



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 109439552 B

(45)授权公告日 2020.01.21

(21)申请号 201811596603.7

(22)申请日 2018.12.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109439552 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(83)生物保藏信息

CGMCC No.16965 2018.12.05

(73)专利权人 山东百龙创园生物科技股份有限公司

地址 251200 山东省德州(禹城)国家高新技术  
技术产业开发区德信大街

(72)发明人 李方华 干昭波 窦光朋 邵先豹  
张明站 杜倩 杨腾腾

(74)专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 陈桂玲

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

C12N 9/38(2006.01)

C12P 19/00(2006.01)

C12P 19/14(2006.01)

C12R 1/69(2006.01)

审查员 吕小蒙

权利要求书1页 说明书7页

(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)摘要

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。米曲霉(*Aspergillusoryzae*)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。本发明还涉及该米曲霉在制备低聚半乳糖中的应用。本发明所述米曲霉BLCY-006可高产 $\beta$ -半乳糖苷酶,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,同时还具有耐乳糖和葡萄糖的特性,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。

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, 步骤如下:

(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, 步骤如下:

(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, 经过滤收集菌丝体;

(b) 将步骤(a)收集到的菌丝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, 使菌丝体固定在吸附剂表面, 制得β-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β-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、离交、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β-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>。

## 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

[0001] 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,属于微生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 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。分布甚广,主要在粮食、发酵食品、腐败有机物和土壤等处。是我国传统酿造食品酱和酱油的生产菌种,也可生产淀粉酶、蛋白酶、果胶酶和曲酸等。会引起粮食等工农业产品霉变。

[0003] 低聚半乳糖(Galactooligosaccharides,GOS)是一种具有天然属性的功能性低聚糖,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,而人母乳中含量较多,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,不被人小肠消化吸收,但可被结肠菌群发酵,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;不被突变链球菌等口腔细菌利用,可降低龋齿;促进钙、镁、钾的吸收,降低钠吸收;降低总胆固醇和甘油三酯水平,可改善脂质代谢;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年日本的低聚半乳糖成为第二大功能性低聚糖产品,2008年9月我国将其列入新资源食品目录。

[0004] 当前国内外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。

[0005] 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。本发明采用土壤中分离的Aspergillusoryzae米曲霉为出发菌株,经本实验室诱变筛选所得的高效率转化菌株米曲霉BLB-21(保藏号CGMCCNo.2951)直接发酵高浓度乳糖溶液。但是该专利仍然存在 $\beta$ -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

[0006] 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。

[0007] 本发明还提供一种米曲霉BLCY-006的培养方法。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 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。

[0010] 本发明所述米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) BLCY-006的原始菌株分离于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。

[0011] 该菌株初呈白色、黄色,后转黄褐色至淡绿褐色。分生孢子头放射状,一直径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,同时还具有耐乳糖和葡萄糖的特性,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。

[0012] 上述米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) BLCY-006的培养方法,步骤如下:

[0013] (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;

[0014] (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;

[0015] (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。

[0016] 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:

[0017] 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。

[0018] 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:

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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,步骤如下:

[0022] (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,经过滤收集菌丝体;

[0023] (b) 将步骤(a)收集到的菌丝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,使菌丝体固定在吸附剂表面,制得 $\beta$ -半乳糖苷酶;

[0024] (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;

[0025] (d) 将步骤(c)制得的低聚半乳糖粗溶液经脱色、过滤、离交、色谱分离、浓缩、干燥得到低聚半乳糖。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 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%。

[0029] 根据本发明优选的,步骤(c)中,所述保温反应的温度为30~60 $^{\circ}$ C。

[0030] 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>。

[0031] 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。

[0032] 有益效果

[0033] 1.本发明从土壤中分离出米曲霉菌种,在经过紫外诱变、亚硝基胍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,同时还具有耐葡萄糖、乳糖的特性,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。

[0034] 2.本发明通过制备获得β-半乳糖苷酶,提高了酶的使用效率,对乳糖的利用率显著提高,所产低聚半乳糖粗酶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。

### 具体实施方式

[0035] 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。

[0036] 本发明中所涉及材料及药品均为普通市售产品。

[0037] β-半乳糖苷酶活力测定方法:

[0038] 准确称取邻硝基苯酚-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)底物0.1g,溶于40mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液(pH5.2,0.1mol/L),即为浓度为0.25%(W/V)的ONPG溶液。待测粗酶液使用pH5.2,0.1mol/L的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸稀释至合适倍数,吸取800μl的底物溶液加入试管中,于60℃水浴锅中预热2min,加入200μl稀释后酶液混匀,反应15min后依次加入2ml1mol/LNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液终止反应。测定420nm处的光吸收值(OD<sub>420</sub>)。以加入Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-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β-半乳糖苷酶的酶活力。

[0039] 酶活力单位定义:一个单位(1U)的β-半乳糖苷酶活性指在60℃,pH5.2条件下,每分钟催化底物邻硝基苯酚-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)生成1μmol邻硝基酚(ONP)所需的酶量。

[0040] 生物材料:

[0041] 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。

[0042] 实施例1

[0043] 米曲霉(*Aspergillus oryzae*) BLCY-006的筛选过程如下:

[0044] (1)富集培养

[0045] 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:

[0046] 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。

[0047] 制作方法如下

[0048] 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,冷却后贮备用。

[0049] (2) 纯种分离

[0050] 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。

[0051] 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β-半乳糖苷酶酶活进行测定,08号摇瓶酶活最高,达到105U/ml。

[0052] 平板培养基成分:

[0053] 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。

[0054] 摇瓶培养基成分:

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] (3) 诱变筛选

[0058] 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β-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。分生孢子头放射状,一直径150~300μm,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*)。

[0059] 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。

[0060] 实施例2

[0061] 实施例1所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*) BLCY-006的培养方法,步骤如下:

[0062] (1) 取米曲霉(*Aspergillus oryzae*) BLCY-006接种于PDA培养基中,在30℃的条件下,活化培养30h,制得活化菌株;

[0063] (2) 取步骤(1)制得的活化菌株,接种于种子培养基中,在30℃的条件下,增殖培养30h,制得种子液;

[0064] 所述种子培养基组分如下:

[0065] 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;

[0066] 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。

[0067] (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;

[0068] 所述发酵培养基组分如下,均为重量百分比:

[0069] 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。

[0070] 实施例3

[0071] 实施例1所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-003的培养方法,步骤如下:

[0072] (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;

[0073] (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;

[0074] 所述种子培养基组分如下:

[0075] 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;

[0076] 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。

[0077] (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;

[0078] 所述发酵培养基组分如下,均为重量百分比:

[0079] 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。

[0080] 实施例4

[0081] 实施例1所述的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)BLCY-006的培养方法,步骤如下:

[0082] (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;

[0083] (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;

[0084] 所述种子培养基组分如下:

[0085] 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;

[0086] 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。

[0087] (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;

[0088] 所述发酵培养基组分如下,均为重量百分比:

[0089] 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。

[0090] 对比例1

[0091] 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。

[0092] 对比例2

[0093] 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。

[0094] 实验例1

[0095] 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:

[0096] 表1菌体发酵液酶活

[0097]

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

[0098] 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制备的菌丝体发酵液中 $\beta$ -半乳糖苷酶酶活有显著的提高。

[0099] 实验例2

[0100] 米曲霉(*Aspergillus oryzae*) BLCY-006在制备 $\beta$ -半乳糖苷酶中的应用,步骤如下:

[0101] (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滤,工作压力为0.3~0.5MPa,流速为5~10m<sup>3</sup>/h,收集菌丝体;

[0102] (b) 将步骤(a)收集到的菌丝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,使菌丝体固定在硅藻土表面,制得 $\beta$ -半乳糖苷酶;

[0103] (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;

[0104] (d) 将步骤(c)制得的低聚半乳糖粗溶液经脱色、过滤、离交、色谱分离、浓缩、干燥得到低聚半乳糖。

[0105] 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>。

[0106] 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、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。

[0107] 表240%乳糖溶液制备低聚半乳糖的各项指标



[0108]

	低聚半乳糖粗酶液				低聚半乳糖	
	葡萄糖含量/%	半乳糖含量/%	乳糖含量/%	低聚半乳糖含量/%	低半乳糖纯度/%	低聚半乳糖收率/%
实施例 2	5.48	21.36	11.64	61.52	86.71	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

[0109] 表3 60%乳糖溶液制备低聚半乳糖的各项指标

[0110]

	低聚半乳糖粗酶液				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

[0111] 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酶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,低聚半乳糖粗酶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,所产低聚半乳糖粗酶液中低聚半乳糖的含量也显著提升。

[0112] 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。