides by a combination of analytical techniques. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 57(18): 8488-8495.

Domingues L, Oliveira C, Castro I, Lima N, Teixeira JA, 2004. Production of β -galactosidase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* grown on lactose. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 79(8): 809-815.

Das B, Roy AP, Bhattacharjee S, Chakraborty S, Bhattacharjee C, 2015. Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 121: 244-252.

Finocchiaro T, Olson NF, Richardson T, 1980. Use of immobilized lactase in milk systems. *Advanced in Biochemical Engineering*, 15: 71-88.

Furlan SA, Schneider ALS, Merkle R, Carvalho-Jonas MF, Jonas R, 2000. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 22(7): 589-593.

Geiger B, Nguyena HM, Weniga S, Nguyena HA, Lorenza C, Kittl R, Mathiesend G, Eijsink VGH, Haltricha D, Nguyena TH, 2016. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 116: 45-53

Holker U, Lenz J, 2005. Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages? *Current Opinion Microbiology*, 8(3): 301-306.

Hsu CA, Yu RC, Chou CC, 2005. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *Graduate International Journal of Food Microbiology*, 104(2): 197-206.

Kashyap P, Sabu A, Pandey A, Szakas G, Soccol CR, 2002. Extracellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38(3): 307-312.

Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M, 2007. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1): 150-157.

Kumar CG, Takaki H, 1999. Microbial alkaline proteases: from a bio-industrial point of view. *Biotechnology Advances*, 17(7): 561-594.

Kunamneni A, Permaul K, Singh S, 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 100(2): 168-171.

Latifian M, Hamidi-Esfahani Z, Barzegar M, 2007. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 98(18): 3634-3637.

- Lazim H, Mankai H, Slama N, Barkallah I, Limam F, 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(4): 531-537.
- Liua Y, Chenb Z, Jianga Z, Yanb Q, Yang S, 2017. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 104:1055-1063.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 48: 17-25.
- Manera OP, Ores JC, Ribeiro VA, Burkert CAV, Kalil SJ, 2008. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1): 66-72.
- Mahoney RR, 1998. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63(2): 147-154.
- Mukesh Kumar DJ, Sudha M, Devika S, Balakumaran MD, Ravi Kumar M, Kalachelvan PT, 2012. Production and Optimization of β -galactosidase by *Bacillus* Sp. MPTK 121, Isolated from Dairy Plant Soil. *Annals of Biological Research*, 3(4): 1712-1718.
- Murthy PS, Naidu MM, Srinivas P, 2009. Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(8): 1246-1249.
- Ng IS, Li CW, Chan SP, Chir JL, Chen PT, Tong CG, Yu SM, David Ho TH, 2010. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, 101(4): 1310-1317.
- Nizamuddin S, Sridevi A, Narasimha G, 2008. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 7(8): 1096-1100.
- Nor ZM, Tamer MI, Mehrvar M, Scharer JM, Moo-Young M, Jervis EJ, 2001. Improvement of intracellular β -galactosidase production on fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, 23(11): 845-849.
- Pandey A, 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2-3): 81-84.
- Panesar PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy JF, Kumar H, 2006. Review Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 81(4): 530-543.
- Ramírez Matheus AO, Rivas N, 2003. Production and partial characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(2): 194-201.
- Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, Rastall RA, 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5): 878-887.
- Rhimi M, Boisson A, Dejob M, Boudebouze S, Maguin E, Haser R, Aghajari N, 2010. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a β -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. *Research in Microbiology*, 161(7): 515-525.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A, 2009. A. Recent advances in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1): 13-18
- Vasiljevic T, Jelen P, 2001. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(2): 75-85.
- Vetere A, Paoletti S, 1998. Separation and characterization of three β -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2: 223-231.