



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 01.08.72 (P. 157 057)

Pierwszeństwo: 30.03.72 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 15.11.73

Opis patentowy opublikowano: 20.06.1977

MKP C12d 13/10

Int. Cl.² C12D 13/10



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Agency of Industrial Science and Technology,
Tokio (Japonia)

Sposób wytwarzania α -galaktozydazy

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania α -galaktozydazy.

α -galaktozydaza jest powszechnie znanym enzymem zdolnym do rozkładania rafinozy zawartej w melasie buraczanej lub soku buraczanym, zwanych dalej „melasą buraczaną”, na sacharozę i galaktozę. Wiadomo też, że enzym ten jest wytwarzany przez kilka rodzajów mikroorganizmów, takich jak np. *Aerobacter aerogens* i *E. coli*. Kiedy jednak melasę buraczaną poddaje się działaniu tak otrzymanego enzymu, występująca obok α -galaktozydazy inwertaza posiadająca dużą aktywność, powoduje że rozkładowi ulega nie tylko rafinoza, ale także zawarta w melasie sacharoza. Z tego powodu, enzym ten nie znalazł dotychczas praktycznego zastosowania.

Obecnie wyodrębniono pleśń *Mortierella vinacea* (ATCC 20034), która na pożywce zawierającej rafinozę pozwala na otrzymanie enzymu o dużej aktywności α -galaktozydazy o bardzo słabej aktywności inwertazy. Przy pomocy tak otrzymanego enzymu, udało się rozłożyć rafinozę w melasie buraczanej w celu zwiększenia wydajności sacharozy.

Jednakże, przy tego rodzaju zastosowaniu enzymu stopień rozkładu rafinozy przez α -galaktozydazę zależy bezpośrednio od liczby stopni Brixa użytej melasy, zmniejszając się wraz ze wzrostem tej liczby. W przypadku melasy o dużej liczbie stopni Brixa, należy więc zwiększyć stopień roz-

2

kładu przez zwiększenie ilości dodanego enzymu. Przy produkcji cukru z buraka cukrowego, prócz procesu otrzymywania cukrzanów, pożądana jest melasa o dużej liczbie stopni Brixa, co ułatwia przeprowadzanie takich operacji jak następujące po rozłożeniu rafinozy zateżnianie roztworu cukru oraz wydzielanie czystego cukru ze stężonego roztworu. Zapewnienie wysokiego i stałego stopnia rozkładu rafinozy wymaga dużych ilości enzymu, co zwiększa koszt procesu i czyni go nieopłacalnym. Ponadto, dodatek dużej ilości enzymu stwarza możliwość przedostania się grzybni do roztworu cukru otrzymanego po zakończeniu rozkładu, co mogłoby hamować krystalizację sacharozy.

Pomimo że enzym wytworzony przez wspomnianą pleśń posiada rzeczywiście bardzo małą aktywność inwertazy, to jednak, jeżeli zastosuje się go w tak dużej ilości, ilość sacharozy rozłożonej przez zawartą w enzymie inwertazę przekroczy dopuszczalny poziom.

Wynalazek ma na celu usunięcie wymienionych braków, a więc otrzymywanie z hodowli mikroorganizmu preparatu enzymatycznego o bardzo wysokiej aktywności α -galaktozydazy i wybitnie słabej aktywności inwertazy w przeliczeniu na jednostkę wagi preparatu, rozkład rafinozy zawartej w melasie buraczanej na galaktozę i sacharozę za pomocą tego preparatu oraz zwiększenie wydajności sacharozy.

Obecnie opracowano sposób wytwarzania preparatu enzymatycznego o dużej aktywności α -galaktozydazy i bardzo słabej aktywności inwertazy, polegający na tym, że pleśń rodzaju *Absidia* hoduje się na specjalnej pożywce w ściśle określonych warunkach.

Do tego celu zastosowano odmiany pleśni rodzaju *Absidia*. Odmiany te nie były dotąd znane jako źródło preparatów enzymatycznych bogatych w α -galaktozydazę a ubogich w inwertazę. Ich nazwy naukowe wraz z nazwiskami odkrywców są następujące: *Absidia lichteimi* (Lucet et Constantin) Lendner (IFO 4009); *Absidia lichteimi* (Lucet et Constantin) Lendner (IFO 4010); *Absidia reflexa* van Tieghem (IFO 5874); *Absidia hyalospora* (Saito) Lendner (IFO 8082); *Absidia ramosa* (Vuillemin) Lendner (IFO 8083); *Absidia regnierie* (Lucet et Constantin) Lendner (IFO 8084).

(„IFO” jest skrótem nazwy spółki o następującym adresie: Institute for Fermentation, Osaka, 54, 4 chome, Jusoo Nishinomachi, Higashi — Yodogawa-ku, Osaka, Japan)

Jeżeli pleśń rodzaju *Absidia* hoduje się na pożywce zawierającej co najmniej jeden z takich induktorów jak laktoza, melibioza, rafinoza czy galaktoza, wobec substancji dostarczających węgiel, azot i sole mineralne, to pożądany preparat enzymatyczny tworzy się z dobrą wydajnością głównie w grzybni mikroorganizmu. Induktor dodaje się zwykle w ilości od 0,5% do 1,5% wagowych pożywki. Przy podawaniu większej ilości niż 1,5% czas hodowli wydłuża się, a metoda staje się nieekonomiczna.

Jako substancję dostarczającą węgiel stosuje się zwykle glukozę. Rolę źródła węgla do wzrostu grzybni może spełniać także induktor, korzystnie jest jednak dodawać do pożywki osobno substancję będącą źródłem tego pierwiastka. Jako źródła azotu stosuje się substancje organiczne takie jak wyciąg namoku kukurydzy, słód, wyciąg słodowy, kielki słodowe, wyciąg z drożdży, pepton, wyciąg z otrębów ryżowych, miążga ryb i kukurydza, oraz substancje pochodzenia nieorganicznego.

Na wzrost grzybni korzystnie wpływa jednocześnie stosowanie obu rodzajów substancji. Najłatwiejszy w użyciu, z uwagi na płynność, jest wyciąg namoku kukurydzy. Korzystnymi substancjami mineralnymi okazały się tu stosowane zwykle do tego celu sole w rodzaju siarczanu magnezowego, fosforanu potasowego i chlorku sodowego. Prócz wymienionych składników, do pożywki można dodać w razie potrzeby biotynę lub inną, odpowiednią substancję przyspieszającą wzrost. Dodawanie tego rodzaju składnika do pożywek zawierających azot pochodzenia organicznego nie jest konieczne. Dobrą wydajność α -galaktozydazy, oraz szybki wzrost grzybni zapewnia utrzymanie pH pożywki w zakresie od 4 do 8, szczególnie od 5 do 7. Temperatura i czas hodowli zależą w pewnym stopniu od rodzaju mikroorganizmu oraz od składu pożywki. Dla hodowli na wstrząsarce wystarczy zwykle czas od 40 do 60 godzin w temperaturze 30°C. W porównaniu z hodowlą *Mortierella vinacea*, która wymaga okresu

72 godzin mamy tu do czynienia ze znacznym skróceniem czasu hodowli.

Po zakończeniu okresu wzrostu hodowli w podanych wyżej warunkach, grzybnię odsącza się w znany sposób, przemywa wodą i przerabia dalej metodą rozdrabniania lub autolizy. Enzym wyekstrahowany z grzybni można następnie przygotować w pożądanej formie preparatu enzymatycznego.

Odsączoną grzybnię lub otrzymany z niej preparat enzymatyczny można dodawać wprost do melasy buraczanej powodując rozkład zawartej w niej rafinozy. Można też odsączoną grzybnię umieścić w kolumnie, przez którą przepuszcza się następnie melasę w sposób ciągły.

Duża aktywność enzymu na jednostkę wagi zapewnia dobry rozkład rafinozy nawet w przypadku melasy o 50° Brix. Pozwala to na stosowanie nie rozcieńczonej melasy pochodzącej wprost z procesu cukrowniczego, którą po rozłożeniu rafinozy można zawrócić do tego procesu prawie bez zateżnienia. Metoda ta jest zatem bardzo ekonomiczna.

Temperatura rozkładu zawartej w melasie rafinozy wynosi od 20 do 70°C, najlepiej od 30° do 60°C. Wartość pH melasy waha się od 4 do 7, najkorzystniej od 5 do 6.

W tabeli porównano własności preparatu enzymatycznego otrzymanego z pleśni rodzaju *Absidia* z własnościami preparatu otrzymanego z wcześniej proponowanej pleśni *Mortierella*.

Z tabeli 1 wynika, że do rozłożenia 3,86 g rafinozy w melasie o 20° Brix potrzeba około 1.150×10^4 jednostek α -galaktozydazy. Aktywność α -galaktozydazy pochodzącej z pleśni rodzaju *Mortierella vinacea* (odmiana zużywająca rafinozę) wynosi 207×10^4 jednostek, zatem w tym przypadku do melasy trzeba dodać 5,6 g grzybni (w przeliczeniu na suchą masę). Ponieważ aktywność α -galaktozydazy otrzymanej sposobem według wynalazku wynosi 446×10^4 jednostek, zatem, w opisanym wyżej przypadku wystarczy zastosować 2,6 g grzybni. Różnica w ilości użytej grzybni, staje się coraz bardziej widoczna w miarę wzrostu liczby stopni Brix. Przy 60° Brix różnica ta wynosi 9 g.

Sposób według wynalazku pozwala na otrzymanie znacznie większej niż poprzednio aktywności α -galaktozydazy na jednostkę wagi grzybni, a zatem prowadzi do odpowiedniego zmniejszenia zużycia tego enzymu. Sposób ten, jest zatem nie tylko ekonomiczny, ale także ułatwia dalszy przerób roztworu po rozłożeniu rafinozy i pozwala na zmniejszenie objętości aparatury.

Zaletę sposobu według wynalazku stanowi także krótszy czas hodowli mikroorganizmu wytwarzającego α -galaktozydazę w porównaniu z czasem hodowli znanych dotąd tego rodzajów mikroorganizmów.

Niżej podane przykłady wyjaśniają sposób według wynalazku nie ograniczając jego zakresu.

Przykład I. Do różnych porcji pożywki podstawowej zawierającej 1% glukozy, 1% wyciągu namoku kukurydzy, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% KH_2PO_4 , 0,2% MgSO_4 , 0,2% NaCl i 0,3% CaCO_3 dodaje się

Tabela 1

	Mortierella vinacea odmiana zużywająca rafinozę	Absidia reflexa IFO 5874
Aktywność α -galaktozydazy/g suchej grzybni	207×10^4 (jednostek)	446×10^4 (jednostek)
Aktywność inwertazy/g suchej grzybni	15,000 (jednostek)	6,538 (jednostek)
Waga suchej grzybni zawierającej 100×10^4 α -galaktozydazy	483 (mg)	224 (mg)
	Waga grzybni potrzebnej do rozłożenia rafinozy w me- lasie Mortierella vinacea od- miana zużywająca rafinozę (g)	Absidia reflexa (g)
Brix 20° (zawierająca 3.26 g rafinozy)	5.6	2.6
Brix 30° (zawierająca 5.8 g rafinozy)	8.4	3.9
Brix 40° (zawierająca 7.74 g rafinozy)	11.2	5.2
Brix 50° (zawierająca 9.66 g rafinozy)	14.0	6.5
Brix 60° (zawierająca 11.6 g rafinozy)	16.8	7.8

po 1% sacharydów wymienionych w tablicy 2. Tak otrzymaną pożywkę zaszczepia się zarodnikami Absidia reflexa (IFO 5874) i prowadzi hodowlę w temperaturze 30°C w ciągu 72 godzin na wytrząsarce o 140 obrotach/minutę. Po zakończeniu hodowli roztwory odsącza się w celu oddzielenia grzybni, którą przemywa się dokładnie wodą. Oddzieloną grzybnę rozciera się na pastę w moździerzu z dodatkiem piasku morskiego i zawiesza w wodzie destylowanej, której objętość odpowiada objętości roztworu po odsączeniu grzybni. W zawieszynie, traktowanej jako roztwór enzymu, oznacza się aktywność α -galaktozydazy.

Wartości podane w tabeli 2 odpowiadają aktywności enzymu z grzybni otrzymanej z 1 ml pożywki. Aktywność enzymu w zawieszynie grzybni oznacza się dodając 1 ml tej zawieszyny do mieszaniny 0,5 ml 0,06 M roztworu melibiozy i 0,5 ml 0,1 M roztworu buforu fosforanowego (pH 5,2), pozostawiając mieszaninę reakcyjną na 2 godziny w temperaturze 40°C, ogrzewając ją następnie na łaźni wodnej w ciągu 5 minut w celu dezaktywacji enzymu, dodając do tak otrzymanego roztworu 1 ml 1,8% $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ i 1 ml 2% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w celu usunięcia białka, odwirowując ten roztwór i oznaczając w nim zawartość glukozy metodą glukostatyczną. Ponieważ ilość glukozy uwolnionej z melibiozy oraz stężenie enzymu są do siebie proporcjonalne w zakresie 1000 g glukozy, zawieszinę rozcieńcza się uprzednio w takim stopniu, aby mierzona wielkość znajdowała się w wymienionym zakresie. Ilość wolnej glukozy mnoży się przez ilość rozcieńczeń. Jako jednostkę przyjęto aktywność α -galaktozydazy uwalniającą 1 g glukozy w podanych wyżej warunkach.

Dane przytoczone w tabeli wskazują wyraźnie na to, że do wytwarzania α -galaktozydazy nadają się najlepiej galaktoza, melibioza, rafinoza i laktoza, przy czym najlepsze wyniki osiągnięto przy użyciu laktozy.

Tabela 2

Węglowodan	Jednostki galaktozydazy
Ksyloza	0
Arabinoza	0
Ramnoza	0
Glukoza	0
Mannoza	0
Fruktoza	0
Galaktoza	14,900
Maltoza	0
Cellobioza	0
Laktoza	53,800
Melibioza	14,340
Sacharoza	0
Rafinoza	37,240
Rozpuszczalna skrobia	0
Dekstran	0

Przykład II. Różne porcje pożywki zawierającej 1% laktozy, 1% glukozy, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% namoku kukurydzy, 0,3% KH_2PO_4 , 0,2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% NaCl i 0,3% CaCO_3 zaszczepia się zarodnikami odmian wymienionych w tabeli 3 i przeprowadza hodowlę według przykładu I. W otrzymanych roztworach oznacza się aktywność α -galaktozydazy oraz inwertazy wytworzonych przez grzybnie. Aktywność inwertazy oznacza się przez zmieszanie 1 ml zawieszyny grzybni z 0,5 ml 0,06 M roztworu sacharozy i 0,5 ml 0,1 M roztworu buforu fosforanowego (pH 5,0), pozostawienie mieszaniny reakcyjnej na 2 godziny w warunkach opisanych przy oznaczaniu aktywności α -galaktozydazy, odwirowanie roztworu w celu usunięcia białek i oznaczenie ilości zwinwertowanego cukru metodą Samogy Nelson. Jako jednostkę przyjęto aktywność inwertazy wytwarzają-

Tabela 3

Odmiana	Sucha grzyb- nia w 100 ml (g)	Jednostki α -galaktozy- dazy	α -galaktozy- daza/g suchej grzybni (jed- nostki)	Jednostki inwertazy	Inwertaza/ /suchej grzybni
<i>Absidia reflexa</i> (IFO 5874)	1.3	58,000	446×10^4	85	6,538
<i>Absidia regnierie</i> (IFO 8084)	1.3	52,000	400×10^4	84	6,461
<i>Absidia hyalospora</i> (IFO 8082)	1.35	65,000	481×10^4	87	6,444
<i>Absidia lichtheimi</i> (IFO 4010)	1.40	79,000	564×10^4	92	6,571
<i>Absidia lichtheimi</i> (IFO 4009)	1.40	72,000	514×10^4	90	6,428
<i>Absidia ramosa</i> (IFO 8083)	1.30	39,000	300×10^4	84	6,462
<i>Mortierella vinacea</i> var. <i>raffinose utilizer</i> (ATCC 20034)	1.40	29,000	207×10^4	210	15,000

cej 1 g zinwertowanego cukru w podanych wyżej warunkach.

Wyniki przytoczono w tabeli 3. Podane w tej tabeli aktywność inwertazy odnosi się do aktywności enzymu z grzybni otrzymanej z 1 ml pożywki.

Wagę suchej grzybni oznacza się susząc w 105°C tę ilość grzybni, która wyrosła w 100 ml pożywki i ważąc tak otrzymaną suchą masę. Aktywność α -galaktozydazy w przeliczeniu na g suchej grzybni podano w tabeli 3 w rubryce „ α -galaktozydaza/g suchej grzybni”. Podobnie, aktywność inwertazy podano w rubryce „inwertaza/g suchej grzybni”.

Dla porównania, przeprowadzono analizę roztworu z analogicznej hodowli zarodników *Mortierella vinacea*. Wyniki tej analizy podano w tabeli 3. Z danych przytoczonych w tej tabeli wynika wyraźnie, że w przypadku odmian rodzaju *Absidia* mamy do czynienia z dużymi aktywnościami α -galaktozydazy i małymi wartościami aktywności inwertazy. Ponadto, aktywność α -galaktozydazy z 1 g grzybni była wyższa, a aktywność inwertazy niższa dla odmian rodzaju *Absidia*, w porównaniu z rodzajem *Mortierella vinacea*.

Przykład III. W 10 litrach wody rozpuszcza się 120 g laktozy, 120 g glukozy, 120 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 g wyciągu namoku kukurydzy, 36 g KH_2PO_4 , 24 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24 g NaCl i 36 g CaCO_3 . Roztwór umieszcza się w naczyniu fermentacyjnym, poddaje sterylizacji w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut, oziębia do temperatury 30°C i rozcieńcza wyjałowioną wodą destylowaną do objętości 12 litrów. W roztworze tym przeprowadza się hodowlę odmiany *Absidia reflexa* IFO 5874 wytrząsając z częstotliwością 30 obrotów/minutę,

i napowietrzając z szybkością 3 l/minutę. Po upływie wymienionych w tablicy odstępów czasu pobiera się próbki roztworu i oznacza aktywność zawartej w nich α -galaktozydazy, a także pH próbki. Wyniki podano w tabeli 4.

Tabela 4

Czas hodowli (godz.)	pH hodowli	Jednostki α -galaktozydazy
0	6.1	0
20	6.1	9,800
24	6.6	19,900
28	6.3	31,200
32	6.1	45,600
36	5.8	54,500
40	5.8	59,300
42	5.8	62,700
44	5.8	63,000

Z przytoczonych danych wynika, że 42 godziny są wystarczającym czasem hodowli dla odmiany *Absidia reflexa* IFO 5874. Po upływie tego czasu waga suchej grzybni otrzymanej ze 100 ml pożywki wynosi 1.30 g.

Przykład IV. Hodowlę odmiany *Absidia hyalospora* IFO 8082 przeprowadza się według przykładu III. Oznaczono zależność pomiędzy długością czasu hodowli a ilością α -galaktozydazy. Wyniki podano w tabeli 5.

Przytoczone w tabeli dane wskazują na to, że dla tej odmiany dostatecznie długi czas hodowli wynosi 54 godziny. Po upływie tego czasu waga

Tabela 5

Czas hodowli (godz.)	pH hodowli	Jednostki α -galaktozydazy
0	5.9	0
6	5.8	0
12	5.85	0
18	5.50	0
24	5.20	134
30	6.40	1.240
36	6.50	4.030
42	6.60	19.360
48	6.00	51.360
54	5.50	68.500
57	5.50	69.000

suchej grzybni otrzymanej ze 100 ml pożywki wynosiła 1.35 g.

Przykład V. Melasę z procesu Steffena rozcieńcza się wodą do 30° Brixu a pH roztworu doprowadza za pomocą kwasu siarkowego do wartości 5.2, 200 g tego roztworu (zawierającego 5.8 g rafinozy) poddaje się działaniu grzybni *Absidia reflexa* IFO 5874 (3.9 g suchej masy i 17.400.000 jednostek α -galaktozydazy) otrzymaną według przykładu II. Mieszaninę wstrząsa się przez 2 godziny 30 minut w temperaturze 50°C, następnie grzybnię odsacza się i przemywa wodą. Przesącz i wodę z przemywania łączy się. Ilość pozostałej w otrzymanej mieszaninie rafinozy oraz zwiększoną zawartość sacharozy oznaczono metodą chromatografii cienkowarstwowej. Chromatogram rozwijało za pomocą roztworu zawierającego 6 części n-butanolu, 4 części pirydyny i 3 części wody. Frakcje rafinozy i sacharozy wycięto i ekstrahowano wodą a ekstrakty analizowano metodą cysteinowo-karbazolową. Stwierdzono, że 78% rafinozy początkowo zawartej w roztworze uległo rozkładowi a ilość sacharozy wzrosła o 2.41 g.

Przykład VI. 200 g melasy o 30° Brixu otrzymanej według przykładu V poddaje się działaniu grzybni *Absidia reflexa* IFO 5874 (zawierającej 17.400.000 jednostek α -galaktozydazy) według przykładu V. Po zakończeniu reakcji przemyto wodą grzybnię dodaje się do nowej porcji rozcieńczonej melasy i postępuje jak w przykładzie V. W ten sposób grzybnię używa się pięciokrotnie. W otrzymanych po reakcji roztworach oznacza się pozostałą rafinozę oraz przyrost zawartości sacharozy. Wyniki przytoczono w tabeli 6.

Przykład VII. Melasę z procesu Steffena rozcieńczono do 50° Brixu a pH roztworu doprowadzono do wartości 5.2 za pomocą kwasu siarkowego. 200 g tego roztworu (zawierającego 9.66 g rafinozy) poddano działaniu otrzymanej według przykładu 2 grzybni *Absidia reflexa* IFO 5874 (zawierającej 6,5 g suchej masy i 28.980.000 jednostek α -galaktozydazy) przy temperaturze 50°C w ciągu 2,5 godzin. Po zakończeniu reakcji, w roztworze oznaczono stopień rozkładu rafinozy oraz przyrost zawartości sacharozy. Stwierdzono, że stopień rozkładu rafinozy wynosił 56,2% a odpo-

Tabela 6

Po szarzy No	Wzrost zawartości sacharozy (g)	Rozkład rafinozy (%)	Pozostała aktywność α -galaktozydazy (%)
1	2.45	78.5	90
2	2.58	79.0	88
3	2.41	77.8	86
4	2.37	76.0	86
5	2.41	75.1	84

wiadający mu przyrost zawartości sacharozy 3.03 g.

Przykład VIII. Reakcję z udziałem grzybni *Absidia Reflexa* IFO 5874 (zawierającej 1.734 g suchej masy i 7.740.000 jednostek α -galaktozydazy) i 100 ml melasy (zawierającej 3,87 g rafinozy) o 50° Brixu prowadzono w temperaturze 50°C w ciągu 10 godzin. Po upływie tego czasu usuwa się grzybnię, otrzymany roztwór rozcieńcza się wodą do objętości 1000 razy większej od początkowej i oznacza gęstość optyczną tego roztworu przy długościach fal 280 m i 260 m. W oddzielnej próbie, tę samą melasę, w takich samych warunkach poddaje się działaniu grzybni *Mortierella vinacea* (zawierającej 3.730 g suchej masy i 7.740.000 jednostek α -galaktozydazy) i oznacza gęstość optyczną otrzymanego roztworu przy 280 m i 260 m. Dla porównania oznacza się też gęstość optyczną wyjściowej melasy. Wyniki podano w tabeli 7.

Tabela 7

	Melasa wyjściowa	Mortierella vinacea	Absidia reflexa IFO 5874
Gęstość optyczna przy 260 m	0.414	0.515	0.430
Gęstość optyczna przy 280 m	0.302	0.348	0.310

Z tabeli wynika, że przy użyciu dwóch rodzajów grzybni o tej samej aktywności α -galaktozydazy, ilość mieszaniny poreakcyjnej wydzielonej po usunięciu grzybni była mniejsza w przypadku *Absidia reflexa* IFO 5874.

Przykład IX. 200 gramowe porcje soku buraczanego (zawierające po 5,8 g rafinozy) rozcieńczonego do 30° Brixu i zakwaszonego do pH 5.2 poddaje się działaniu grzybni *Absidia reflexa* IFO 5874 (zawierającej 17.400.000 jednostek α -galaktozydazy) w ciągu 3 godzin w temperaturze podanej w tablicy 8. Po zakończeniu każdej reakcji oznacza się stopień rozkładu rafinozy. Wyniki podano w tabeli 8.

Z tabeli wynika, że przy wzroście temperatury powyżej 30° stopień rozkładu rafinozy znacznie wzrasta, a po przekroczeniu 70° zmniejsza się wyraźnie na skutek dezaktywacji enzymu.

Przykład X. Porcje soku buraczanego, roz-

11

Tabela 8

Temperatura reakcji (°C)	Stopień rozkładu rafinozy (%)
20	43.1
30	75.7
40	78.5
50	80.2
60	79.0
70	55.6

12

Tabela 9

pH	Stopień rozkładu rafinozy (%)
3	11.5
4	68.2
5	80.2
6	77.4
7	39.2
8	19.0

cieńczonego do 30° Brix za pomocą buforu McIlvaime'a o wartościach pH przytoczonych w tabeli 6, poddaje się działaniu grzybni Absidia
reflexa IFO 5874 (zawierającej 17.400.000 jedno-
stek α -galaktozydazy) w temperaturze 50°C, w
ciągu 3 godzin. Po upływie tego czasu oznacza
się stopień rozkładu rafinozy.

Z tabeli wynika, że najlepsze wyniki otrzymuje
się przy pH w zakresie 4 do 8.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania α -galaktozydazy **znamienny**
tym, że pleśń rodzaju Absidia hodzi się na po-
żywcę zawierającej przynajmniej jeden z takich
składników jak laktoza, melibioza, rafinoza i ga-
laktoza, w ilości 0,5% do 1,5% wagowych.