

## 分枝犁头霉菌球对棉子糖水解作用的研究

彭万霖 沈以源 刘波

(黑龙江省应用微生物研究所, 哈尔滨)

分枝犁头霉 (*Absidia remosa*) 108-8 能以乳糖诱导产生大量胞内  $\alpha$ -半乳糖苷酶。该菌在深层培养中形成菌球。甜菜制糖工艺后期产生大量糖蜜, 糖蜜中含有 2—3% 棉子糖, 阻碍蔗糖结晶造成糖蜜中蔗糖含量高达 45—50%。据报道, 使用霉菌菌球水解糖蜜中棉子糖, 能使糖蜜中蔗糖结晶出来<sup>[1-3]</sup>。本文简要报道分枝犁头霉所含  $\alpha$ -半乳糖苷酶的特性、水解糖蜜中棉子糖的条件和方法。

### 材料和方法

#### (一) 菌种和培养方法

1. 菌种: 分枝犁头霉 (*Absidia remosa*) 108-8 是作者从酒曲中分离筛选出来的。

#### 2. 培养基:

(1) 种子培养液成份(g): 乳糖 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{KCl}$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 蛋白胨 0.6, 蒸馏水 1000ml, pH 5.8, 8 磅 30 分钟灭菌。

(2) 培养液成份(g): 乳糖 10, 葡萄糖 10,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 蛋白胨 5, 酵母膏 5, 蒸馏水 1000ml, pH 5.8,  $\text{CaCO}_3$  3, 8 磅 30 分钟灭菌。

#### 3. 培养方法

(1) 种子培养: 在 500 ml 克氏瓶斜面菌种中, 加 150ml 无菌水, 制成孢子悬液, 接入含 1000 ml 种子培养液的 5000 ml 三角瓶中, 置于旋转式摇床上, (160 转/分, 振幅 25mm) 30℃ 培养 24 小时, 即为种子液。

(2) 菌球深层培养: 在含 1000 ml 培养液的 5000ml 三角瓶中接入 35 ml 种子液, 置于旋转式摇床上, 30℃ 培养 72 小时, 形成菌球培养物。培养过程中以 25% 无菌乳糖溶液 20ml 进行诱导  $\alpha$ -半乳糖苷酶的合成, 以 35% 的无菌柠檬酸溶液 20

ml 刺激  $\alpha$ -半乳糖苷酶的合成。

#### (二) 分枝犁头霉菌球

过滤收集深层培养形成的菌球, 用蒸馏水洗涤制成湿菌球备用。使用过的菌球过滤后用水洗净再用。

#### (三) 不同稀释度度 (Brix) 的甜菜糖蜜

取 79.6° Bx 糖蜜(含棉子糖 2.12%), 加入棉子糖, 使含量增加到 4.5%。分别用水稀释成 20、30、40 和 50° Bx(以糖表测定)。

#### (四) 分析测定方法

1.  $\alpha$ -半乳糖苷酶活力测定: 在测定系统中, 0.06 M 蜜二糖溶液和 0.1 M 磷酸盐缓冲液各 2.5 ml, 酶液 5ml, 其余同前报<sup>[4]</sup>。

2. 以棉子糖为底物酶活力测定: 按 Somogyi 法<sup>[5]</sup>测定还原糖, 计算酶活力。

3. 棉子糖和蔗糖的测定: 将试样用丁酮: 甲醇: 醋酸(3:1:1)溶剂系统纸层析展开, 剪取相当棉子糖和蔗糖位置滤纸条, 加水 5ml, 30℃ 浸提 3 小时。用半胱氨酸味唑法<sup>[6]</sup>定量测定。

### 结果和讨论

#### (一) pH 对酶活力的影响

由图 1 看出以棉子糖为底物时, 酶反应最适 pH 为 5.2。

#### (二) 温度对酶稳定性的影响

结果如图 2, 当温度低于 65℃ 时酶保持 100% 活力, 高于 65℃ 酶迅速失活。70℃ 则酶完全丧失活力。

#### (三) 不同酶量对糖蜜中棉子糖水解的影响

实验结果表明, 加入酶量  $3.0 \times 10^6$  单位以上, 棉子糖水解率超过 80%。

本文于 1982 年 9 月 18 日收到。

我所钱詠久同志协助进行真菌毒性实验; 赵保国教授审阅本稿, 在此一并致谢。

#### (四) 不同时间对糖蜜中棉子糖水解的影响

实验结果表明,反应 3 小时棉子糖水解率达 80% 以上。随时间延长,棉子糖水解率无显著增加。

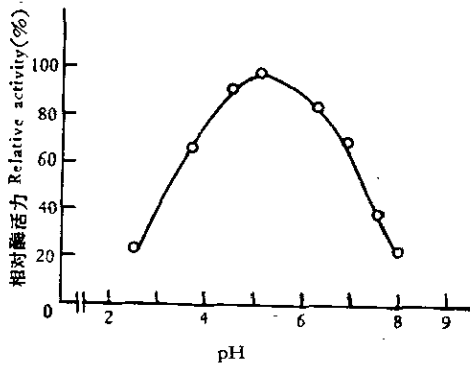


图 1 pH 对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity  
0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -0.1M citric acid buffer

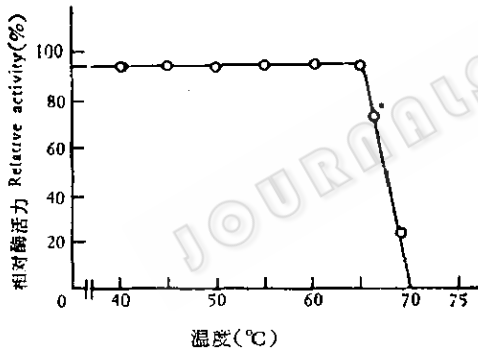


图 2 温度对酶稳定性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on enzyme stability

#### (五) 不同锤度糖蜜对棉子糖水解的影响

随糖蜜锤度增加,棉子糖水解率逐渐降低。

#### (六) 与蔗糖并存情况下棉子糖的水解

实验结果表明,在蔗糖并存情况下,并不影响酶对糖蜜中棉子糖的水解;蔗糖对  $\alpha$ -半乳糖苷酶

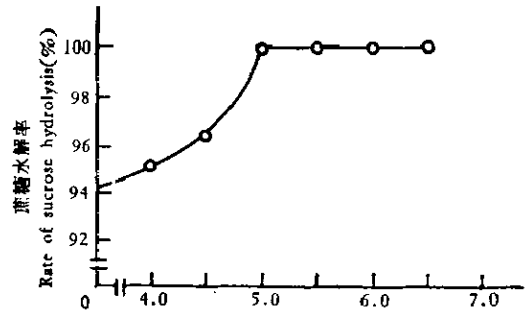


图 3 pH 对蔗糖稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH on sucrose stability

几乎无抑制作用。

#### (七) pH 对蔗糖稳定性的影响

从图 3 看出,蔗糖在 pH 5.2—6.5 时稳定,如果 pH 低于 5.2 则发生蔗糖水解现象。

#### (八) 菌球酶对糖蜜中棉子糖的连续水解作用

菌球  $\alpha$ -半乳糖苷酶水解糖蜜中棉子糖一次后失活很少,连续反应四次后,菌球酶活力只损失 15%,棉子糖水解 75%。

根据以上实验结果,我们认为:分枝犁头霉 108—8 是可用于甜菜制糖工艺的优良菌株,用含  $\alpha$ -半乳糖苷酶菌球连续处理甜菜糖蜜,是从糖蜜中回收蔗糖的一种有效的方法。

#### 参 考 文 献

- [1] Suzuki, H. et al: *Agr. Biol. Chem.*, 33, 506, 1969.
- [2] Narita, S. et al.: U. S. Pat., 3, 867, 256, 1975.
- [3] 成田茂义: 公开特许公报, 特开昭 50-111279, 1975.
- [4] 刘波 彭万霖等: *微生物学报*, 19(2):225, 1979.
- [5] Somogyi, M: *J. Biol. Chem.*, 195: 19, 1952.
- [6] Dische, Z. and E. Borenfreund: *ibid.*, 192: 593, 1951.