

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2020年7月2日 (02.07.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/135893 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C12N 1/14* (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)  
*C12N 9/38* (2006.01) *C12R 1/69* (2006.01)  
*C12P 19/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/075704

(22) 国际申请日: 2020年2月18日 (18.02.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201811596603.7 2018年12月26日 (26.12.2018) CN

(71) 申请人: 山东百龙创园生物科技股份有限公司(SHANDONG BAILONG CHUANGYUAN BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。

(72) 发明人: 李方华(LI, Fanghua); 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。 干昭波(GAN, Zhaobo); 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。 窦光朋(DOU, Guangpeng); 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。 邵先豹(SHAO, Xianbao); 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。 张明站(ZHANG, Mingzhan); 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。 杜倩(DU, Qian); 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。 杨腾腾(YANG, Tengting); 中国山东省德州市(禹城)国家高新技术产业开发区德信大街, Shandong 251200 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW

OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
- 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息(细则26之二.3和48.2(b)(vii))。

(54) Title: ASPERGILLUS ORYZAE BLCY-006 STRAIN AND APPLICATION THEREOF IN PREPARATION OF GALACTOOLIGOSACCHARIDE

(54) 发明名称: 一株米曲霉BLCY-006及其在制备低聚半乳糖中的应用

(57) Abstract: Provided are an aspergillus oryzae BLCY-006 strain and an application thereof in the preparation of a galactooligosaccharide. The strain produces  $\beta$ -galactosidase, and the enzyme activity can reach 300U/ml after culturing and fermentation, which is more than 50% higher than traditional  $\beta$ -galactosidase activity. The enzyme also has lactose and glucose resistance properties.

(57) 摘要: 提供了一株米曲霉(AspergillusoryZae) BLCY-006及其在制备低聚半乳糖中的应用, 所述菌株产P-半乳糖苷酶, 经培养发酵后酶活可达到300U/ml, 相对于传统P-半乳糖苷酶活力提高50%以上, 还具有耐乳糖和葡萄糖的特性。



WO 2020/135893 A1

## 一株米曲霉 BLCY-006 及其在制备低聚半乳糖中的应用

### 技术领域

本发明涉及一株米曲霉 BLCY-006 及其在制备低聚半乳糖中的应用，  
5 属于微生物技术领域。

### 背景技术

米曲霉属半知菌亚门，丝孢纲，丝孢目，从梗孢科。曲霉属真菌中的一个常见种，其分布甚广，主要分布在粮食、发酵食品、腐败有机物  
10 和土壤等处。米曲霉是我国传统酿造食品酱和酱油的生产菌种，其也可用于生产淀粉酶、蛋白酶、果胶酶和曲酸等。

低聚半乳糖(Galactooligosaccharides, GOS)是一种功能性低聚糖，其分子结构一般是在半乳糖或葡萄糖分子上连接 1~7 个半乳糖基。在自然界中，动物的乳汁中存在微量的 GOS，人母乳中的 GOS 含量较多。  
15 婴儿体内的双歧杆菌菌群的建立很大程度上依赖母乳中的 GOS 成分。低聚半乳糖具有较强的耐酸性、耐热性，其不被人小肠消化吸收，但可被结肠菌群发酵。同时，低聚半乳糖对肠内的双歧杆菌和乳酸菌具有同时增殖的作用，且能抑制有害病原菌和腐败菌生长。此外，低聚半乳糖不被突变链球菌等口腔细菌利用，可降低龋齿发生率。低聚半乳糖还能  
20 促进钙、镁、钾的吸收，降低钠吸收，以及降低总胆固醇和甘油三酯水平，可改善脂质代谢，以及能有效刺激肠道蠕动，减少和防止便秘的发生，调节肠道微生态、促进肠道健康。低聚半乳糖的安全性已经受到广泛认可。2010 年，低聚半乳糖在日本成为第二大功能性低聚糖产品，2008 年 9 月，中国将它列入了新资源食品目录。

当前生产低聚半乳糖的方法主要是菌种发酵法和酶转化法。菌种发酵法是指用产  $\beta$ -半乳糖苷酶的菌种直接发酵乳糖溶液生产低聚半乳糖。该方法的缺点是生产的低聚半乳糖纯度不高，后续提纯困难。酶转化法是指先培养产酶菌种，然后提取  $\beta$ -半乳糖苷酶进行酶转化生产低聚半乳糖，该方法目前存在的问题是提取的酶活较低，转化过程中受到反应中高含量的副产物葡萄糖的影响造成转化率低，生产成本高居不下。

中国专利文献 CN101691538A 公开了一种高纯度低聚半乳糖的制备方法，包括米曲霉发酵，陶瓷膜超滤、纳滤分离等产品分离纯化步骤。其采用土壤中分离的 *Aspergillus oryzae* 米曲霉为出发菌株，经诱变筛选得到米曲霉 BLB-21(保藏号 CGMCCNo.2951)。然后该米曲霉被用于直接发酵高浓度乳糖溶液。不过，该专利仍然存在  $\beta$ -半乳糖苷酶活性较低，制备的低聚半乳糖纯度和收率较低等问题。

### 发明内容

15 本发明针对现有技术的不足，提供一株米曲霉 BLCY-006 及其在制备低聚半乳糖中的应用。

本发明还提供一种米曲霉 BLCY-006 的培养方法。

本发明的技术方案如下：

20 一株米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006，2018年12月5日保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号 CGMCC No.16965，地址：北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所。

本发明所述米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的原始菌株分离于中国山东德州百龙创园低聚半乳糖生产车间附近的土壤，并经过反复多次诱变、筛选，获得。

该菌株初呈白色、黄色，后转黄褐色至淡绿褐色。分生孢子头呈放射状，直径 150~300 $\mu$ m，也有少数为疏松柱状。分生孢子梗 2mm 左右。该菌株可高产  $\beta$ -半乳糖苷酶，经培养发酵后该酶的酶活可达到 300U/ml，相对于传统  $\beta$ -半乳糖苷酶活力提高 50%以上。同时，该酶还具有耐乳糖和葡萄糖的特性，其应用于低聚半乳糖生产中可大大提高乳糖转化成低聚半乳糖的能力，显著降低生产成本。

上述米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的培养方法包括以下步骤：

(1)取米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 接种于固体培养基中，在 28~35 $^{\circ}$ C 的条件下，活化培养 20~30h，制得活化菌株；

(2)取步骤(1)制得的活化菌株，接种于种子培养基中，在 28~35 $^{\circ}$ C 的条件下，增殖培养 20~30h，制得种子液；

(3)取步骤(2)制得的种子液，按体积比 2~10%的比例接种于发酵培养基中，在 28~35 $^{\circ}$ C，扩大培养 25~35h，即得菌体发酵液。

根据本发明优选的，所述步骤(2)中的种子培养基组分如下，均为重量百分比：

硝酸铵 0.2%，硫酸铵 0.1%，磷酸二氢钾 0.1%，尿素 0.05%，蛋白胨 1%，蔗糖 2%，葡萄糖 5%，余量水，pH 为 4.5~6.5。

根据本发明优选的，所述步骤(3)中的发酵培养基组分如下，均为重量百分比：

蔗糖 5%，葡萄糖 5%，蛋白胨 1%，硫酸铵 0.1%，磷酸二氢钾 0.1%，余量水。

根据本发明优选的，所述步骤(1)中的固体培养基为本领域常规 PDA 固体培养基。

5 上述米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 在制备低聚半乳糖中的应用，其特征在于，步骤包括：

(a)按照上述米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的培养方法制备得到菌体发酵液，经过滤收集菌体；

10 (b)将步骤(a)收集到的菌体加入预冷的磷酸缓冲液然后与经过预处理的吸附剂进行反应，反应时间为 5~25h，使菌体固定在吸附剂表面，制得  $\beta$ -半乳糖苷酶；

(c)配制质量浓度为 40~60%的乳糖溶液，将步骤(b)得到的  $\beta$ -半乳糖苷酶加入到乳糖溶液中，保温反应后 12h 后，制得低聚半乳糖粗溶液；

15 (d)将步骤(c)制得的低聚半乳糖粗溶液经脱色、过滤、离子交换、色谱分离、浓缩、干燥得到低聚半乳糖。

根据本发明优选的，所述步骤(a)中，过滤采用板框式压滤机过滤，工作压力为 0.3~0.5MPa，流速为 5~10m<sup>3</sup>/h。

根据本发明优选的，所述步骤(b)中，吸附剂选自氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷或纤维素。

20 根据本发明优选的，步骤(c)中，所述  $\beta$ -半乳糖苷酶的加入量，以乳糖质量计，为 0.1~10wt%。

根据本发明优选的，步骤(c)中，所述保温反应的温度为 30~60℃。

根据本发明优选的，步骤(d)中，所述脱色所需活性炭添加量为0.1wt%，脱色时间为1.5h；所述色谱分离的运行压力为0.2MPa，温度为60℃，水耗比1:1.2，每小时进料1.8m<sup>3</sup>。

本发明未详细说明的实验步骤可按照文献记载或现有技术进行。

- 5 在一些方面，提供一种β-半乳糖苷酶，包括吸附剂和固定在吸附剂上的含酶米曲霉，所述含酶米曲霉由米曲霉 BLCY-006 制得。

### 有益效果

1. 本发明从土壤中分离出米曲霉菌种，在经过紫外诱变、离子注入  
10 诱变处理等诱变处理技术，最后获得高产β-半乳糖苷酶的高产菌株，命名为 BLCY-006。其酶活达到 300U/ml，相对于传统β-半乳糖苷酶活力提高 50%以上，同时该酶还具有耐葡萄糖、乳糖的特性，其应用于低聚半乳糖生产中可大大提高乳糖转化成低聚半乳糖的能力，显著降低生产成本。

15 2. 本发明制备获得了β-半乳糖苷酶，酶的使用效率有所提高，对乳糖的利用率显著提高，所产低聚半乳糖粗溶液中低聚半乳糖的含量也显著提升，极大地降低后续低聚半乳糖提纯的难度和成本，并显著提高低聚半乳糖成品的质量。

### 20 具体实施方式

下面结合实施例对本发明的技术方案做进一步阐述，但本发明所保护范围不限于此。

本发明中所涉及材料及药品均为普通市售产品。

β-半乳糖苷酶酶活力测定方法：

准确称取邻硝基苯酚- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)底物 0.1g, 溶于 40mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液(pH5.2, 0.1mol/L), 即为浓度为 0.25%(W/V)的 ONPG 溶液。使用 pH5.2, 0.1mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸将待测菌体发酵液稀释至合适倍数, 吸取 800 $\mu$ l 的底物溶液加入试管中, 5 于 60 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中预热 2min, 加入 200 $\mu$ l 稀释后酶液混匀, 反应 15min 后依次加入 2ml 1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液终止反应。测定 420nm 处的光吸收值(OD420)。以加入  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液(浓度为 0.1mol/L, pH5.2)作为空白对照, 利用标准曲线, 计算反应生成的邻硝基酚(ONP)的量, 进而计算出  $\beta$ -半乳糖苷酶的酶活力。

10 酶活力单位定义: 一个单位(1U)的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性指在 60 $^\circ\text{C}$ , pH5.2 条件下, 每分钟催化底物邻硝基苯酚- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)生成 1 $\mu$ mol 邻硝基酚(ONP)所需的酶量。

生物材料:

一株米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006, 2018 年 12 月 5 日保存 15 于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号 CGMCCNo.16965, 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所。

实施例 1

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的筛选过程如下:

20 (1)富集培养

选取山东德州百龙创园低聚半乳糖生产车间附近的土壤, 用小铲子除去表土, 取离地面 5~15cm 处的土壤约 10g, 用无菌水稀释 10 倍, 加入 PDA 培养基进行富集培养, 培养基成分如下:

马铃薯 200 克、葡萄糖 20 克、琼脂 15~20 克、去离子水 1000 毫升、硝酸铵 0.2%；硫酸铵 0.1%；磷酸氢二钾 0.1%；PH6.5~7.0。

培养基制作方法如下

200g 马铃薯切成小块，加水煮烂(煮沸 20~30 分钟，能被玻璃棒戳破即可)，用八层纱布过滤，加热，再据实际实验需要加 1~10g 琼脂，硝酸铵 0.2%；硫酸铵 0.1%；磷酸氢二钾 0.1%继续加热搅拌混匀，待琼脂溶解完后，加入葡萄糖，搅拌均匀，稍冷却后再补足去离子水分至 1000 毫升，分装试管或者锥形瓶，加塞、包扎，(121℃)灭菌 20 分钟左右后取出试管摆斜面或者摇匀，冷却后贮存备用。

## 10 (2)纯种分离

采用划线分离法，取一支盛有 5ml 无菌水的大试管，取步骤(1)中富集培养后的菌液 2ml 放入其中稀释，充分振荡分散，用接种环以无菌操作挑取稀释液一环先在平板培养基一边做第一次平行划线 3~4 条，再转动培养皿约 60 度角，将接种环上剩余物烧掉，待冷却后同一次划线方法做第二次划线，同法依次做第三次和第四次划线。划线完毕，盖上皿盖，将培养皿倒置，28~35℃培养 30h 后，挑取单个菌落接种于 10 个斜面培养基上，分别编号 01~10。

将 01~10 斜面种子接种于摇瓶培养基中培养 28~35℃培养 30h，对 01~10 摇瓶发酵液的  $\beta$ -半乳糖苷酶酶活进行测定，08 号摇瓶酶活最高，达到 105U/ml。

平板培养基成分如下：

马铃薯 200 克、葡萄糖 20 克、琼脂 15~20 克、去离子水 1000 毫升、硝酸铵 0.2%；硫酸铵 0.1%；磷酸氢二钾 0.1%；PH6.5~7.0。

摇瓶培养基成分如下：

100ml 豆饼浸出汁中加入可溶性淀粉 2 克, 磷酸二氢钾 0.1 克, 硫酸镁 0.05 克, 硫酸铵 0.05 克, 琼脂 2 克, 自然 pH。

所述豆饼浸出汁制作方法: 100 克豆饼, 加水 500ml, 浸泡 4 小时, 煮沸 3~4 小时, 纱布自然过滤, 取液, 调整至 5 波美度。

### 5 (3)诱变筛选

对 08 号菌种进行紫外线诱变, 紫外线诱变采用 20W 紫外线灯 15cm 照射, 照射时间为 200s, 得到的高产菌种再进行离子注入诱变处理, 最终得到高产  $\beta$ -半乳糖苷酶的高产菌株命名为 BLCY-006, 其酶活达到 300U/ml。该菌株初呈白色、黄色, 后转黄褐色至淡绿褐色。分生孢子头呈放射状, 直径 150~300 $\mu$ m, 也有少数为疏松柱状。分生孢子梗 2mm 左右。经鉴定, 该菌株为米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。

上述米曲霉(*Aspergillus oryzae*), 命名为 BLCY-006, 2018 年 12 月 5 日保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号 CGMCCNo.16965, 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所。

### 实施例 2

实施例 1 所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的培养方法, 步骤包括:

(1)取米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 接种于 PDA 培养基中, 在 30 $^{\circ}$ C 的条件下, 活化培养 30h, 制得活化菌株;

(2)取步骤(1)制得的活化菌株, 接种于种子培养基中, 在 30 $^{\circ}$ C 的条件下, 增殖培养 30h, 制得种子液;

所述种子培养基组分如下:

100ml 豆饼浸出汁中加入可溶性淀粉 2 克, 磷酸二氢钾 0.1 克, 硫酸镁 0.05 克, 硫酸铵 0.05 克, 琼脂 2 克, 自然 pH;

所述豆饼浸出汁制作方法: 100g 豆饼, 加水 500ml, 浸泡 4 小时, 煮沸 3~4 小时, 纱布自然过滤, 取液, 调整至 5 波美度。

- 5 (3)取步骤(2)制得的种子液, 按体积比 1%的比例接种于发酵培养基中, 在 30℃, 扩大培养 35h, 即得菌体发酵液;

所述发酵培养基组分如下, 均为重量百分比:

蔗糖 10%, 麸皮 2%, 酵母膏 1%, 硝酸钠 0.3%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%, 余量水。

### 10 实施例 3

实施例 1 所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的培养方法, 步骤包括:

(1)取米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 接种于 PDA 培养基中, 在 35℃的条件下, 活化培养 20h, 制得活化菌株;

- 15 (2)取步骤(1)制得的活化菌株, 接种于种子培养基中, 在 35℃的条件下, 增殖培养 20h, 制得种子液;

所述种子培养基组分如下:

100ml 豆饼浸出汁中加入可溶性淀粉 2 克, 磷酸二氢钾 0.1 克, 硫酸镁 0.05 克, 硫酸铵 0.05 克, 琼脂 2 克, 自然 pH;

- 20 所述豆饼浸出汁制作方法: 100 克豆饼, 加水 500ml, 浸泡 4 小时, 煮沸 3-4 小时, 纱布自然过滤, 取液, 调整至 5 波美度。

(3)取步骤(2)制得的种子液, 按体积比 10%的比例接种于发酵培养基中, 在 38℃, 扩大培养 20h, 即得菌体发酵液;

所述发酵培养基组分如下, 均为重量百分比:

蔗糖 10%，麸皮 2%，酵母膏 1%，硝酸钠 0.3%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%，余量水。

#### 实施例 4

实施例 1 所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的培养方法，  
5 步骤包括：

(1)取米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 接种于 PDA 培养基中，  
在 32℃ 的条件下，活化培养 25h，制得活化菌株；

(2)取步骤(1)制得的活化菌株，接种于种子培养基中，在 32℃ 的条  
件下，增殖培养 25h，制得种子液；

10 所述种子培养基组分如下：

100ml 豆饼浸出汁中加入可溶性淀粉 2 克，磷酸二氢钾 0.1 克，硫  
酸镁 0.05 克，硫酸铵 0.05 克，琼脂 2 克，自然 pH；

所述豆饼浸出汁制作方法：100 克豆饼，加水 500ml，浸泡 4 小时，  
煮沸 3-4 小时，纱布自然过滤，取液，调整至 5 波美度。

15 (3)取步骤(2)制得的种子液，按体积比 10%的比例接种于发酵培养  
基中，在 38℃，扩大培养 20h，即得菌体发酵液；

所述发酵培养基组分如下，均为重量百分比：

蔗糖 10%，麸皮 2%，酵母膏 1%，硝酸钠 0.3%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
0.05%，余量水。

20 对比例 1

取从土壤中得到、但还未做诱变、筛选前的米曲霉原始菌株进行培  
养，培养条件与实施例 2 相同。

对比例 2

中国专利文献 CN101691538A(申请号: 200910018452.1)公开了一种高纯度低聚半乳糖的制备方法。取该专利公开的米曲霉 BLB-21(保藏号 CGMCCNo.2951)进行培养, 培养条件与实施例 2 相同。

### 实验例 1

- 5 取实施例 2~4 以及对比例 1~2 培养得到的菌体发酵液, 检测发酵液中  $\beta$ -半乳糖苷酶的酶活结果如下表 1:

表 1 菌体发酵液酶活

组别	$\beta$ -半乳糖苷酶酶活
实施例 2	305U/mL
实施例 3	311U/mL
实施例 4	315U/mL
对比例 1	162U/mL
对比例 2	189U/mL

- 由表 1 数据可以看出, 实施例 2-4 与对比例 1-2 相比, 通过本发明提供的米曲霉 BLCY-006 制备的菌体发酵液中  $\beta$ -半乳糖苷酶酶活有显著  
10 的提高。

### 实验例 2

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 在制备  $\beta$ -半乳糖苷酶中的应用, 步骤包括:

- (a)取实施例 2~4 与对比例 1~2 制备的菌体发酵液经板框式压滤机过  
15 滤, 工作压力为 0.3~0.5MPa, 流速为 5~10m<sup>3</sup>/h, 收集菌体;

(b)将步骤(a)收集到的菌体加入预冷的磷酸缓冲液然后与经过预处理的吸附剂进行反应, 反应时间为 15h, 使菌体固定在硅藻土表面, 制得  $\beta$ -半乳糖苷酶;

(c)配制质量浓度为 40%和 60%的乳糖溶液，将步骤(b)得到的  $\beta$ -半乳糖苷酶加入到乳糖溶液中，以乳糖质量计，加入量为 5wt%，保温反应后 12h 后，制得低聚半乳糖粗溶液；

(d)将步骤(c)制得的低聚半乳糖粗溶液经脱色、过滤、离子交换、  
5 色谱分离、浓缩、干燥得到低聚半乳糖。

其中，步骤(d)中脱色所需活性炭添加量为 0.1wt%，脱色时间为 1.5h；色谱分离的运行压力为 0.2MPa，温度为 60℃，水耗比 1:1.2，每小时进料 1.8m<sup>3</sup>。

取步骤(c)制备得到的低聚半乳糖粗溶液，检测其中的葡萄糖含量、  
10 乳糖含量、半乳糖含量以及低聚半乳糖含量；取步骤(d)制得的低聚半乳糖检测低聚半乳糖纯度及收率，结果如表 2~3 所示。

表 2 40%乳糖溶液制备低聚半乳糖的各项指标

	低聚半乳糖粗溶液				低聚半乳糖	
	半乳糖 含量/%	葡萄糖 含量/%	乳糖 含量/%	低聚半乳糖 含量/%	低聚半乳糖 纯度%	低聚半乳糖 收率/%
实施例 2	5.48	21.36	11.64	61.52	76.71	92.95
实施例 3	5.76	20.33	11.62	62.29	86.59	93.12
实施例 4	6.07	21.44	11.16	61.33	86.22	93.01
对比例 1	7.93	32.36	19.13	40.24	70.39	75.32
对比例 2	9.69	28.75	16.01	45.55	72.47	77.25

表 3 60%乳糖溶液制备低聚半乳糖的各项指标

	低聚半乳糖粗溶液				低聚半乳糖	
	半乳糖 含量/%	葡萄糖 含量/%	乳糖 含量/%	低聚半乳糖 含量/%	低聚半乳糖 纯度%	低聚半乳糖 收率/%
实施例 2	4.54	22.56	11.59	61.31	86.32	92.83

实施例 3	5.07	21.14	11.44	62.35	86.45	93.26
实施例 4	5.70	21.29	11.26	61.75	86.17	93.14
对比例 1	7.93	32.36	19.13	40.58	70.25	75.28
对比例 2	11.02	28.95	15.31	44.72	72.36	77.39

通过以上数据可以看出，应用本发明提供的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 制备的菌体发酵液，实施例 2~4 制备的低聚半乳糖粗溶液中对乳糖的利用率不低于 88%，低聚半乳糖含量达到了 61%以上；而对比例 1~2 对乳糖的利用率仅有 81%左右，低聚半乳糖粗溶液中低聚半乳糖含量仅为 40%左右。通过对比可以发现应用本发明提供的米曲霉用于制备低聚半乳糖，对乳糖的利用率显著提高，所产低聚半乳糖粗溶液中低聚半乳糖的含量也显著提升。

从最后得到的低聚半乳糖产物中分析，实施例 2~4 制备的低聚半乳糖的纯度均在 85%以上，对比例 1~2 制备的低聚半乳糖的纯度均不超过 75%。利用实施例 2~4 的菌体发酵液制备的低聚半乳糖收率为 92%左右，而利用对比例 1~2 的菌体发酵液制备的低聚半乳糖收率仅为 75%左右。实施例 2~4 相比于对比例 1~2 中低聚半乳糖的纯度和收率都有显著提高。

## 权 利 要 求

1.一株米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006, 2018年12月5日保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号 CGMCC No.16965, 地址: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所。

2.权利要求1所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006的培养方法, 其特征在于, 步骤包括: (1)取米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006接种于固体培养基中, 在28~35℃的条件下, 活化培养20~30h, 制得活化菌株; (2)取步骤(1)制得的活化菌株, 接种于种子培养基中, 在28~35℃的条件下, 增殖培养20~30h, 制得种子液; (3)取步骤(2)制得的种子液, 按体积比2~10%的比例接种于发酵培养基中, 在28~35℃, 扩大培养25~35h, 即得菌体发酵液。

3.如权利要求2所述的培养方法, 其特征在于, 步骤(2)中所述种子培养基组分如下, 均为重量百分比: 硝酸铵0.2%; 硫酸铵0.1%; 磷酸二氢钾0.1%; 尿素0.05%; 蛋白胨1%; 蔗糖2%; 葡萄糖5%, 余量水, pH为4.5~6.5。

4.如权利要求2所述的培养方法, 其特征在于, 步骤(3)中所述发酵培养基组分如下, 均为重量百分比: 蔗糖5%, 葡萄糖5%, 蛋白胨1%, 硫酸铵0.1%; 磷酸二氢钾0.1%, 余量水。

5.如权利要求 2 所述的培养方法，其特征在于，步骤(1)中所述固体培养基为常规 PDA 固体培养基。

6.权利要求 1 所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 在制备低聚半乳糖中的应用，其特征在于，包括如下步骤：(a)按照权利要求 2 所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006 的培养方法制备得到菌体发酵液，经过滤收集菌体；(b)将步骤(a)收集到的菌体加入预冷的磷酸缓冲液然后与经过预处理的吸附剂进行反应，反应时间为 5~25h，使菌体固定在吸附剂表面，制得  $\beta$ -半乳糖苷酶；(c)配制质量浓度为 40~60% 的乳糖溶液，将步骤(b)得到的  $\beta$ -半乳糖苷酶加入到乳糖溶液中，保温反应后 12h 后，制得低聚半乳糖粗溶液；(d)将步骤(c)制得的低聚半乳糖粗溶液经脱色、过滤、离子交换、色谱分离、浓缩、干燥得到低聚半乳糖。

7.如权利要求 6 所述的应用，其特征在于，步骤(a)中所述过滤采用板框式压滤机过滤，工作压力为 0.3~0.5MPa，流速为 5~10m<sup>3</sup>/h。

8.如权利要求 6 所述的应用，其特征在于，步骤(b)中所述吸附剂选自氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷或纤维素。

9.如权利要求 6 所述的应用，其特征在于，步骤(c)中所述  $\beta$ -半乳糖苷酶的加入量，以乳糖质量计，为 0.1~10wt%；所述保温反应的温度为 30~60℃。

10.如权利要求 6 所述的应用，其特征在于，步骤(d)中所述脱色所需活性炭添加量为 0.1wt%，脱色时间为 1.5h；所述色谱分离的运行压力为 0.2MPa，温度为 60℃，水耗比 1:1.2，每小时进料 1.8m<sup>3</sup>。

11. 一种  $\beta$ -半乳糖苷酶，包括吸附剂和固定在吸附剂上的含酶米曲霉，所述含酶米曲霉由权利要求 1 所述的米曲霉 BLCY-006 制得。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2020/075704**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12N 1/14(2006.01)i; C12N 9/38(2006.01)i; C12P 19/00(2006.01)i; C12P 19/14(2006.01)i; C12R 1/69(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; C12P; C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 米曲霉, 低聚半乳糖, $\beta$ -半乳糖苷酶, 发酵, 酶活, 乳糖, 葡萄糖, <i>Aspergillus oryzae</i> , Galactooligosaccharides, GOS, BLCY-006, fermentation, activity, lactose, glucose		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109439552 A (SHANDONG BAILONG CHUANGYUAN BIO-TECH CO., LTD.) 08 March 2019 (2019-03-08) see entire document	1-10
A	CN 101691538 A (BAOLINGBAO BIOLOGY CO., LTD. et al.) 07 April 2010 (2010-04-07) see entire document	1-10
A	CN 103937691 A (SHANDONG UNIVERSITY et al.) 23 July 2014 (2014-07-23) see entire document	1-10
A	CN 105112306 A (SHANDONG BAILONG CHUANGYUAN BIO-TECH CO., LTD. et al.) 02 December 2015 (2015-12-02) see entire document	1-10
A	李维理 等 (LI, Weili et al.). "原生质体诱变选育高产 $\beta$ -半乳糖苷酶米曲霉菌株 (Non-official translation: Breeding of <i>Aspergillus Oryzae</i> Strain with High $\beta$ -galactosidase Production by Protoplast Mutagenesis)" <i>广西轻工业 (Guangxi Journal of Light Industry)</i> , No. 9, 30 September 2010 (2010-09-30), ISSN: 1003-2673, see abstract	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>13 May 2020</b>		Date of mailing of the international search report <b>22 May 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2020/075704**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIANA, C. D. S. et al. "Determination of Cell Permeabilization and Beta-Galactosidase Extraction from <i>Aspergillus oryzae</i> CCT 0977 Grown in Cheese Whey" <i>International Journal of Chemical Engineering</i> , 22 July 2018 (2018-07-22), ISSN: 1687-8078, see abstract	1-10
.....		

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **11**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  - [1] The meaning that  $\beta$ -galactosidase includes adsorbent and enzyme containing aspergillus oryzae fixed on the adsorbent is unclear, and the amino acid sequence of the enzyme is not provided. Therefore, a person skilled in the art cannot determine the structure thereof, cannot determine the subject matter of the search, and cannot make meaningful search for claim 11. In addition, the description does not provide sufficient information about the present invention to determine the subject matter that may be reasonably expected after amendments are made to said claim.
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/075704**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109439552	A	08 March 2019	CN	109439552	B	21 January 2020
CN	101691538	A	07 April 2010	CN	101691538	B	09 May 2012
CN	103937691	A	23 July 2014	CN	103937691	B	17 October 2017
CN	105112306	A	02 December 2015	CN	105112306	B	18 December 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/075704

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 1/14(2006.01)i; C12N 9/38(2006.01)i; C12P 19/00(2006.01)i; C12P 19/14(2006.01)i; C12R 1/69(2006.01)n</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C12P; C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>数据库: CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, 百度学术; 关键词: 米曲霉, 低聚半乳糖, <math>\beta</math>-半乳糖苷酶, 发酵, 酶活, 乳糖, 葡萄糖, <i>Aspergillus oryzae</i>, Galactooligosaccharides, GOS, BLCY-006, fermentation, activity, lactose, glucose</p>																				
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109439552 A (山东百龙创园生物科技股份有限公司) 2019年 3月 8日 (2019 - 03 - 08) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101691538 A (保龄宝生物股份有限公司等) 2010年 4月 7日 (2010 - 04 - 07) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103937691 A (山东大学等) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105112306 A (山东百龙创园生物科技股份有限公司等) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>李维理 等. "原生质体诱变选育高产 <math>\beta</math>-半乳糖苷酶米曲霉菌株" 广西轻工业, 第9期, 2010年 9月 30日 (2010 - 09 - 30), ISSN: 1003-2673, 参见摘要</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109439552 A (山东百龙创园生物科技股份有限公司) 2019年 3月 8日 (2019 - 03 - 08) 参见全文	1-10	A	CN 101691538 A (保龄宝生物股份有限公司等) 2010年 4月 7日 (2010 - 04 - 07) 参见全文	1-10	A	CN 103937691 A (山东大学等) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 参见全文	1-10	A	CN 105112306 A (山东百龙创园生物科技股份有限公司等) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 参见全文	1-10	A	李维理 等. "原生质体诱变选育高产 $\beta$ -半乳糖苷酶米曲霉菌株" 广西轻工业, 第9期, 2010年 9月 30日 (2010 - 09 - 30), ISSN: 1003-2673, 参见摘要	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 109439552 A (山东百龙创园生物科技股份有限公司) 2019年 3月 8日 (2019 - 03 - 08) 参见全文	1-10																		
A	CN 101691538 A (保龄宝生物股份有限公司等) 2010年 4月 7日 (2010 - 04 - 07) 参见全文	1-10																		
A	CN 103937691 A (山东大学等) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 参见全文	1-10																		
A	CN 105112306 A (山东百龙创园生物科技股份有限公司等) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 参见全文	1-10																		
A	李维理 等. "原生质体诱变选育高产 $\beta$ -半乳糖苷酶米曲霉菌株" 广西轻工业, 第9期, 2010年 9月 30日 (2010 - 09 - 30), ISSN: 1003-2673, 参见摘要	1-10																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2020年 5月 13日	2020年 5月 22日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	罗霄																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62089158																			

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	<p>Carolin dos Santos Viana 等. "Determination of Cell Permeabilization and Beta-Galactosidase Extraction from Aspergillus oryzae CCT 0977 Grown in Cheese Whey"</p> <p>International Journal of Chemical Engineering, 2018年 7月 22日 (2018 - 07 - 22), ISSN: 1687-8078, 参见摘要</p>	1-10

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求：  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
  
2.  权利要求： 11  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：  
[1] 所述  $\beta$ -半乳糖苷酶包括吸附剂和固定在吸附剂上的含酶米曲霉的含义不确定，也未提供所述酶的氨基酸序列，因而本领域技术人员无法确认其结构，也就不能确定检索主题，无法对权利要求11作出有意义的检索。此外，说明书没有提供关于本发明的足够信息，以确定出在对该权利要求进行修改后可能合理预期的保护主题。
  
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/075704

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109439552	A	2019年 3月 8日	CN	109439552	B	2020年 1月 21日
CN	101691538	A	2010年 4月 7日	CN	101691538	B	2012年 5月 9日
CN	103937691	A	2014年 7月 23日	CN	103937691	B	2017年 10月 17日
CN	105112306	A	2015年 12月 2日	CN	105112306	B	2018年 12月 18日