

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12P 19/00 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

C12R 1/80 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02140122.5

[45] 授权公告日 2006年3月1日

[11] 授权公告号 CN 1243832C

[22] 申请日 2002.5.14 [21] 申请号 02140122.5

[30] 优先权

[32] 2001.5.14 [33] KR [31] 0026111/01

[32] 2002.1.25 [33] KR [31] 0004445/02

[71] 专利权人 第一制糖株式会社

地址 韩国首尔

[72] 发明人 韩竣相 朴康竣 申大燮 金政勳

金镇哲 李起昌 李韵和 金承昱

朴承源

审查员 张利刚

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

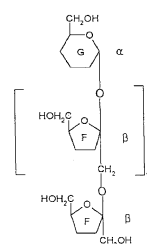
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 9 页

[54] 发明名称

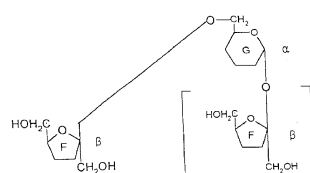
生产果糖转移酶的微生物和采用该微生物生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种新的微生物和生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法。更具体地说，本发明涉及来源于土壤的柑桔青霉 KCTC 10225BP，这种微生物产生果糖转移酶，同时采用所述果糖转移酶将蔗糖水解成如下结构式 I 的果糖低聚糖，其中 n 是整数 1~5，G 代表葡萄糖而 F 代表果糖，和下列结构式 II 的新果糖低聚糖，其中 n 是 1~5 的整数，G 和 F 定义如上；本发明还涉及用所述微生物同时生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法。

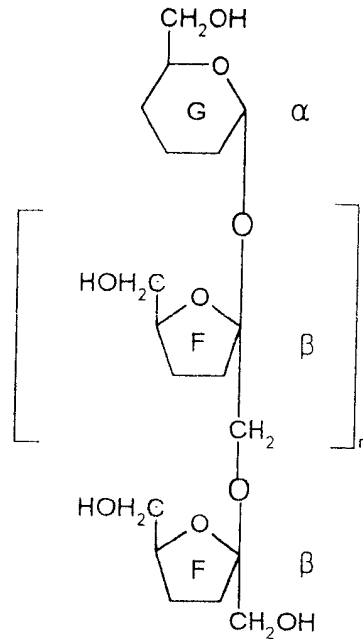


结构式 I



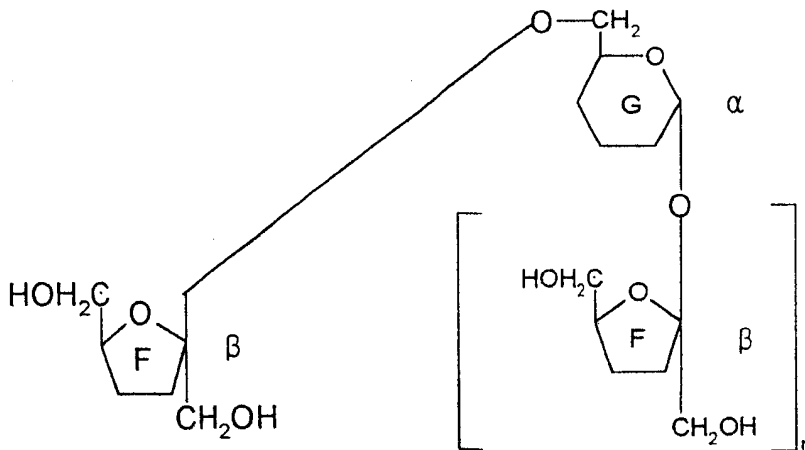
结构式 II

1、来源于土壤的柑桔青霉(*Penicillium citrinum*) KCTC 10225BP, 其能够产生果糖转移酶并用所述果糖转移酶水解蔗糖为如下结构式I的果糖低聚糖:



结构式I

其中n是整数1~5, G代表葡萄糖而F代表果糖, 和下列结构式II的新果糖低聚糖:



结构式II

其中n是1~5的整数, G和F定义如上。

2. 从蔗糖同时生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法, 其包括如下的步骤:

种子培养权利要求1定义的微生物柑桔青霉KCTC 10225BP；大量生产所述的种子培养的微生物；在蔗糖溶液中发酵该大量生产的微生物。

3. 按照权利要求2生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法，其包括如下步骤：

将按照权利要求1定义的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP于26~28℃、100~200rpm的振荡速度下在第一种子培养基中种子培养2天来活化该微生物；

在26~28℃、振荡速度为200~600rpm、注入空气速率为0.5~1v/vm的条件下在发酵培养基中大量生产这种微生物72小时；并

通过离心法收集所产生的微生物，用0.85%的生理盐水洗涤两遍，接着在蔗糖白利浓度为60~77的蔗糖溶液中培养20~50小时，白利浓度通过初始插入传感器测定，培养条件为：温度范围为35~50℃，pH值为5~7，同时振荡速度为100~300rpm。

4. 按照权利要求2生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法，其包括如下步骤：

种子培养如权利要求1定义的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP；

大量生产这种种子培养的微生物；

将大量生产的微生物与载体混合形成珠子，然后装柱；和

将蔗糖溶液通过用珠子填充的柱子。

5. 按照权利要求4的方法，其中在26~28℃、振荡速度为100~200rpm的条件下，进行种子培养2天。

6. 按照权利要求4的方法，其中大量生产步骤在26~28℃下进行42~72小时，同时振荡速度为200~600rpm，以0.5~1v/vm的速率注入空气。

7. 按照权利要求4的方法，其中载体选自海藻酸胶、光交联树脂、丙烯酸胺凝胶、脱乙酰壳多糖和明胶。

8. 按照权利要求4的方法，其中载体使用浓度为1~2%。

9. 按照权利要求4的方法，其中采用经1毫米直径的针头将微生物和载体的混合物滴入1~2%的氯化钙水溶液中的方法生产珠子。

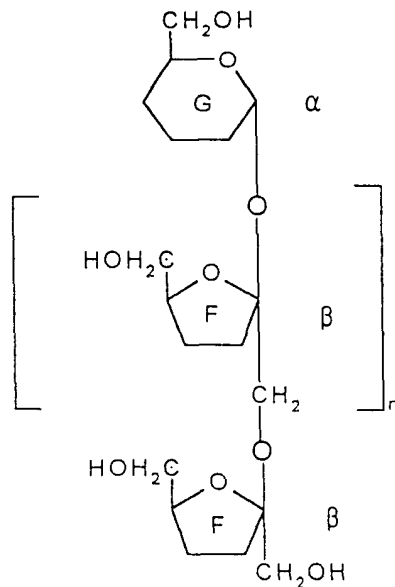
10. 按照权利要求4的方法，其中蔗糖溶液的浓度为60~70白利。

11. 按照权利要求4的方法，其中蔗糖溶液在35~55℃的温度下，以100~300ml/hour的速率通过柱子。

生产果糖转移酶的微生物和采用该微生物
生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法

技术领域

本发明涉及能够同时生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的一种新的微生物和用所述微生物生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法。更具体地说，本发明涉及来源于土壤的柑桔青霉(*Penicillium citrinum*) KCTC 10225BP，它产生果糖转移酶，同时用所述果糖转移酶水解蔗糖成为下列结构式I的果糖低聚糖：



结构式I

其中n是整数1~5，G代表葡萄糖而F代表果糖；以及下列结构式II的新果糖低聚糖。



结构式II

其中 n 是1~5的整数，G和F定义如上，本发明还涉及采用所述微生物生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法。

背景技术

果糖低聚糖是一种低聚糖的混合物，其中低聚糖包括1-蔗果三糖(GF₂)、霉菌赤藓醛糖(GF₃)和果糖霉菌赤藓醛糖(GF₄)，其中果糖的1至3个分子通过 β -(2,1)键分别与蔗糖结合，它们在植物中广泛存在，例如芦笋、洋葱、土豆、蜂蜜等。由于它们优良的性能包括例如低的卡路里值、促进乳酸菌和双歧杆菌的增殖、改进肠道内的微生物区系和抑制致病细菌的生长、改进肠道蠕动和增强免疫，它们与低聚糖一起作为食品原料现在受到高度重视。因此在各种工业领域都能找到低聚糖的应用实例，包括食品、饮料、糖果、保健食品之类等等。

特别是，据报道果糖低聚糖在与二联果糖酐III(DFA III)(见日本专利公开号NO.11-43438)联合使用时，显示出杰出的钙吸收作用。美国专利号5,827,526公开了每天给患者服用0.5g~5g果糖低聚糖能够减少腹泻的持续时间和复发。

已公开的韩国专利申请No.2000-57520公开了与其它低聚糖相比，果糖低聚糖和半乳糖低聚糖与各种食用成分的混合物能够改善肠内的流动并有效地表达生物出现前的效应。而且，由于果糖低聚糖通过诱导双歧乳酸杆菌的增殖显著促进肠蠕动(其中双歧乳酸杆菌是构成人类肠道正常微生物区系的细菌之一)，不影响摄入后的血糖水平，也不会被任何消化酶分解，目前它被作为研究开发糖尿病人饮食的对象。此外还发现它们能够降低血液和肝脏中的胆固醇水平。果糖低聚糖的这些作用还没有受到仔细的研究。

按照传统, 通过采用能够产生果糖转移酶的微生物的方法生产果糖低聚糖。例如, 已知使用出芽短柄霉(*Aureobasidium pullulans*) 菌株的方法, 使用黑曲霉(*Aspergillus niger*) 的方法和使用青霉属和镰孢属和 (*Fusarium* spp.) 的方法。但是, 采用这些方法制备的果糖转移酶的缺点是低的蔗糖水解效价。

未经审查的日本专利申请号10-165192公开了采用柑桔青霉 FERM P-15944 真菌制备 β -呋喃果糖苷酶的方法, 采用这种方法能够从蔗糖中生产传统的果糖低聚糖和新果糖低聚糖的混合物。据文中所述新果糖低聚糖是一种由新蔗果三糖(6G- β -呋喃果糖基-蔗糖), 新霉菌赤藓醛糖(6G- β -呋喃果糖基-蔗果三糖)和新果糖基霉菌赤藓醛糖(6G- β -呋喃果糖基-霉菌赤藓醛糖)组成的混合物, 其结构中果糖的1至3个分子通过 β -(2,6)键分别与蔗糖结合, 不同于传统的果糖低聚糖。文中还描述了新果糖低聚糖具有湿润作用、良好的甜味、低卡路里和抗龋洞作用以及诱导肠内细菌增殖和在肠道内促进局部免疫应答的功能, 从而能够用于各种领域诸如甜味剂、功能食品、饲料、医药和杀虫剂促进剂。

D. Grizard等公开了一种采用Cytolase PCL5生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖混合物的方法, Cytolase PCL5是市售的来自泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)的酶(D. Gizard, C. Barthomuf, 食品生物技术(Food Biotechnology), 13(1)93-105, 1999)。

美国专利号5,334,516公开了采用来源于聚多曲霉(*Aspergillus sydowi*)的酶从传统的果糖低聚糖生产新果糖低聚糖(表达为支链果糖低聚糖)的方法。

因此, 本发明人已经深入调查和研究了现有技术并对各种高收率生产果糖低聚糖的方法进行了研究。结果, 我们最终鉴定了一种新的微生物, 它能够产生蔗糖水解效价高的果糖转移酶, 并证明通过将这种微生物与高度浓缩的蔗糖溶液反应能够以高的收率生产传统的果糖低聚糖和新果糖低聚糖。基于上述发现提出了本发明。

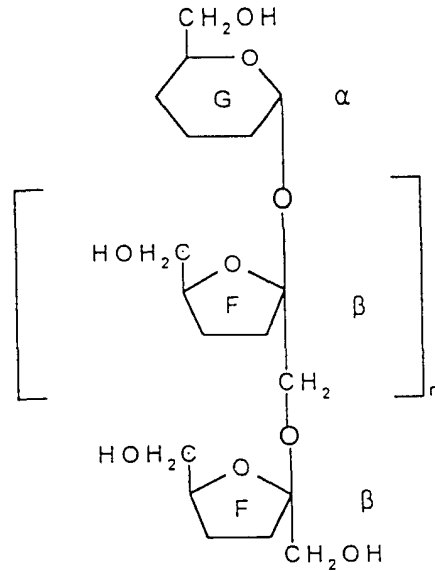
发明的公开

本发明的目标是提供一种新的微生物, 它能够生产高效价的果糖转移酶。

本发明的另一个目标是提供通过将这种微生物与高度浓缩的蔗糖溶液反应高收率生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法。

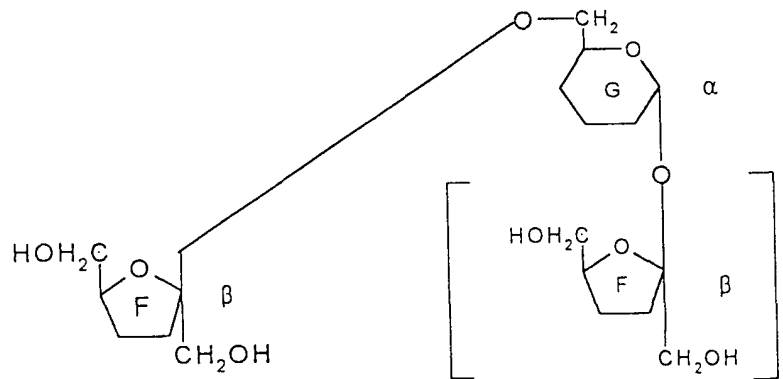
因此, 为了实现上述目标, 本发明提供来源于土壤的柑桔青霉 KCTC

10225BP, 它生产果糖转移酶, 同时用所述果糖转移酶水解蔗糖成为如下结构式I的果糖低聚糖。



结构式I

其中n是整数1~5, G代表葡萄糖而F代表果糖;
和下列结构式II的新果糖低聚糖



结构式II

其中n是1~5的整数, G和F定义如上, 本发明还涉及用所述微生物生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法。

另一方面, 本发明提供生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法, 其包括以下

步骤: 在26到28℃温度下, 将根据本发明的微生物柑桔青霉KCTC 10225BP, 在第一种子培养基中以100到200rpm速度振荡种子培养2天活化这种微生物;

在26℃到28℃, 以200到500rpm速度振荡, 以0.5到1v/vm的速率注入空气的条件下, 在发酵培养基中大量生产这种微生物; 并通过离心法收集所产生的微生物, 用0.85%的生理盐水洗涤两次, 然后在蔗糖白利浓度为60到77的蔗糖溶液中培养20~50小时, 白利浓度通过初始插入传感器测定, 培养条件为: 温度范围为35℃到50℃, pH为5到7, 振荡速度为100到300rpm.

另一方面本发明提供生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法, 其包括以下步骤:

种子培养按照本发明的微生物柑桔青霉 KCTC10225BP;

大量生产这种种子培养的微生物;

将大量生产的微生物与载体混合形成珠子, 然后装柱; 和

将蔗糖溶液通过用珠子填充的柱子。

又一方面, 本发明提供来源于按照本发明的微生物柑桔青霉 KCTC10225BP的果糖转移酶, 其显示高的蔗糖水解效价。

附图简要说明

在与附图联系起来阅读以下详细说明后, 本发明的上述目标和其他特征以及优点将更为明显, 其中

图1显示当改变按照本发明的柑桔青霉 KCTC10225BP的生物量时的蔗糖水解水平, 其中斜率为(单位/1g蔗糖)果糖转移酶的蔗糖水解效价;

图2a显示采用发酵罐, 同时振荡速度从300rpm变化到500rpm时, 微生物的生物量随主要培养发酵时间的变化;

图2b显示采用发酵罐, 同时振荡速度从300rpm变化至500rpm时, 细胞内外的酶量随主要培养发酵时间的变化;

图2c显示采用发酵罐在600rpm的振荡速度下, 微生物生物量和胞内的酶量随主要培养发酵时间的变化;

图3a显示在5升发酵罐中将按照本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP接种到31蔗糖溶液中后, 在分批发酵中果糖低聚糖和新果糖低聚糖的产量随蔗糖浓度的变化;

图3b显示在5升反应器中将按照本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP的生物质

混合入3l蔗糖溶液中后,在分批生产中果糖低聚糖和新果糖低聚糖产量随氢离子浓度(pH)的变化;

图3c显示在5升反应器中将根据本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP的生物质混合入3升蔗糖溶液中后,在分批生产中果糖低聚糖和新果糖低聚糖产量随温度的变化;

图3d显示在5升反应器中将根据本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP的生物质混合入3升蔗糖溶液中后,在分批生产中与果糖低聚糖和新果糖低聚糖产量随振荡速度的变化;

图4显示当固定在藻酸盐上的按照本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP与高度浓缩的蔗糖溶液连续反应时,果糖低聚糖和新果糖低聚糖产量的变化。

实施本发明的最佳模式

现将本发明详细描述如下。

本发明人收集韩国Inchon糖厂周围分布的土壤并从土壤中分离微生物。发现其中有一种微生物显示出产生高效价的果糖转移酶的能力。这种新的微生物经鉴定是柑桔青霉(*Penicillium citrinum*),它是一种属于青霉属的真菌。将这种微生物于2001年2月27日保存在位于韩国Oun-dong, Yusong-gu, Taejon的韩国生物科学和生物技术研究所以(KRIBB),保存编号为KCTC-10225BP,从而使第三方能得到这种微生物。

本发明人检查了根据本发明的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP的科学特征和形态,结果见表2。测量了从这种微生物产生的果糖转移酶的蔗糖水解效价,平均为1.5单位/1g蔗糖。这项试验结果表明与以下试验结果相比,从根据本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP产生的果糖转移酶具有高于任何其他已知酶的蔗糖水解效价:美国专利5,334,516中需要至少5单位的从曲霉属产生的酶才能降解1g的蔗糖,D. Grizard等的试验结果需要7单位的从泡盛曲霉产生的酶才能降解1g蔗糖。

采用根据本发明的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP能够同时以高收率生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖。能用于生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法包括分批生产和固定连续生产的方法等这些本领域众所周知的方法。

分批生产方法是最常用的方法,其中通过混合含有这种酶的微生物与蔗糖溶液,将蔗糖溶液(底物)与果糖转移酶反应获得产品。一方面,本发明提供

采用根据本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP以高收率生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的分批生产方法。

同时，固定连续生产方法至今也被广泛应用，其中微生物或酶被固定在载体中，将底物与载体接触使其与微生物或酶反应。这种方法的优点是微生物或酶能够重复使用并且反应能够连续进行。但是，这些方法也有缺点，为固定酶，应提取和分离微生物中所含的酶，而从微生物中提取的酶一般是不稳定的。因此，当前采用一种使用固定的微生物细胞的方法，其中微生物直接被固定在载体中。这种微生物固定化方法不需要从微生物细胞中分离酶，于是避免了在酶的提取过程中酶活性的降低。另外，此方法还有一个优点是复杂的酶的提取和分离过程能够一步完成。因此，另一方面，本发明提供通过将根据本发明的柑桔青霉 KCTC10225BP固定在载体中来连续生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的方法。根据本发明的这种固定连续生产方法详细解释如下。

首先，将按照本发明的柑桔青霉 KCTC10225BP作种子培养。在发酵培养基中大量生产种子培养的微生物。种子培养优选在26℃~28℃以100~200rpm的速度振荡下培养两天。大量生产优选在26℃~28℃、以200~600rpm的速度振荡下并以0.5到1v/vm的速率注入空气的条件下培养42到72小时。然后将大量生产的微生物与载体充分混合。将所得混合物形成珠子，再装柱。虽然不限制使用本领域常用的载体，但是载体优选选自海藻酸胶、光交联树脂、丙烯酰胺凝胶、K-角叉藻聚糖、脱乙酰壳多糖和明胶。载体的浓度优选1~2%。然后将蔗糖溶液通过用珠子装成的柱子，优选蔗糖溶液浓度为60~70白利，流速为100~300ml/hr，温度为35~55℃。

表1显示两个试验结果，其中通过采用按照本发明的柑桔青霉 KCTC 10225BP以分批方法和固定连续方法生产果糖低聚糖。

表1

	分批生产方法	固定连续生产方法
微生物生物量(基于生产100升果糖低聚糖)	400g	50g
生产效率(基于生产100升果糖低聚糖)	0.67升/天(100升/150天)	4.02升/天(100升/24.9天)

如表1所示, 当采用分批生产方法时, 需要400克微生物才能生产100升果糖低聚糖, 生产1升果糖低聚糖需要的反应时间大约为24小时。但是, 在反应完成以后, 为了从微生物中分离产生的果糖低聚糖, 清洗反应容器并用新鲜的蔗糖溶液和微生物填充反应容器还需要12小时, 才能开始下一个反应。与此相比, 在固定连续方法中, 生产100升果糖低聚糖需要50克微生物, 以4.02升/天的生产效率, 生产100升果糖低聚糖所需的反应时间约25天。因此可确定当采用固定连续方法时, 只需要更少的微生物, 而生产效率却高出分批方法的6倍。

现在, 将采用如下实施例中所示的实施方案详细描述本发明。但是, 这些实施例是用于阐述本发明而并非限制本发明的范围。

实施例1 微生物的鉴定

从韩国Inchon糖厂周围收集的土壤中获取微生物。发现其中的一种微生物具有生产高效价果糖转移酶的能力。这种新的微生物被鉴定为柑桔青霉, 它是属于青霉属的真菌类。将这种微生物于2001年2月27日保存在位于韩国Oun-dong, Yusong-gu, Taejon的韩国生物科学和生物技术研究所(KRIBB), 保存编号为KCTC10225BP, 从而使第三方能得到这种微生物。

根据本发明的这种微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP在本领域常用的真菌培养基 Czapek Yeast Algae (CYA) 和 Malt Extract Algae (MEA) 中生长。所鉴定的这种微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP在这两种培养基中生长时显示出基本相似的性质和形态。这种微生物的科学特征和形态如下表2所示。

表2

在CYA和MEA培养基中的生长特性		
	MEA培养基	CYA培养基
生长速率 (25℃7天)	2.6cm	3.6cm
生长速率 (37℃7天)	2.2cm	2.4cm
生长速率 (4℃7天)	-	-
菌落表面	类紫色, 平坦	类紫色, 圆形有深沟 向外延伸
菌丝体	没有分生孢子的白色螺旋形菌丝, 形成灰-蓝-绿色的菌落	没有分生孢子的螺旋形菌丝, 形成灰-蓝-绿色的菌落
渗出物	-	-
色素	-	形成浅黄色素
菌落的基底面	浅黄	深黄
形态特征		
分生孢子梗	从气生菌丝生长	
	有时有20到50微米的分支并生长至100到200微米	
	光滑表面	
	异种孢子: 分叉型, 以约2到4个菌丝轮终结 (有时为单菌丝轮)	
	梗基: 分支型并有5到8个瓶梗, 大小: 8.6-13.8×2.2-3.1微米	
	瓶梗: 坛型, 大小: 4-8.3×1.8-2.9微米	
分生孢子	大小: 2.4-3.2×2.0-3.1微米	
	球形	
	以柱状生长, 在分生孢子末端解旋。	

实施例2

种子培养和酶效价测定

作为用于微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP种子培养的培养基, 对如韩国公开专利1989-1127所描述的培养产生果糖低聚糖微生物所用的培养基组合物作了

改动。这种改进的培养基组合物如表3所示。将该微生物在250毫升烧瓶中培养，加入培养基的量为50毫升。培养在振荡培养箱中进行，振荡速度为150rpm，温度为28℃，培养两天。

表3

成分	组成 (g/l)
蔗糖	200
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	5
酵母提取物	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
KCl	1

注：用5N的盐酸调pH值至6。

然后，测定从培养的柑桔青霉 KCTC 10225BP制备的果糖转移酶的蔗糖水解效价。按照Shinohara Satoshi(日本未审查的专利申请No. 10-165192)描述的方法测定蔗糖水解效价。酶效价定义为每单位时间(分钟)通过水解蔗糖(一种糖底物)产生的葡萄糖的量(μmol)。发现从根据本发明的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP制备的果糖转移酶具有平均1.5单位/1g蔗糖的蔗糖水解效价。这项结果表明与以下结果相比，来自根据本发明的柑桔青霉KCTC 10225BP的果糖转移酶具有高于任何其他已知酶的蔗糖水解效价：美国专利5,334,516中需要至少5单位来自曲霉属的酶才能降解1g的蔗糖，D. Crizard等的试验结果需要7单位来自泡盛曲霉的酶才能降解1g蔗糖。

另外，通过检测根据本发明的微生物生物量的蔗糖水解效价，注意到随着柑桔青霉 KCTC 10225BP生物量的增加，蔗糖的降解也增加。

实施例3

主要培养

主要培养(大量生产)在一个5升的发酵罐(Hanil R&D Co., Ltd. Korea)中采用实施例2中种子培养的微生物进行。在发酵罐中接种微生物，其量为培养基的5%(v/v)。反应条件为Yu Moo-Young(已公开韩国专利公开No1989-01127)描述方法的改进。图2a显示采用发酵罐，振荡器的振荡速度从300rpm变化到500rpm时，微生物的生物量随培养时间的变化。如图2a所示，当振荡速度增加，

微生物的量也增加。图2b显示，细胞内外的酶量随振荡速度的变化。在500rpm的振荡速度下，50个小时后胞内酶的量有减少的倾向。这种现象被认为是由于微生物的老化和发酵罐中环境的恶化引起的。类似的，以400rpm振荡速度振荡，50小时后胞内酶的量减少。但是，没有观察到胞外酶量的增加。预计微生物分泌物增加的胞外酶的量大约为20单位，考虑到发酵罐的体积，该数量太小以致于难于检测到。图2c显示采用发酵罐在600rpm的振荡速度下，微生物生物量和胞内酶量随主要培养的发酶时间的变化。在培养时间内，微生物生物量和酶量增加。发酵罐的振荡速度增加，微生物生物量呈增加趋势。在形态学上，当振荡速度达到400rpm或以上时，可观察到微胶体，在振荡速度为200rpm或以下时可以观察到直径2毫米的大丸出现。

在酶生产方面，微生物中存在的酶量是每1克微生物1400单位的酶，存在于微生物外的酶量是每1毫升培养基含有150单位的酶。由此可见，根据本发明的微生物产生的酶量是Shinohara等的柑桔青霉FERM P-15944(日本未审专利申请No 10-165192)的2.8倍，后者含有的酶量为500单位/g。

实施例4

采用分批生产方法生产果糖低聚糖

用蔗糖溶液与实施例2中制备的微生物反应生产果糖低聚糖。用果糖低聚糖的量除以产生的传统果糖低聚糖、新果糖低聚糖、果糖、葡萄糖和残余蔗糖的总和，计算果糖低聚糖的总含量(固体%)。根据振荡速度、培养时间、蔗糖浓度、pH和温度变化，测量总果糖低聚糖含量(固体%)的变化。图3a显示的是总果糖低聚糖的产量随蔗糖浓度的变化。蔗糖溶液的浓度为60~70白利时，观察到最高的低聚糖产率。当蔗糖溶液浓度高于70白利时，蔗糖结晶为白色沉淀并和果糖低聚糖一起干扰了反应。因此，工业生产的最佳蔗糖浓度为最高至70白利。同时蔗糖浓度低时，反应可能被其它的微生物污染。因此，最佳的蔗糖浓度为65~70白利。在反应时间方面，24小时内固体比率达到最大65%，这表明本发明可以毫无疑问地用于实际工业生产。

图3b显示pH在3~7的范围内，根据本发明的果糖低聚糖含量(固体%)的变化。注意pH5~7时果糖低聚糖(固体%)的产率高。

在随后的试验中，将蔗糖溶液进行反应时，不通过加入单独的缓冲溶液来调节反应的pH值。因此，在工业生产方面，生产果糖低聚糖的方法可进一步简

化, 不需要另外处理。

图3c显示果糖低聚糖总含量(固体%)随反应温度的变化。温度高至40℃时, 果糖低聚糖总含量呈持续增加趋势。就反应速率而言, 最高的反应活性出现在45℃。24小时内反应完成。由于在高温下进行培养, 预计其他微生物污染的问题可以得到解决。但是尽管在45℃时, 酶效价比其他文件公开的高, 但是果糖低聚糖的总产量并不显著高于其他。这可以用一种已提出的理论解释, 即反应器中蔗糖水解产生的葡萄糖的积聚抑制了低聚糖的生产。

作为这种问题的解决办法, 建议消耗葡萄糖, 包括如加入葡萄糖氧化酶或酵母来消耗葡萄糖(参见Yoon, Jong-won等, 韩国生物技术和生物工程学会公报(The Bulletin of the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering), 9, 40-47, 1994)。但是在本发明中没有使用这种方法, 这是因为可能产生杂质。

图3d显示果糖低聚糖总含量(固体%)随振荡速度的变化。可以注意到随振荡速度增加, 反应活性下降。据信这是因为在高速振荡时产生的气泡减少了蔗糖溶液与微生物之间的反应面积。因此最佳的振荡速度是最高至200rpm。在本发明中使用100rpm的振荡速度生产果糖低聚糖。通过进行上述试验生产含有新果糖低聚糖的果糖低聚糖, 确定最佳的果糖低聚糖生产条件为100rpm振荡速度, 反应24小时, 反应温度为45℃, 蔗糖浓度为60~65白利。

实施例5

通过固定微生物连续生产果糖低聚糖

将实施例2中种子培养的柑桔青霉 KCTC 10225BP以5% (v/v) 培养基的量接种在5升发酵罐(Hanil R&D Co., Ltd, Korea)中并培养。在培养完成后, 收集微生物, 并将其固定在藻酸钠(Junsei Chemical, Japan)用于生产果糖低聚糖。将特定浓度的这些微生物与特定浓度的藻酸盐混合。将所得混合物使用蠕动泵(Gilson, France)以预先确定的速率通过直径1mm的针头, 以20cm的高度滴入1%氯化钙水溶液(CaCl₂), 并使用磁力搅拌器搅拌。用1%的氯化钙(CaCl₂)水溶液通过溶液中钙离子(Ca²⁺)和藻酸盐中钠离子(Na⁺)之间的离子交换反应形成珠子。为了确定微生物和藻酸盐结合的最佳浓度, 将25~100克/升的微生物与1~2%的藻酸盐混合。结果发现最高达50克/升的微生物和最高达1.5%的藻酸盐混合形成很好的球状珠子。超过前述浓度条件时, 由于粘性增加, 形成了形状不均

匀的珠子。因此，本实施例中采用50克/升的微生物与1.5%形状的藻酸盐混合生产珠子。所得珠子在4℃下贮存10小时，用蒸馏水洗涤，浸入4℃60白利的蔗糖溶液中老化10小时。然后将这些珠子装在1升的玻璃柱子中，将60白利的蔗糖溶液流过这个柱子。此时反应温度为45℃，蔗糖溶液通过蠕动泵以200毫升/小时的速率注入。图4显示40天内用固定连续法生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖的产量变化。可以看到生产的果糖低聚糖的总固体含量(%)恒定在55%~60%的范围之内，珠子的形状和硬度与初始状态没有不同。

通过进行上述试验生产含新果糖低聚糖的果糖低聚糖，发现用固定连续方法生产果糖低聚糖的最佳条件为：蔗糖浓度为60白利，反应温度45℃，蔗糖溶液的流速为150~200毫升/小时。

实施例6

果糖低聚糖分析

采用高压液相色谱 (HPLC) 系统 (Shimadzu, Japan) 分析实施例4和实施例5获得的果糖低聚糖。采用了Daiso Co., Ltd. (Osaka, Japan) 生产的ODS柱(5微米, 150mm x 4mm)和折射率检测器。由于已经探测到一种不同于传统果糖低聚糖的物质，采用了Waters Corp. (Massachusetts, USA) 生产的真制备型高压液相色谱 (Prep-HPLC) 系统分离产物。采用ARX 400 MHz NMR 分光计 (Bruker, Germany) 对所得组分进行NMR分析以确定它们的结构。试验结果见如下表4

表4

蔗果三糖		新蔗果三糖		霉菌赤藓醛糖		新霉菌赤藓醛糖	
成分	δc	成分	δc	成分	δc	成分	δc
¹ F ₁ 1	63.7	⁶ F ₁ 1	63.00	¹ F ₁ 1	63.82	¹ F ₁ 1	62.99
2	106.7	2	106.41	2	106.0	2	106.36
3	79.4	3	79.58	3	79.6	3	79.58
4	76.6	4	77.13	4	76.6	4	77.10
5	84.0	5	83.86	5	84.0	5	83.82
6	65.0	6	65.08	6	64.98	6	65.03
¹ F ₂ 1	63.2	¹ F ₁ 1	64.25	¹ F ₂ 1	63.63	¹ F ₂ 1	63.77
2	106.5	2	106.43	2	105.8	2	105.97
3	79.4	3	79.04	3	80.3	3	79.19
4	77.2	4	76.70	4	77.2	4	76.52
5	83.9	5	84.06	5	83.8	5	83.91
6	65.1	6	65.12	6	65.04	6	64.90
G 1	95.3	G 1	94.72	¹ F ₃ 1	63.16	¹ F ₃ 1	63.17
2	73.9	2	73.73	2	106.4	2	106.42
3	75.4	3	75.17	3	79.5	3	79.36
4	72.0	4	71.94	4	77.1	4	77.20
5	75.2	5	74.26	5	83.8	5	83.82
6	62.9	6	63.08	6	65.03	6	65.03
				G 1	95.3	G 1	94.97
				2	73.9	2	73.75
				3	75.4	3	75.26
				4	72.0	4	71.90
				5	75.2	5	74.27
				6	62.89	6	63.03

如上表所示, 可以证明采用根据本发明的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP生产的果糖低聚糖含有传统的果糖低聚糖(结构式I), 还含有结构不同于传统果

糖低聚糖的新果糖低聚糖(结构式2)。因此,证明在本发明中使用的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP可以同时生产传统果糖低聚糖和具有不同结构的新果糖低聚糖。

工业实用性

如上所述,本发明鉴定了一种新的微生物柑桔青霉 KCTC 10225BP,它能够水解蔗糖成为传统果糖低聚糖和新果糖低聚糖。从柑桔青霉 KCTC 10225BP制备的果糖转移酶具有比传统的微生物产生的酶高得多的蔗糖水解效价。因此,使用柑桔青霉 KCTC 10225BP能够低成本高收率地生产果糖低聚糖和新果糖低聚糖。

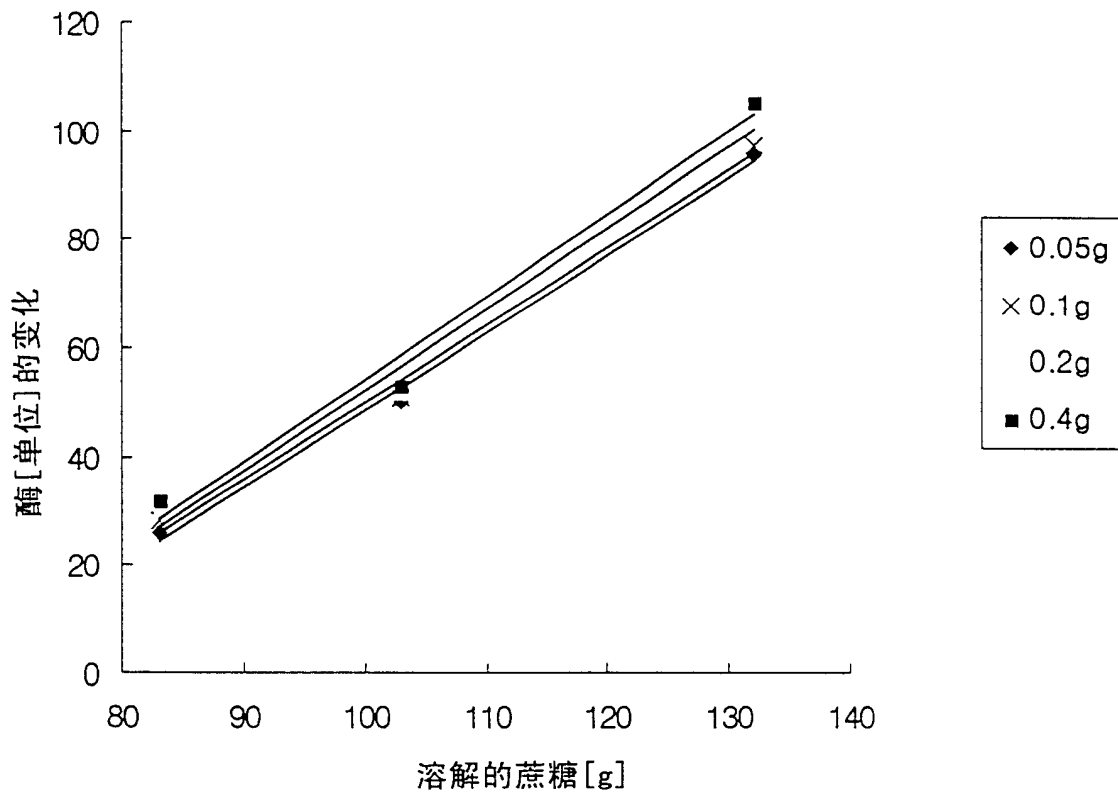


图 1

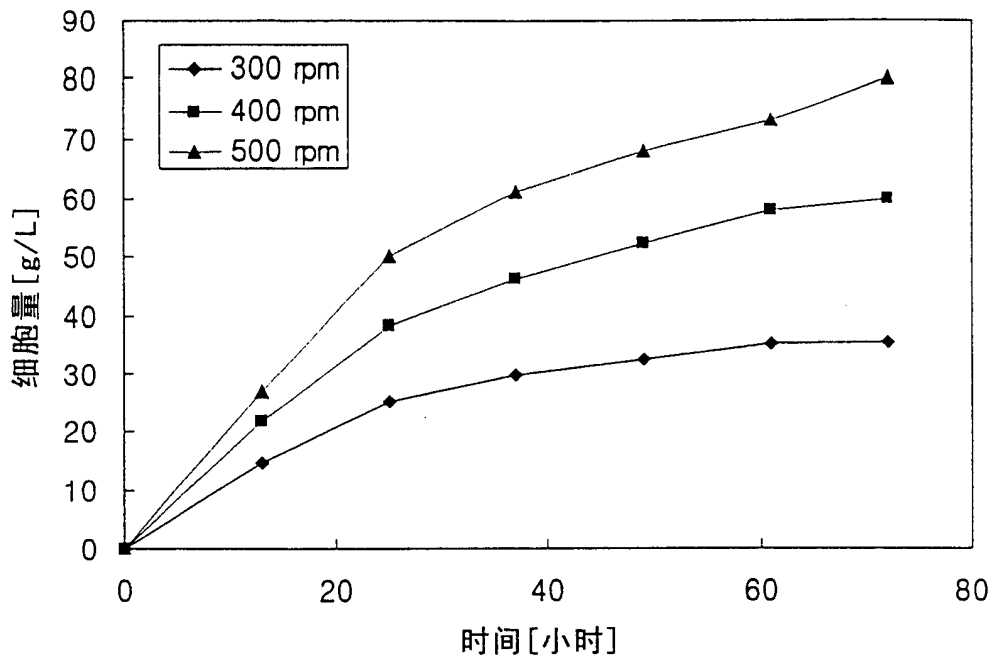


图 2A

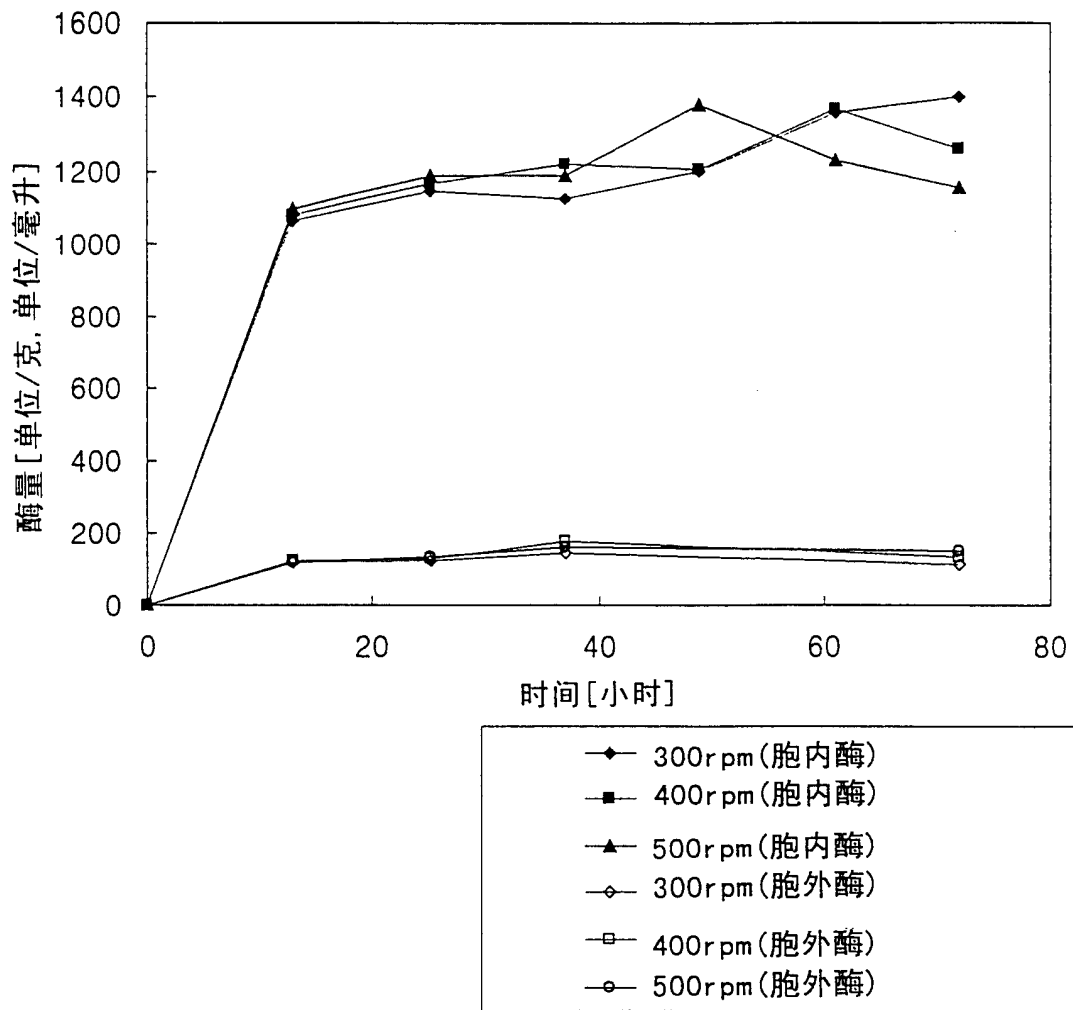


图 2B

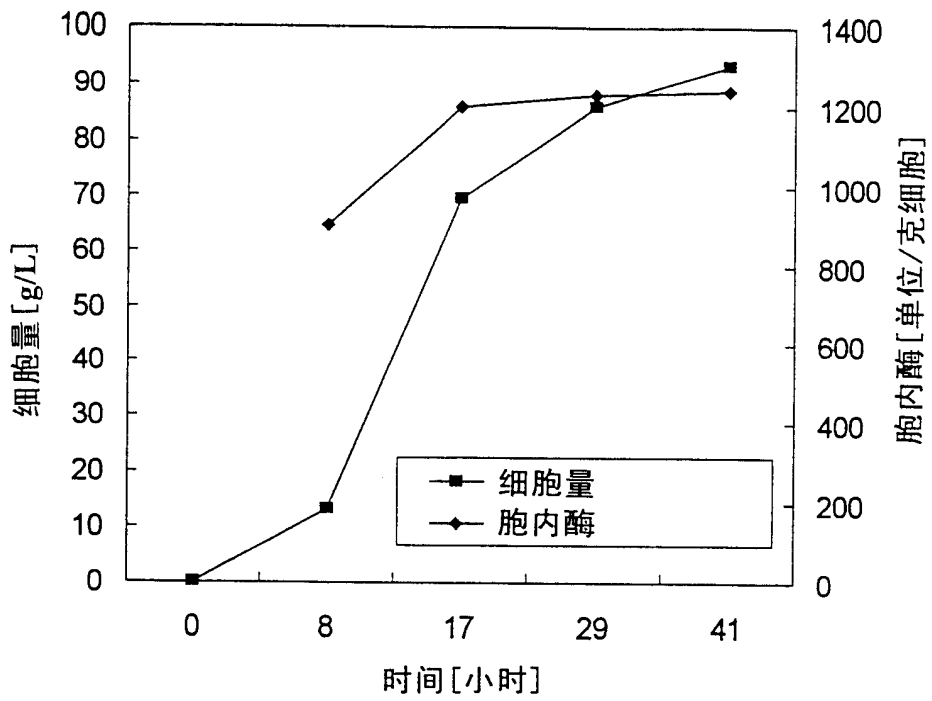


图 2C

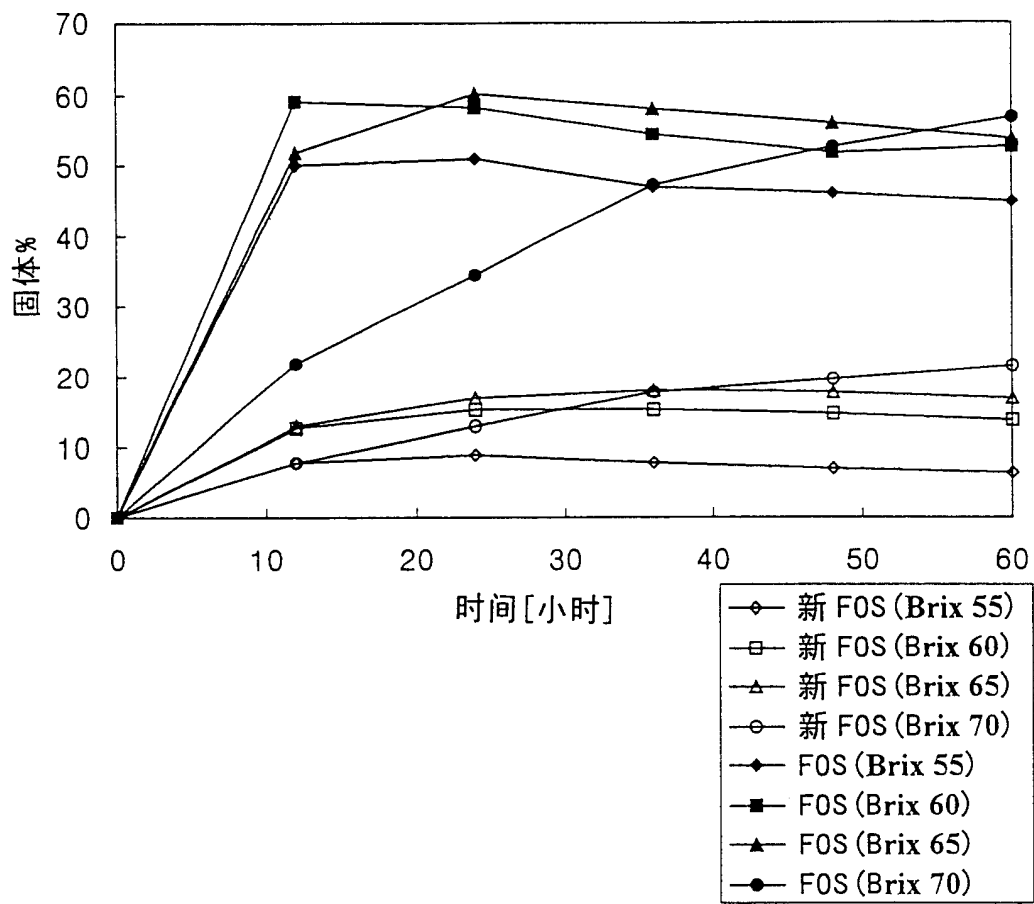


图 3A

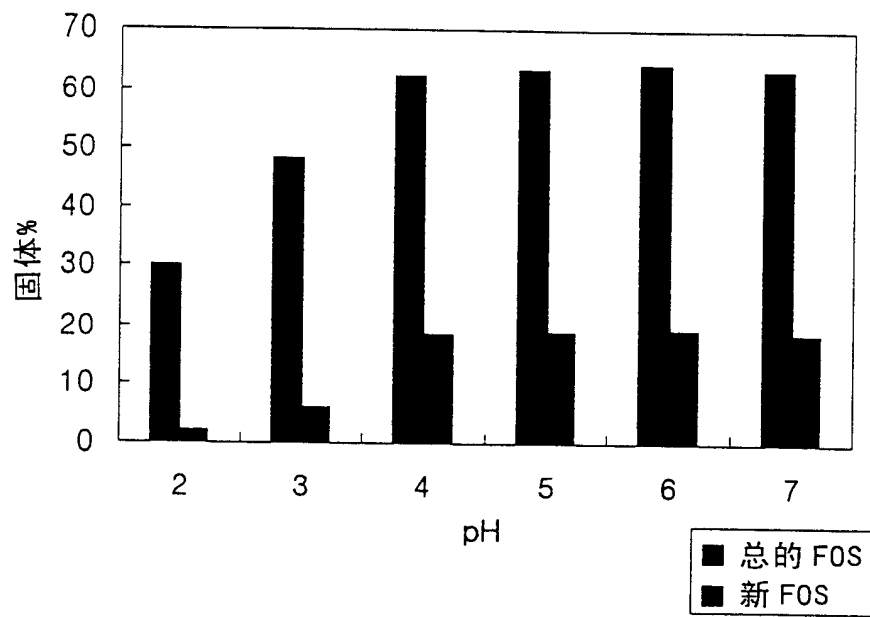


图 3B

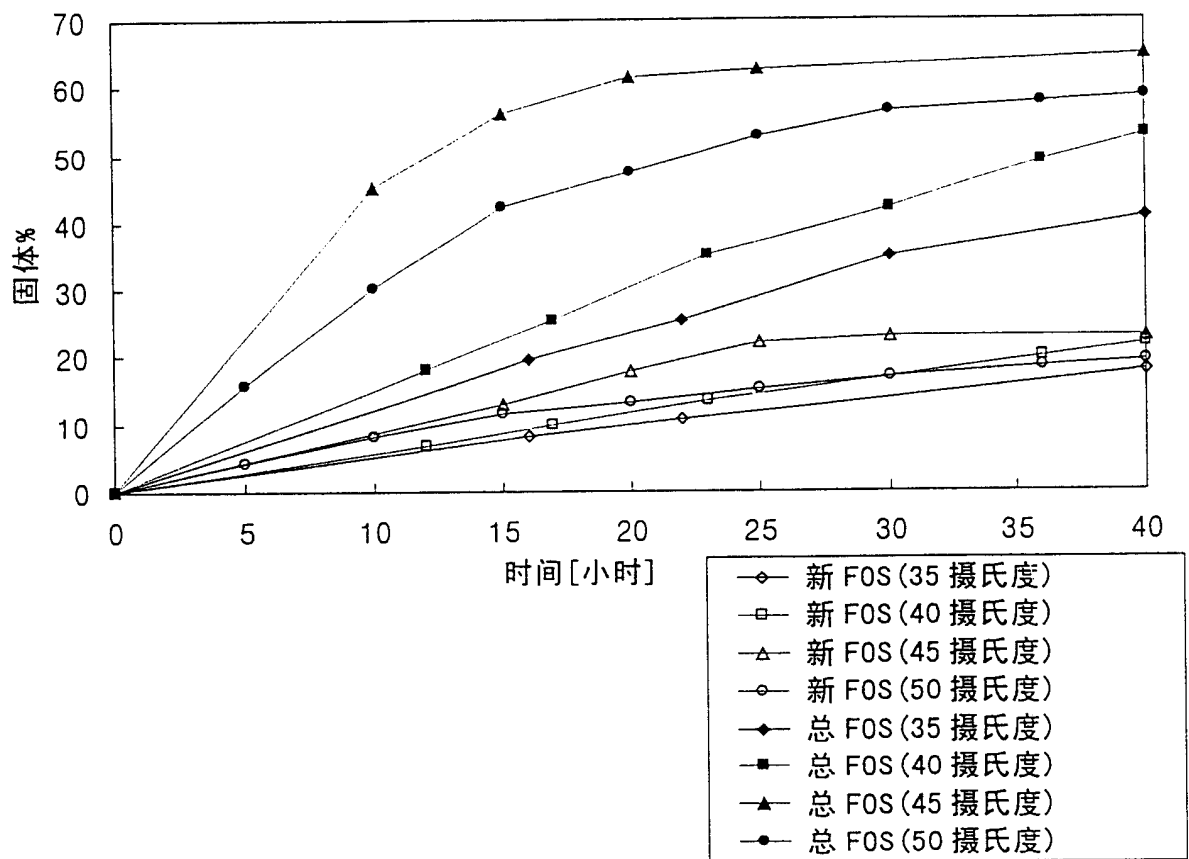


图 30

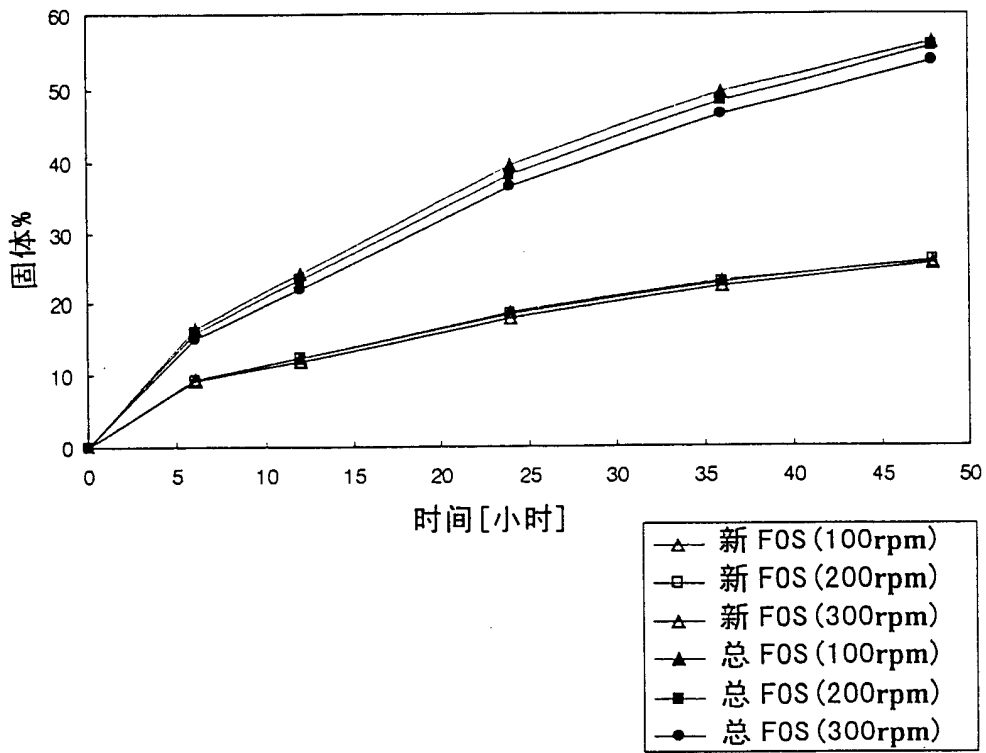


图 3D

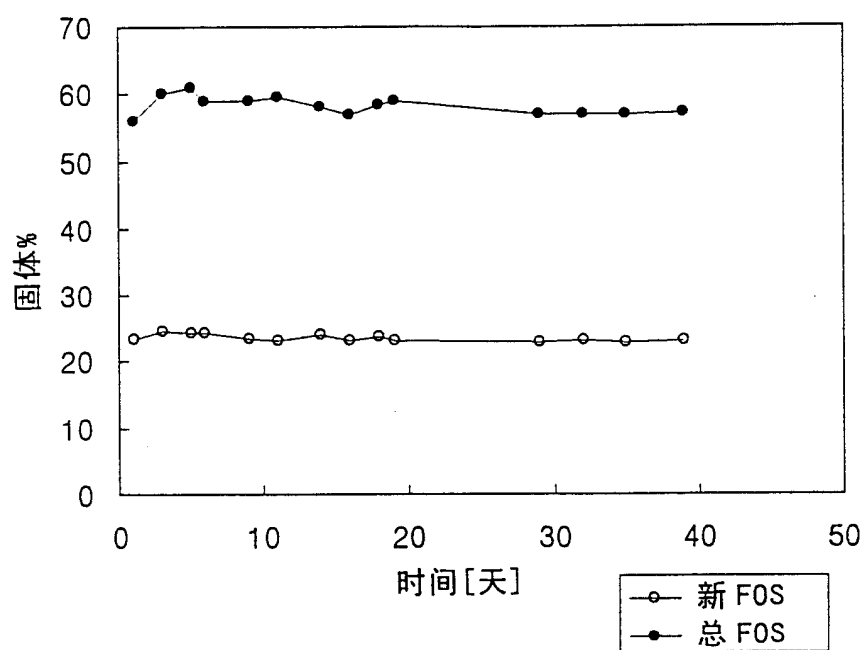


图 4