



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 27.03.1968 (P. 126050)

Pierwszeństwo: 05.04.1967 Japonia

Zgłoszenie ogłoszono: 26.02.1973

Opis patentowy opublikowano: 31.10.1975

Kl. 12o,6

MKP C07c 47/18

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Hideo Suzuki, Yoshiko Ozawa, Osamu Tanabe

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

Sposób rozkładu rafinozy przy pomocy α -galaktozydazy

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób rozkładu rafinozy na galaktozę i sacharozę przy pomocy α -galaktozydazy.

Ogólnie znane jest, że rafinoza hamuje proces krystalizacji sacharozy.

Odrzucana dotychczas melasa, otrzymana po odzyskaniu sacharozy z buraków cukrowych, mimo faktu, że około 50% sacharozy pozostawało nadal w melasie, była stosowana jako surowiec do fermentacji alkoholowej lub jako karma. Przyczyną, dla której sacharoza, pozostająca w melasie, nie może być odzyskana w przystępny sposób jest fakt, że rafinoza obecna w melasie przeszkadza normalnej krystalizacji sacharozy. Hydroliza rafinozy w melasie przy użyciu α -G umożliwia usunięcie działania rafinozy, wstrzymującego krystalizację cukru, co powoduje wzrost wydajności cukru buraczanego. Ponadto ponieważ α -G rozkłada rafinozę na sacharozę i galaktozę, około 2/3 rozłożonej rafinozy odzyskuje się w postaci sacharozy.

Znane są sposoby otrzymywania α -G z drożdży, lecz α -G, otrzymana tymi sposobami, jest droga i zawiera inwertazę, wskutek czego produkt ten stosować można jedynie do celów analitycznych a nie do przemysłowej produkcji cukru z buraków.

Główny cel wynalazku to zwiększenie wydajności cukru buraczanego przez rozkład rafinozy, znajdującej się w soku buraczanym lub w mela-

2

sie buraczanej. Cel wynalazku został osiągnięty przez rozkład rafinozy przy użyciu grzybni pleśni *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer*, która zawiera wytworzoną w niej α -G lub przy użyciu α -G, wydzielonej z tej grzybni.

W pracach nad hydrolizą rafinozy w soku lub melasie buraczanej przy zastosowaniu α -G, wytworzonej przez mikroorganizmy, udało się wyodrębnić z gleby pleśń, która wytwarza α -G, a prawie zupełnie nie wytwarza inwertazy.

Stwierdzono również możliwość wielokrotnego zastosowania grzybni, zawierającej α -G do rozkładu rafinozy w różnych szarżach soku buraczanego lub melasy buraczanej.

Stwierdzono, że gdy omówioną wyżej pleśń zaszczepli się i hoduje w środowisku syntetycznym, zawierającym określoną pożywkę to wytworzona zostaje α -G, przy czym znaczna jej część pozostaje w grzybni. Opracowano sposób wytwarzania α -G wewnątrzkomórkowo przez dodanie do środowiska, zawierającego laktozę otrąb ryżowych, makuch rzepakowych, mielonego słodu, słodu kukurydzy, soku kukurydzianego lub ich ekstraktów.

Pleśń stosowaną w sposobie według wynalazku wyodrębniono z gleby w mieście Chiba w Japonii. Własności morfologiczne tej pleśni odpowiadają własnościom pleśni *Mortierella vinacea* odkrytej przez Dixona-Stewart (Manual of Soil Fungi, Gilman, wydanie drugie, The Iowa State

Collega Press-Ames, Iowa, USA), przy czym pleśń ta wytwarza α -G, ale prawie nie wytwarza inwertazy. Odmianie tej nadano nazwę *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer* i została ona zdeponowana w Stanach Zjednoczonych Ameryki w American-Type Culture Collection pod numerem ATCC Nr 20034.

Własności *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer* przedstawiają się następująco:

Mikroskopowe obserwacje owocnika wyhodowanego na podłożu agarowym ekstraktu słoðu ujawniły rozgałęzienia zarodni o średnicy 3—4 μ , jasno-brązowe zarodnie prawie kuliste o średnicy 10—20 μ i nie zawierające szyki słupka oraz nieregularnie kanciaste zarodniki o wymiarach 2,7—5 μ .

Makroskopowe obserwacje pleśni w różnych środowiskach agarowych pozwoliły na ustalenie następujących cech:

— agar z ekstraktem słoðu:

grzybnia ma wygląd gęstej pleśni i zmienia kolor od białego do jasno brązowego lub ciemnopomarańczowego w miarę dojrzewania zarodników. Nie wytwarza rozpuszczalnego barwnika w środowisku,

— agar ziemniaczano-glukozowy:

grzybnia zmienia kolor od białego do jasno brązowego w miarę dojrzewania zarodników. Nie wytwarza rozpuszczalnego barwnika w środowisku,

— agar z ekstraktem drożdży i ekstraktem słoðu: grzybnia zmienia kolor od białego do beżowego w miarę dojrzewania zarodników. Nie wytwarza rozpuszczalnego barwnika w środowisku.

Alfa-G wytwarza się z dobrym wynikiem w komórce pleśni *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer*, jeżeli pleśń tę zaszczepia się w środowisku, zawierającym laktozę z dodatkiem otrąb ryżowych, makuch rzepakowych, mielonego słoðu, słoðu kukurydzy, soku z kukurydzy lub wyciągu któregoś z powyższych składników, hodując ją w temperaturze około 30°C.

Komórki, zawierające wytwarzaną α -G lub α -G z nich wydzieloną i wyekstrahowaną ze środowiska znanym sposobem, dodaje się do soku buraczanego lub melasy buraczanej, ustalając wartość pH na 3—7 i prowadzi się fermentację w temperaturze 20—70°C.

Czas reakcji zależy od ilości dodanej α -G. Jeśli komórki pleśni dodaje się w takiej ilości, że zawartość α -G wynosi 900.000 jednostek na 1 g rafinozy zawartej w soku buraczanym lub melasie buraczanej, około 80% rafinozy rozkłada się na galaktozę i sacharozę w ciągu 5—6 godzin.

W sposobie według wynalazku, rafinoza, która hamuje formowanie się kryształów sacharozy, rozkłada się i dzięki temu zwiększa się ilość kryształów sacharozy. Ponadto, ponieważ rafinoza rozkłada się na galaktozę i sacharozę, wydajność sacharozy wydatnie zwiększa się.

Przykłady I—V przedstawiają sposoby wytwarzania α -G w pleśni, a przykłady VI—X przedstawiają sposoby rozkładu rafinozy w melasie buraczanej przy użyciu α -G wytworzonej w grzybni.

Pomiary aktywności α -G dokonywano według niżej podanego sposobu.

Wywołuje się enzymatyczną reakcję w temperaturze 40°C w ciągu 2 godzin przez dodanie 1 ml zawiesiny grzybni do mieszaniny 0,5 ml 0,06 M, melibiozy i 0,5 ml 0,1 M fosforanowego roztworu buforowego o wartości pH = 5,2, następnie otrzymuje się mieszaninę reakcyjną w ciągu 5 minut we wrzącej wodzie w celu dezaktywacji α -G i dodaje 1 ml 1,8% $\text{Be}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ oraz 1 ml 2% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Po rozwarstwieniu mieszaniny na centryfudze ustala się ilościowo glukozę w cieczy. Aktywność α -G, która powoduje wytworzenie 1 μg glukozy w tych warunkach reakcji, określona jest jako jednostka odniesienia. Ponieważ ilość uwolnionej glukozy i stężenia enzymu są związane liniową zależnością, aż do ilości 1000 μg glukozy, koncentrację roztworu enzymu ustala się przez rozcieńczenie do ilości enzymu w zakresie wymienionej wyżej zależności, następnie przeprowadza się reakcję enzymatyczną, a w końcu mnoży ilość uwolnionej glukozy przez wielokrotność rozcieńczenia.

Przykład I. Zarodniki pleśni *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer* zaszczepiono w środowisku, składającym się z 0,1 M buforowego roztworu fosforanowego o wartości pH = 6,0 i hodowano w temperaturze 30°C w ciągu 72 godzin, w środowisku następującej mieszaniny: węglowodany 0,2%, peptony 0,3%, ekstrakt mięsny 0,3% KCl 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%.

Po zakończeniu hodowli w ustalonym czasie oddzielono grzybnię przez odsączenie, przemyto ją dokładnie wodą i rozarto w moździerzu łącznie z piaskiem morskim na pastę. Następnie uzupełniono wodą destylowaną do pierwotnej objętości to jest objętości zawieszzonej grzybni przed odsączeniem.

Aktywność enzymu podano w tabeli I. Dotyczy ona aktywności α -G grzybni, zebranej z 1 ml tego środowiska w odniesieniu do różnych węglowodanów.

Tabela I

Rodzaj węglowodanu	Jednostki α -G w grzybni
Ksyloza	0
Arabinoza	0
Ramnoza	0
Glukoza	0
Mannoza	5
Fruktoza	0
Galaktoza	1013
Maltoza	4
Galobioza	0
Laktoza	3426
Melibioza	1776
Sacharoza	0
Rafinoza	2250
Rozpuszczalna skrobia	0
Dekstran	0

Jak widać z powyższej tabeli, galaktoza, rafinoza, melibioza i laktoza skutecznie powodowały tworzenie się α -G w grzybni pleśni. *Mortierella vinacea* var. *raffinoseutilizer*.

Przykład II. 0,1 M buforowy roztwór fosforanowy o wartości pH = 6,0, zawierający 1,5% laktozy, 1% glukozy, 0,3% mocznika, 0,2% siarczanu magnezu i 0,2% chlorku potasu przygotowano jako środowisko zasadnicze. Do tego środowiska, w oddzielnych próbach dodano substancje, wymienione w tabeli II, każdą w ilości 3%, przygotowując środowisko hodowli, które następnie zaszczerpiono pleśnią *Mortierella vinacea* var. raffinoseutilizer i prowadzono hodowlę w temperaturze 30°C w ciągu 72 godzin na wstrząsarce. Po zakończeniu hodowli całość produktu przesączono, oddzielając grzybnię, którą następnie po przemyciu wodą roz tarto w móżdżerku z piaskiem morskim na pastę. Z pasty przygotowano zawiesinę przez dodanie destylowanej wody w uzupełniającej ilości do wyjściowej objętości środowiska i zawiesinę zastosowano jako ciecz enzymatyczną. Jednostki α-G podane w tabeli II przedstawiają aktywność α-G w grzybni, zebranej z 1 ml środowiska.

Tabela II

Substancja	Jednostki α-G
Otręby pszeniczne	9453
Placek rybny	276
Makuch sojowy	70
Otręby ryżowe	32350
Makuch rzepakowy	17381
Kukurydza	39616
Ślód	33920
Mielony ślód	29984
Wytłoki browarnicze	365
Namok kukurydzy	25880

Przykład III. Do środowiska zasadniczego, przygotowanego w sposób, jak podano w przykładzie II, dodawano przesącz otrzymany z ekstraktu otrąb ryżowych gorącą wodą lub też przesącz poddany działaniu amylazy i po dodaniu bakteryjnej α-amylazy oraz po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej do momentu uzyskania ujemnej reakcji z jodem. Ilość odpowiedniego przesączu wynosiła 3% w stosunku do ilości otrąb ryżowych. Pleśń *Mortierella vinacea* var. raffinoseutilizer

seutilizer hodowano w sposób opisany w przykładzie II i oceniano aktywność enzymatyczną w grzybni. Otrzymane wyniki przedstawia tabela III.

Tabela III

Substancja	Jednostki α-G
Otręby ryżowe, nie poddane obróbce	32191
Przesącz otrzymany z ekstraktu otrąb ryżowych przy użyciu gorącej wody	34495
Przesącz ekstraktu otrąb ryżowych poddany działaniu α-amylazy	38250

Przykład IV. Jako zasadnicze środowisko użyto 0,1 M buforowy roztwór fosforanowy o wartości pH = 6,0, zawierający 1,5% laktozy, 3% otrąb ryżowych, 0,3% mocznika, 0,2% siarczanu magnezu i 0,2% chlorku potasu, do którego dodawano odpowiednio 0,2%, 0,5% i 1% proszkowanego ekstraktu siodu w celu przygotowania środowiska hodowli. Hodowanie prowadzono w sposób, jak opisano w przykładzie II i oceniano aktywność α-D-G w grzybni. Aktywność enzymatyczna wynosiła: 27806 jednostek ze środowiska zasadniczego, 29634 jednostek ze środowiska z 0,2% ekstraktu siodu, 35577 jednostek ze środowiska z 0,5% ekstraktu siodu oraz 43349 jednostek ze środowiska z 1% ekstraktu siodu.

Przykład V. W 1 l wody rozpuszczono 100 g laktozy, 100 g glukozy, 100 g namoku kukurydzy, 100 g siarczanu amonu, 30 g KH_2PO_4 , 30 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g NaCl i 100 g CaCO_3 . Otrzymany roztwór umieszczono w kadzi fermentacyjnej i po sterylizacji w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut, ochłodzono do 30°C. Następnie przy użyciu sterylizowanej wody rozcieńczono roztwór do łącznej objętości 10 l i zaszczerpiono zarodnikami pleśni, *Mortierella vinacea* var. raffinoseutilizer prowadząc hodowlę w temperaturze 30°C przy szybkości mieszania 200 obrotów na minutę i napowietrzaniu z szybkością 5 l na minutę. Wyniki hodowli przedstawiono w tabeli IV.

Tabela IV

Czas hodowli (godz.)	24	48	72	77	90
pH	6,4	6,3	6,3	6,3	6,5
Ciężar suchej grzybni, mg/100 ml środowiska	1,165	1,539	1,789	1,852	1,801
Jednostki α-G	2870	11260	26600	33650	33010

Przykład VI. 0,1 M fosforanowy roztwór buforowy, zawierający 0,75% laktozy, 2% glukozy, 1,8% peptonu, 1,8% ekstraktu mięsnego, 0,2% siarczanu magnezu i 0,2% chlorku potasu zaszczerpiono pleśnią *Mortierella vinacea* var. raffinoseutilizer i hodowano ją wstrząsając w ciągu 72 godzin. Po zakończeniu hodowli grzybnię odsączono przemyto dokładnie wodą i odważono określoną naważkę w celu użycia jej jako enzymu. Ilość powstałego α-G wynosiła 3500 jednostek na 1 ml przesączu środowiska i 28400 jednostek w grzybni, zebranej z 1 ml środowiska.

Z drugiej strony do 10 g melasy buraczanej,

o zawartości rafinozy 1,088 g, dodano kwasu siarkowego do uzyskania pH środowiska wartości 5,2, a następnie dodano 0,1 M fosforanowego roztworu buforowego o wartości pH = 5,2 i rozcieńczono wodą do 20° Brix.

Do tak przygotowanej rozcieńczonej melasy buraczanej dodano grzybnię, wytworzoną ze 100 ml środowiska, i przeprowadzono proces enzymatyczny w temperaturze 50°C w ciągu 24 godzin z wstrząsaniem. W otrzymanym przesączu zmierzono w sposób ilościowy ilość sacharozy i zwiększoną ilość sacharozy elucyjną metodą chromatografii białkowej. Przy użyciu grzybni o aktyw-

ności enzymatycznej 450000 stopień rozkładu rafinozy i przyrost ilości sacharozy wynosiły odpowiednio 70,4% i 364 mg, a przy użyciu grzybni o aktywności enzymatycznej równej 900.000 jednostek, wynosiły odpowiednio 81,5% i 544 mg.

Przykład VII. Pleśń hodowano w warunkach, jak opisano w przykładzie VI, stosując takie same ilości grzybni jako enzym.

Z drugiej strony do 10 g melasy buraczanej o zawartości rafinozy, 1,088 g dodano kwasu siarkowego oraz fosforanowego roztworu buforowego o wartości pH = 5,2 i rozcieńczono mieszaninę do 36° Brix. Następnie do rozcieńczonej melasy buraczanej dodano 1.700.000 jednostek enzymu i przeprowadzono reakcję enzymatyczną w temperaturze 37°C, w ciągu 24 godzin z potrząsaniem. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną przesączono i w przesączu zmierzono stopień rozkładu rafinozy oraz przyrost ilości sacharozy. Po dokładnym przemyciu grzybni wodą próbowano stosować grzybnię powtórnie w różnych rozcieńczonych roztworach melasy buraczanej, posiadającej ten sam układ. Wyniki uzyskane po trzykrotnym użyciu grzybni przedstawia tabela V.

Tabela V

Krotność stosowania grzybni	Przyrost ilości sacharozy mg	Rozkład rafinozy %	Końcowa aktywność α-G %
1	372	67,3	98
2	426	72,7	84
3	390	67,3	55

Przykład VIII. Pleśń hodowano w środowisku o tym samym składzie, jak w przykładzie VI. Grzybnię zhomogenizowano w homogenizatorze, a następnie rozrywano komórki w ciągu 1 godziny przy użyciu generatora ultradźwiękowego o częstotliwości 10 kilocyklów. Zniszczoną grzybnię odwirowano w celu oddzielenia cieczy od osadu i oznaczono aktywność α-G w każdej części. Stwierdzono, że aktywność enzymatyczna w cieczy wynosiła 39%, a w osadzie 61%. Następnie przeprowadzono rozkład rafinozy, stosując 1.750.000 jednostek wymienionego osadu jako enzymu, w sposób jak w przykładzie VII. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli VI.

Tabela VI

Krotność stosowania grzybni	Przyrost ilości sacharozy mg	Rozkład rafinozy %	Końcowa aktywność α-G, %
1	262	67,3	61
2	244	65,4	44
3	244	50,9	29

Rozkład rafinozy wykonywano także przez zateżenie przesączu pod zmniejszonym ciśnieniem, dodanie 1.750.000 jednostek α-G do 10 g melasy buraczanej o zawartości rafinozy 1,088 g nastawienie otrzymanej mieszaniny do wartości pH = 5,2 oraz stężenie 36° Brix, stosując odpowiednio wodę i kwas siarkowy, a następnie pozosta-

wienie mieszaniny w ciągu 24 godzin, w temperaturze 37°C. Stwierdzono, że stopień rozkładu rafinozy wynosił 65,3%, a przyrost ilości sacharozy 260 mg.

Przykład IX. Przygotowano środowisko, zawierające 1,5% laktozy, 0,5% glukozy, 1% namoku kukurydzy, 0,1% mocznika, 0,1% siarczanu amonu, 0,3% KH₂PO₄, 0,2% MgSO₄ · 7H₂O i 0,2% NaCl, następnie po sterylizacji zaszczipiono środowisko zarodnikami pleśni i hodowano w temperaturze 30°C w ciągu 72 godzin. Stwierdzono, że liczba jednostek α-G w grzybni zebranej z 1 ml środowiska wynosiła 28.000.

Z drugiej strony 10 g melasy buraczanej o zawartości rafinozy 1,088 g rozcieńczono wodą do 15° Brix i nastawiono do wartości pH = 5,2, stosując kwas siarkowy. Do rozcieńczonego roztworu melasy buraczanej dodano grzybnię o zawartości 980.000 jednostek α-G i przeprowadzono reakcję enzymatyczną odpowiednio w temperaturze 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C i 70°C w ciągu 24 godzin z potrząsaniem, a następnie mierzono stopień przemiany rafinozy. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli VII.

Tabela VII

Temperatura reakcji °C	Stopień rozkładu rafinozy %
20	42,1
30	78,2
40	80,1
50	83,5
60	78,0
70	53,9

Przeprowadzono również reakcję enzymatyczną rozcieńczonej 10 g melasy buraczanej o zawartości rafinozy 1,088 g roztworem McIlvaine'a do 15° Brix, przy odpowiednich wartościach pH = 2,2; 3; 4; 5; 6; 7 i 8, dodając 980.000 jednostek grzybni i wytrząsając otrzymany roztwór w temperaturze 50°C w ciągu 6 godzin. Stopień rozkładu rafinozy przedstawia tabela VIII.

Tabela VIII

pH mieszaniny reakcyjnej	Stopień rozkładu rafinozy %
2,2	11,0
3	61,2
4	80,5
5	80,7
6	51,9
7	38,1
8	12,0

Przykład X. 10 g melasy buraczanej o zawartości rafinozy 1,088 g rozcieńczono wodą do 15° Brix i doprowadzono pH do wartości 5,2 kwasem siarkowym. Do otrzymanego roztworu dodano 980.000 jednostek tej samej grzybni, jako stosowano w przykładzie IX, i przeprowadzono reakcję enzymatyczną w temperaturze 50°C w ciągu 5 godzin z potrząsaniem. Następnie grzybnię przemyto dokładnie wodą i dodano do różnych rozcieńczonych melas buraczanych, mających

ten sam skład, jak powyżej w celu przeprowadzenia rozkładu rafinozy kilkakrotnie w warunkach takich samych, jak powyżej. Wyniki otrzymane podczas trzykrotnego stosowania podano w tabeli IX.

Tabela IX

Krotność stosowana grzybni	Rozkład rafinozy %	Końcowa aktywność α -G %
1	77,3	79,4
2	74,6	66,6
3	65,3	58,3

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób rozkładu rafinozy przy pomocy α -galaktozydazy, **znamienny tym**, że pleśń *Mortierella Vinacea* var. *raffinoseutilizer* ATCC 20034, zawierającą wytworzoną w niej α -galaktozydazę, lub wydzieloną z grzybni α -galaktozydazę dodaje się do soku buraczanego lub melasy buraczanej, zawierających rafinozę.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rozkład rafinozy przy pomocy α -galaktozydazy prowadzi się w temperaturze 20—70°C, przy wartości pH środowiska 3—7.