

## Utjecaj enzima beta-galaktozidaze na grušanje mlijeka bakterijom *Streptococcus thermophilus*\*

Karmen TORKAR-GODIČ, dipl. biol., dr. Irena ROGELJ, Biotehniška fakulteta, VTOZD za živinorejo, Inštitut za mlekarstvo, Ljubljana

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper

UDK: 579.862.1

Prispjelo: 1. 6. 1990.

### Sažetak

Određivali smo utjecaj enzima beta-galaktozidaze na količinu kiseline, koju su proizvele bakterijske stanice sojeva *Str. thermophilus* izoliranih iz mljekarskih kultura, razgradnjom laktoze, i s tim u vezi njihov utjecaj na brzinu grušanja mlijeka. Rezultati su ukazali na izravnu vezu između tri varijable u uvjetima temperature 42° C, koja se pokazala optimalnom. Spora je varijanta sadržala samo 61% broja jedinica beta-galaktozidaze na bakterijsku stanicu, i samo 54% proizvedene kiseline brze varijante. Vrijeme grušanja spore varijante bilo je dvostruko dulje nego brze.

Riječi natuknice: kultura *Str. thermophilus*, beta-galaktozidaza, razgradnja laktoze, količina kiseline, brzina grušanja mlijeka

### Uvod

Laktoza ili mliječni šećer je najčešći izvor energije za bakterije mliječne kiseline, koje su dobro prilagođene mlijeku kao svojoj sredini.

*Streptococcus thermophilus* čak radije i brže razgrađuje laktozu, nego njene monosaharide glukozu i galaktozu. Od nekih mezofilnih *Streptococcus* vrsta, koje se, kao i *Str. thermophilus*, upotrebljavaju u sastavu mljekarskih kultura ili cjepiva, ta se bakterija razlikuje transportom laktoze u stanicu i njenom razgradnjom. U stanice *Streptococcus* vrste skupine N laktoza se prenosi pomoću fosfoenolpiruvat-fosfattransferaznog sistema (PEPPTS), a istovremeno se i fosforizira. U stanicu bakterije *Str. thermophilus* laktoza putuje kroz staničnu membranu s protonom ili kationom i u stanicu ulazi kao šećer. Taj prijenos pomoću laktoze permeaze ne ovisi o vanjskom izvoru energije, jer se ATP, potreban za nj, tvori na račun pasivne ili izlazne difuzije (Poolman i sur., 1989).

Laktoza koja uđe u bakteriju *Str. thermophilus* hidrolizira se posredstvom enzima beta-galaktozidaze u glukozu i galaktozu. Mišljenja o količini i aktivnosti beta-galaktozidaze u tom mikroorganizmu su različita. Tamime i sur. (1980) misle da *Str. thermophilus* sadrži tri puta više toga enzima nego *Lactobacillus bulgaricus*, s kojim je kombiniran u jogurtnoj kulturi. Hemme

\* Referat održan na 9. jugoslavenskom međunarodnom simpoziju »Suvremena proizvodnja i prerada mlijeka«, Portorož, 1990.

Naslov originala na slovenskom jeziku: »Vpliv encima beta-galaktozidaze na koagulaciju mleka pri bakteriji *Streptococcus thermophilus*.«

Prijevod sa slovenskog na hrvatski jezik: Matej Markeš, dipl. inž.

(cit. Friend i sur., 1983) je zaključio da *Str. thermophilus* sadrži podjednake količine fosfo-beta-galaktozidaze i beta-galaktozidaze. Farrow (cit. Friend i sur., 1983) tvrdi, nasuprot tome, da ta bakterija sadrži znatno više beta-galaktozidaze nego fosfobeta-galaktozidaze.

Optimalna temperatura djelovanja beta-galaktozidaze bakterije *Str. thermophilus* u mlijeku je 49 °C—57 °C, a i Fox (1985) navodi temperaturu 55 °C. Komponente mlijeka stabiliziraju enzimatsku molekulu, molekularne težine 850.000 daltona (Hemme i sur., 1980). Chang je uspio izolirati beta-galaktozidazu iz stanice *Str. thermophilus*, aktivnost koje je bila 592 jedinice ONPG/mg suhe težine stanica pri temperaturi 37 °C. Enzim te bakterije je kodiran s 23 kilobazna para na kromosomu (Hirsh, 1952). Razlika između bakterije *Str. thermophilus* i *N-Streptococcus* skupine je u tome da je sistem za razgradnju laktoze prve namješten na kromosomu, a u *N-Streptococcus* skupini na plazmidu.

Budući da je proteolitička aktivnost bakterije *Str. thermophilus* — po mišljenju mnogih autora (Bracquart i sur., 1989; Tamime i Deeth, 1980) slaba, željeli smo utvrditi koliko količina i aktivnost enzima beta-galaktozidaze utječu na brzinu grušanja mlijeka.

Upotrijebili smo sojeve bakterije *Str. thermophilus* izolirane iz mljekarskih kultura za izradu tvrdog tipa sira. Uspoređivali smo dva soja koja su se međusobno razlikovala brzinom grušanja mlijeka i količinom proizvedene kiseline. Mjerali smo količinu beta-galaktozidaze nakon inkubacije obaju sojeva i već izoliranog enzima u uvjetima različitih temperatura. Tako smo utvrdili podatke o zavisnosti između količine beta-galaktozidaze, količine proizvedene kiseline, brzine grušanja mlijeka pri različitim temperaturama, kao i o temperaturi optimalnoj za djelovanje tog enzima.

## Materijal i metoda rada

### 1. Metodika

- 1.1. Određivanje brzine grušanja pomoću lakmusovog mlijeka (The Oxoid Manual of Culture Media, 1976) i formagrafa (Zannoni i sur., 1981);
- 1.2. Mjerenje titracijske kislosti mlijeka (Soxhlet-Henkel) (Analize mleka, 1981);
- 1.3. Mjerenje količine enzima beta-galaktozidaze (Miller, 1972)

### 2. Sojevi

Sojevi vrste *Streptococcus thermophilus* br. 5 i 17, izolirani su iz mljekarskih kultura za tvrdi tip sira i identificirani standardnim identifikacijskim testovima (Abd-el-Malek i Gibson, 1948; Buchanan i Gibbons, 1974; Hemme i sur., 1980; The Oxoid Manual of Culture Media, 1976).

### 3. Postupak

Na laktoznom gojištu (Metalon i Sandine, 1986) porasle kolonije najcijepili smo u 10% sterilno nemasno mlijeko SNM (The Oxoid Manual of Culture Media, 1976) i inkubirali (temperatura 42 °C) do grušanja. Zgrušano mlijeko smo prenijeli u svježe SNM i lakmusovo mlijeko (1% inokulum), koje smo inkubirali pri temperaturama 30, 37, 42 i 50 °C.

Kao pozitivan rezultat inkubacije lakmusovog mlijeka smatrali smo onaj uzorak koji je bio potpuno zgrušan i promijenio boju od modroljubičaste u žutu. Kao dopunske podatke koristili smo krivulje (formagrame) određene ustanovljivanjem grušanja inokuliranog mlijeka pomoću formagrafa.

Titracijsku kiselost inokuliranog SNM, inkubiranog pri temperaturama 30°, 37°, 42° i 50 ° C mjerili smo nakon 6, 12 i 24 sata. Količinu enzima beta-galaktozidaze mjerili smo pomoću supstrata o-nitrofenil-beta-D-galaktozidaza (ONPG), koji se u prisustvu enzima pretvara u galaktozu i žuto obojeni o-nitrofenol. Intenzitet žute boje mjerili smo spektrofotometrijski pri valnim dužinama 420 i 530 nm, ako je bio ONPG u suvišku, količina nastalog o-nitrofenola bila je srazmjerna količini prisutnog enzima u času reakcije sa supstratom (Miller, 1972).

Određeni broj kolonija, poraslih na laktoznom gojilištu, inkubiranom pri 30°, 37°, 42° i 50 ° C prenijeli smo u Z-pufer (Miller, 1972) i mjerili prisutnost enzima beta-galaktozidaze nakon 20 minuta, te nakon 6 i 24 sata. Da bismo kao konačni rezultat utvrdili broj jedinica enzima na jednu bakterijsku stanicu, primijenili smo ovu formulu.

$$\Delta t \cdot \text{jedinica enzima} = 1000 \cdot \frac{OD_{420} - f \cdot OD_{550}}{t \cdot v \cdot OD_{600}} \text{ gdje je:}$$

OD<sub>420</sub> i OD<sub>550</sub> .... mjerenje reakcijske mješavine

OD<sub>600</sub> .... mjerenje suspenzije prije početka reakcije

t ..... vrijeme inkubacije u minutama

v ..... volumen kulture u ml, upotrijebljen u postupku

f ..... faktor preračunavanja pri različitim optičkim gustoćama

Izvor: Miller, (1972).

### Rezultati i diskusija

Promjene boje lakmusovog mlijeka i formagrami pokazali su da je brzina grušanja mlijeka pri različitim temperaturama inkubacije i obaju sojeva *Str. thermophilus* različita. Tabela 1 pokazuje prosječno trajanje grušanja mlijeka, inokuliranog sojevima br. 5 i 17, pri temperaturama inkubacije 30°, 37°, 42° i 50 ° C. Oba su soja najbrže grušala mlijeko pri temperaturi 42 ° C, i to soj br. 17 već nakon 5,30 sati, dok je soj br. 5. grušao mlijeko pri toj temperaturi nakon 12 sati. Očito je da je soj br. 17 trebao za grušanje manje od polovice vremena koje je za grušanje bilo potrebno soju br. 5. U uvjetima temperature 50 ° C bila su oba soja najsporiya, jer su za grušanje trebali 18 sati (soj br. 17), odnosno 24 sata (soj br. 5). Temperatura 42 ° C je bila optimalna za aktivnost obaju sojeva.

Najviše jedinica enzima beta-galaktozidaze bilo je izmjereno pri soju br 17 (brza varijanta), inkubiranom pri temperaturi 42°C. Rezultat 60,60 jedinica enzima na stanicu bio je određen nakon 20 minuta pokusa. U tom času se najbolje razvije žuta boja o-nitrofenola, nastalog u reakciji između beta-galaktozidaze i ONPG. Tada, naime, reagiraju sve molekule beta-galaktozidaze koje

**Tabela 1. Prosječno trajanje grušanja mlijeka, inokuliranog sojevima br. 5 i 17 *Str. thermophilus* pri temperaturama inkubacije 30°, 37°, 42° i 50°****Table 1. Average coagulation time of milk, inoculated with *Str. thermophilus* strains no. 5 and 17, at incubation temperatures 30, 37, 42 and 50°C**

Sojevi Strains	Temperature inkubacije (°C) Incubation temperatures (°C)			
	30	37	42	50
Trajanje koagulacije mlijeka (h) Coagulation time of milk (h)				
Str. th. 5	24	15	12	24
Str. th. 17	15	10	5,30	18

**Tabela 2. Stupnjevi kiselosti mlijeka (°SH), inokuliranog sojem br. 5, pri različitim temperaturama i trajanju inkubacije****Table 2. Degrees of titrimetric acidity of milk (°SH), inoculated with the strain no. 5 at different temperatures and incubation times**

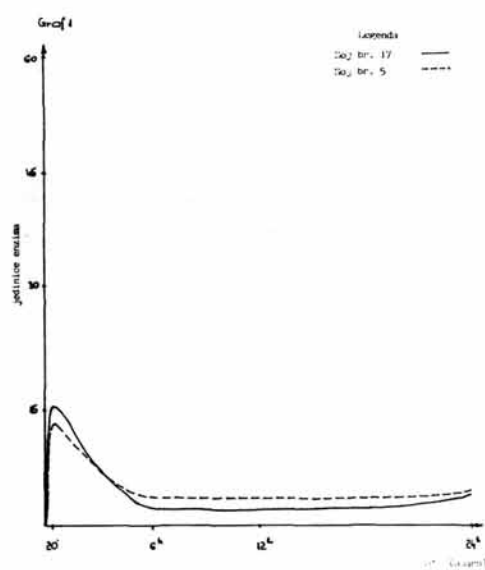
Temperatura inkubacije Incubation temperature	Trajanje inkubacije (h) Incubation time (h)			
	0	6	12	24
Stupnjevi kiselosti — Degrees of acidity (°SH)				
30°C	6,61	7,38	8,55	20,21
37°C	6,61	7,77	12,05	17,88
42°C	6,61	9,72	15,55	19,44
50°C	6,61	8,16	11,27	13,22

**Tabela 3. Stupnjevi kiselosti mlijeka (°SH), inokuliranog sojem br. 17, pri različitim temperaturama i trajanju inkubacije****Table 3. Degrees of acidity of milk (°SH), inoculated with the strain no. 17 at different temperatures and incubation times**

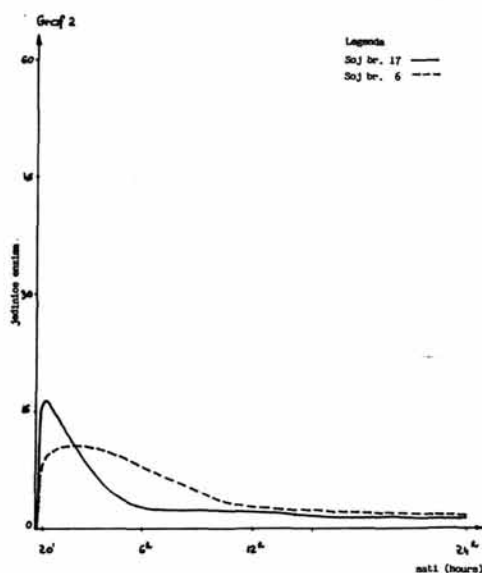
Temperatura inkubacije Incubation temperature	Trajanje inkubacije (h) Incubation time (h)			
	0	6	12	24
Stupnjevi kiselosti — Degrees of acidity (°SH)				
30°C	6,81	12,44	15,94	23,33
37°C	6,81	17,49	21,38	33,04
42°C	6,81	20,60	21,77	35,38
50°C	6,81	17,10	15,55	16,72

Grafikoni 1, 2, 3, 4. Količina aktivne beta-galaktozidaze po stanici nakon 24-satne inkubacije sojevima br. 5 i 17, pri temperaturama 30 ° C (graf. 1); 37 ° C (graf. 2); 42 ° C (graf. 3) i 50 ° C (graf. 4)

Graphs 1, 2, 3, 4. Quantity of active beta-galactosidase in bacterial cell, after 24 hours incubation using strains no 5 and 17 temperatures being 30 ° C (graph. 1); 37 ° C (graph. 2); 42 ° C (graph. 3) and 50 ° C (graph. 4)

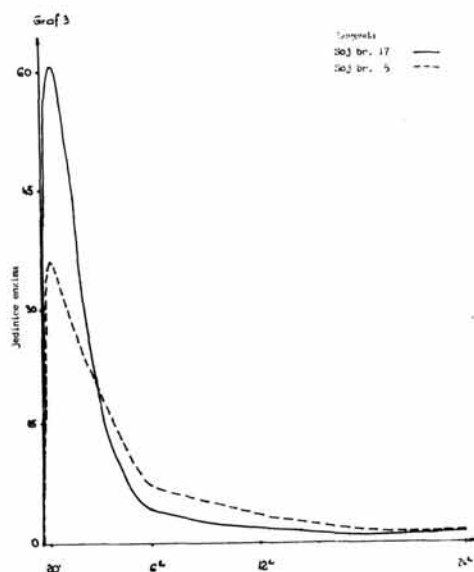


Grafikon 1.

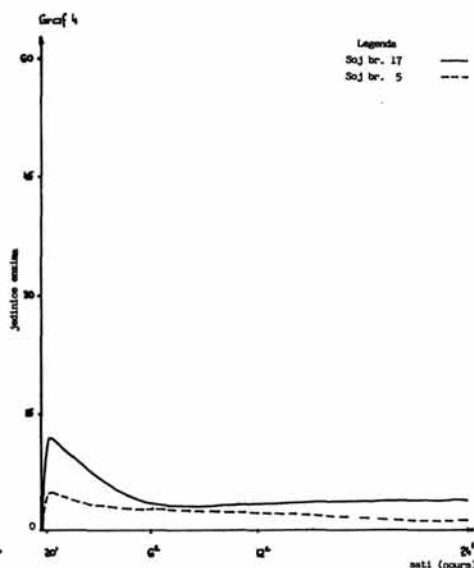


Grafikon 2.

su oslobođene iz bakterijskih stanica. Daljnjom inkubacijom broj aktivnih jedinica enzima opada. Vrijeme cijepanja beta-galaktozidaze u puferu znatno je kraće nego u mlijeku, jer ga tu stabiliziraju mliječne bjelančevine i soli. Za soj br. 5 (spora varijanta) nakon istog inkubacijskog vremena od 20 minuta bilo je izmjereno samo 36,98 enzimatskih jedinica po stanici, što predstavlja 61% vrijednosti brze varijante br. 17. Pri temperaturi 37 ° C je odnos količina beta-galaktozidaze opet približno 2:1 u korist soja br. 17.



Grafikon 3.



Grafikon 4.

### Zaključak

Brza varijanta soja *Str. thermophilus* proizvede pri temperaturi 42°C, optimalnoj za proučavane sojeve bakterije, dvostruko veću količinu kiseline. sadrži dvostruko više enzima beta-galaktozidaze i treba za grušanje polovicu manje vremena nego spora varijanta. Stoga se za tu bakteriju lako može ustanoviti zavisnost između količine beta-galaktozidaze, količine proizvedene kiseline i brzine grušanja mlijeka.

Brze varijante *Str. thermophilus* bi, prema tome, bile uspješnije i u proizvodnji tvrdih sireva i jogurta od sporih. Zato bi ubuduće valjalo posvetiti veću pozornost selekciji sojeva *Str. thermophilus*, kao i ostalih mikroorganizama koji se upotrebljavaju u mljekarskim čistim kulturama. I na taj bismo način poboljšali kvalitetu fermentiranih mliječnih proizvoda te doprinijeli sigurnosti proizvodnje.

**THE INFLUENCE OF THE BETA-GALAKTOSIDASE ENZYME ON MILK  
COAGULATION USING STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS**

**Summary**

*Study relative to strains of bacterium *St. thermophilus* isolated from dairy starter cultures, the effect of a certain quantity of beta-galactosidase enzyme on content of acid formed by bacterial cells in the course of lactose disintegration and the speed of milk coagulation was undertaken. The results indicate immediate connection between three mentioned variables. The temperature of 42° C proved to be optimal, and under such condition only 61% of the number of beta-galactosidase units per bacterial cell were determined and only 54% acid was produced using slow variant in comparison with the fast one. The length of milk coagulation was twice as long using slow variant instead of the fast one.*

*Additional inext words: *Str. thermophilus* starter culture, beta-galactosidase, breaking up of lactose, amount of acid, length of milk coagulation.*

**Literatura**

- ABD-EL-MALEK, Y., GIBSON, T. (1948): Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *J. Dairy Res.* **15**, 233-248.
- ANALIZE MLEKA (NAVODILA ZA VAJE): Za slušatelje VTO živilske tehnologije in VTO živinoreje. Biotehniška fakulteta, VTOZD za živinorejo. Institut za mlekarstvo, Ljubljana 1. 10. 1981, 17—20.
- BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E. (ed.) (1974): *BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology*, 8<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- CERNING, J., BOUILLANNE, C., DESMAZEAUD, M. J., LANDON, M. (1988): Exocelular polysaccharide production by *Str. thermophilus*. *Biotechnology Letters*, **10** (4), 255-260.
- BRACQUART, P., DEAUT, J. Y., LINDEN, G., (1989): Uptake of glutamic acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ONRZ 302. *J. Dairy Res.*, **56**, 107—106.
- FRIEND, B. A., FIEDLER, J. M., SHANANI, K. M., (1983): Influence of culture selection on the flavour, antimicrobiactivity, beta-galactosidase and B vitamins of jogurt. *Milchwissenschaft*, **38** (3), 133—136.
- FOX, P. F., (1985): *Developments in Dairy Chemistry — 3. Lactose and Minor Constituents*. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, 35—142.
- GREENBERG, N. A., WILDER, T., MAHONEY, R. R. (1985): Studies on the thermostability of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey. *J. Dairy Res.*, **52** 439—449.
- HEMME, D., NARDI, M., JETTE, D., (1980): Beta-galactosidases et phosphobeta-galactidases de *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, **60** 595—618.
- HIRSH, A. (1952): The evolution of lactic streptococci. *J. Dairy Res.*, **19**, 290—293.
- MATALON, M. E., SANDINE, W. E., (1986): Improved Media for Differentiation of Rods and Cocci in Yoghurt. *J. Dairy Sci.*, **69** 2569—2576
- MILLER, J. H., (1972): *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, 48—54, 121—143.

- THE OXOID MANUAL OF CULTURE MEDIA, ingredient and other laboratory services 3rd (1976): Published by OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG 24 OPW, 101, 111, 235.
- POOLMAN, B., ROYER, T. J., MAINZER, S. E., SCHMIDT, B. F. (1989): Lactose Transport System of *Str. thermophilus*: a Hybrid protein with Homology to the Melibiose Carrier and Enzyme III of Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase Systems. *J. of Bacteriology*, 171, (1), 244—253.
- TAMIME, A. Y., DEETH, H. C., (1980): *J. Food Prot.* 43, 939, v:
- TAMIME, A. Y., ROBINSON, R. K., (eds.): *Yoghurt, Science and Technology*, Pergamon Press. Oxford, New York, 1985.
- ZANNONI, M., MONGARDI, M., ANNIBALDI, S., (1981): Standardization of the renneting Ability of Milk by Formagraph. Note II: Data Processing *Scienza a tecnica Lattiero-Casearia*, 32, (39), 153—164.