



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109705175 B

(45) 授权公告日 2022.07.05

(21) 申请号 201811603666.0

C08B 37/00 (2006.01)

(22) 申请日 2014.10.02

A23L 33/125 (2016.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 1/00 (2006.01)

申请公布号 CN 109705175 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2019.05.03

CN 1242776 A, 2000.01.26

(30) 优先权数据

CN 103025749 A, 2013.04.03

13187369.7 2013.10.04 EP

CN 102459295 A, 2012.05.16

(62) 分案原申请数据

WO 2012/158517 A1, 2012.11.22

201480054230.4 2014.10.02

WO 2012/156898 A1, 2012.11.22

(73) 专利权人 科汉森HMO有限责任公司

WO 2012/156897 A1, 2012.11.22

地址 德国莱茵布赖特巴赫

CN 102676604 A, 2012.09.19

(72) 发明人 斯特凡·詹尼文

CN 103113422 A, 2013.05.22

马库斯·海福力克

CN 1222869 A, 1999.07.14

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理

CN 101367844 A, 2009.02.18

有限公司 11205

CN 101831475 A, 2010.09.15

专利代理人 关浩 臧建明

Andreas Geisser et al.. Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography. 《Journal of Chromatography A》.2005, 第1092卷(第1期), 第17-23页.

(51) Int.Cl.

审查员 刘露

C07H 3/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图9页

C07H 1/06 (2006.01)

(54) 发明名称

使用模拟移动床色谱纯化中性人乳寡糖的方法

(57) 摘要

本申请公开用于纯化中性人乳寡糖(中性HMO)的方法。所述方法使用模拟移动床色(SMB)谱, 允许连续纯化大量具有高纯度的HMOs。与中性HMOs的化学合成途径及其随后的纯化不同, 本发明的方法允许提供不含有害化学物质如微量的重金属或有机溶剂的HMOs。单独的中性HMO产物可以通过喷雾干燥以固体形式获得或以浓缩浆的形式获得。提供的中性HMO是非常适用于在食品应用中使用。

1. 一种用于在连续色谱中从含有中性人乳寡糖和污染物的粗溶液中纯化中性人乳寡糖的方法, 其中所述中性人乳寡糖是中性人乳三糖、四糖、戊糖或己糖,

其中所述含有中性人乳寡糖和污染物的粗溶液包含微生物发酵提取物, 或者由微生物发酵提取物组成, 其中所述溶液中的中性人乳寡糖的纯度<80%,

其特征在于, 将所述粗溶液应用到至少一个使用模拟移动床色谱的纯化步骤, 提供其中含有具有≥80%纯度的所述中性人乳寡糖的纯化溶液,

其中, 在将所述溶液应用到至少一个使用模拟移动床色谱的纯化步骤之前, 或在将所述溶液应用到使用模拟移动床色谱的纯化步骤之后, 将含有中性人乳寡糖的溶液进行电渗析。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述粗溶液中的中性人乳寡糖的纯度为≤70%, ≤60%, ≤50%, ≤40%, ≤30%, ≤20%, ≤10%或≤5%和/或纯化溶液含有具有≥85%的纯度。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 至少一个模拟移动床色谱具有

- i) 至少4个柱子, 其中至少一个柱子包括弱的或强的阳离子交换树脂; 和/或
- ii) 具有不同流速的四个区域I, II, III和IV;
- iii) 洗脱液, 其包含水或由水组成; 和/或
- iv) 操作温度为15°C至60°C。

4. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 将所述纯化溶液应用到至少一个进一步的使用模拟移动床色谱的纯化步骤, 提供其中含有具有≥92%纯度的所述中性的人乳寡糖的纯化溶液。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 进一步的模拟移动床色谱具有

- i) 至少4个柱子, 其中至少一个柱子包括弱的或强的阳离子交换树脂; 和/或
- ii) 具有不同流速的四个区域I, II, III和IV;
- iii) 洗脱液, 其包含水或由水组成; 和/或
- iv) 操作温度为15°C至60°C。

6. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 所述微生物发酵提取物是在至少一个微生物发酵步骤获得的, 在所述至少一个微生物发酵步骤后进行以下至少一个步骤

- a) 对所述粗溶液进行过滤以在微生物发酵后将可溶性物质与不溶性物质分离;
- b) 离子交换色谱;
- c) 对溶液进行浓缩;
- d) 对溶液进行渗析;
- e) 使用模拟移动床色谱对溶液进行色谱分离;
- f) 对溶液进行过滤; 以及
- g) 对含有所述中性人乳寡糖的纯化溶液进行喷雾干燥。

7. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 在将所述溶液应用到所述至少一个模拟床移动色谱步骤之前, 将所述含有中性人乳寡糖的溶液

- i) 进行过滤以去除任何不溶物质; 和/或
- ii) 应用到至少一个使用阳离子和/或阴离子交换色谱的纯化步骤。

8. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 在渗析之后, 将所述包含中性人乳寡糖

的溶液进行浓缩

- i) 浓缩到 $\geq 100\text{g/l}$ 的浓度; 和/或
- ii) 采用真空浓缩器浓缩; 和/或
- iii) 通过纳滤浓缩; 和/或
- iv) 在4°C至50°C的温度下进行浓缩。

9. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述纯化溶液是无菌过滤的和/或经去除内毒素的。

10. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述纯化溶液是经喷雾干燥的。

11. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述中性人乳寡糖选自2'-岩藻糖基乳糖,3-岩藻糖基乳糖,2',3-双岩藻糖基乳糖,乳糖基-N-丙糖II,乳糖基-N-四糖,乳糖基-N-新四糖,乳糖基-N-岩藻五糖I,乳糖基-N-新岩藻五糖I,乳糖基-N-岩藻五糖II,乳糖基-N-岩藻五糖III,乳糖基-N-岩藻五糖V,乳糖基-N-新岩藻五糖V,乳糖基-N-双岩藻己糖I,乳糖基-N-双岩藻己糖II,6'-半乳糖基乳糖,3'-半乳糖基乳糖,乳糖基-N-己糖,乳糖基-N-新己糖,对乳糖基-N-己糖,对乳糖基-N-新己糖和双岩藻糖基-乳糖基-N-新己糖。

12. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,在连续色谱中用于纯化中性人乳寡糖的方法是以连续方式用于纯化中性人乳寡糖的方法。

## 使用模拟移动床色谱纯化中性人乳寡糖的方法

[0001] 本申请为2014年10月02日递交的申请号为201480054230.4,发明名称为使用模拟移动床色谱纯化中性人乳寡糖的方法的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本申请公开了一种纯化中性人乳寡糖(中性HMO)的方法。所述方法使用模拟移动床(SMB)色谱,允许连续纯化大量具有高纯度的HMOs。与中性HMOs的化学合成路径及其后续的纯化相反,本发明的方法允许提供不含有害化学物质,例如微量的重金属或有机溶剂的HMOs。单独的中性HMO 产物可以通过喷雾干燥以固体形式获得或作为浓缩浆获得。所提供的中性 HMO非常适合在食品应用中使用。

### 背景技术

[0003] 人乳是碳水化合物,脂肪,蛋白质,维生素,矿物质和微量元素的复合混合物。到目前为止,最主要成分是由碳水化合物,该主要成分可以进一步被划分为乳糖和更复杂的寡糖。与乳糖能被用作能量源相反,复杂的寡糖不能被婴儿代谢。复杂的寡糖部分的比例达到总碳水化合物的1/10,且该部分由大概多于150个的不同的寡糖组成。这些复杂的寡糖的存在和浓度是人类特定的,且因此不能从其它哺乳动物例如驯养的产奶动物的乳汁中大量获取。

[0004] 已知这些复杂的寡糖在人乳中存在已经很长一段时间,且这些寡糖的生理功能已经经历了几十年的医学研究。对于一些较为丰富的人乳寡糖,特定的功能已经被鉴定。

[0005] 有限的供应和获取单独HMOs的纯化成分的困难,导致了将化学途径用到这些复杂分子中的一些的发展。然而,通过化学合成,酶促合成或发酵合成而合成HMOs已被证明是具有挑战性的。至今还未能提供至少大规模的产量以及足以用于食品应用的质量。在这方面,特定的HMOs(例如HMO 2'-岩藻糖基乳糖;参见WO 2010/115935 A1)的具体化学合成路径包含多个有害的化学物质,其包含最终产物污染的风险。

[0006] 由于人乳寡糖的化学合成中包含挑战,已经开发出多种酶方法和发酵方法。然而,这些方法产生复杂的寡糖混合物,即所需的产物被初始材料例如乳糖、生物合成的中间体以及底物例如个别的单糖和多肽等污染。

[0007] 本领域中从这些复杂的混合物中纯化单独的寡糖产物的方法是技术上复杂的,且对于食品应用也是不经济的。对于从复杂的混合物例如乳清和糖蜜中纯化二糖乳糖或蔗糖,已经开发出包含多个结晶过程的具有工业规模的方法。所述方法的缺点在于,方法是复杂的,并且产量低。

[0008] 对于复杂的寡糖例如某些HMOs的纯化,直到现在凝胶过滤色谱一直是所选用的方法。凝胶过滤色谱的缺点在于其不能有效地扩大规模,并因此不适合连续的操作。因此,凝胶过滤色谱是不经济的,且不能以用于人类的食物中的合理的产量和质量提供某些HMOs,如HMO 2'-岩藻糖基乳糖。

[0009] 模拟移动床(SMB)色谱法起源于石油化工和矿产行业。现在,SMB色谱法被制药工

业所使用,用于从外消旋混合物中分离对映体。SMB色谱法已被用于从果糖-葡萄糖溶液中分离单糖果糖,以及从甜菜或甘蔗糖浆中大规模的分离二糖蔗糖。然而,SMB色谱尚未用于从发酵物中纯化HMOs,或任何其他复杂的寡糖。

[0010] 模拟移动床(SMB)色谱法发展为连续分离方法,与连续化学分离方法例如精馏类似。在精馏中,在液相和气相之间建立逆流,其允许随后产物的进料和取出的连续应用。此外,理论上的逆流色谱法的操作实现的分离应优于传统的交叉流操作的分离。然而,色谱逆流操作需要移动相和固定相以相反的方向移动。因此,SMB色谱法发展为解决连续色谱分离过程中的移动固体色谱材料相关的困难的实用性方案。

[0011] 标准的SMB理论包含具有四个外部施用的流的不同区域:包含待分离组分的进料流,解吸剂或流动相流,提取物和残液流(残液流代表不保留的成分)。这些液流将SMB系统化分为具有以下功能的四个不同区域(每个区域或部分可以包括一个柱子或多个柱子):区域I用于固定相的再生,区域II 的目的是解吸弱解吸材料(less strongly desorbed material),区域III的功能是吸附强吸附材料,最后的区域IV的功能是吸附不易吸附的材料。因此,较强吸附材料在区域II建立浓度波,且被转移到提取物出口,而不太强的吸附成分朝着残液口转移。

[0012] 原则上,区域I和区域IV用于固定相(再生区域)的再生,而区域II 和区域III可以视为该系统的实际分离区(分离区)。除了四个液流和所得的区域,该系统包括(用于闭合环路操作)用于流动相(解吸剂)的循环泵,使流动相在一个方向上流经固定的区域。然后通过在系统中顺序从一个柱子到下一个柱子的周期性地转换和连续地供应或移去进料、解吸剂以及产物,以实现逆流流动。

[0013] 除了标准的闭合环路,可以使用4个区域的SMB系统,开放环路,3个区域的系统。3个区域的开放环路系统在新溶剂非常廉价的情况下是经济的,例如使用水/乙醇作为流动相的情况下。通过使用3个区域的开放环路配置,无需液体相的再生,从而不再需要区域IV。

[0014] 除了用于分离两个组分的混合物的标准SMB系统,用于分离两个以上组分的8个区域的闭合环路SMB系统或5个区域的开放环路SMB系统也已经开发。

[0015] 由于操作的连续方式,以及可使用相当大的柱尺寸以及可回收流动相,原则上,SMB系统可以放大到数百吨的生产量。

## 发明内容

[0016] 从现有技术出发,技术问题是提供一种新的提供大量的具有高纯度且不含有害化学物质的中性HMO的方法。

[0017] 本发明提供了一种用于在连续(或连续的)色谱中,从含有中性HMO (例如,2'-岩藻糖基乳糖) 和污染物的粗溶液中纯化中性HMO(例如,2'- 岩藻糖基乳糖) 的方法,其中所述含有中性HMO(例如,2'-岩藻糖基乳糖) 和污染物的粗溶液包含选自微生物发酵提取物,生物催化的反应溶液,化学合成的溶液,及其组合的溶液,或者由选自微生物发酵提取物,生物催化的反应溶液,化学合成的溶液,及其组合的溶液组成,且其中所述中性HMO (例如 2'-岩藻糖基乳糖) 在所述溶液中的纯度为<80%。所述方法的特征在于,将粗溶液应用到至少一个使用模拟床色谱的纯化步骤。以这种方式,提供含有具有≥80%纯度的所需的中性HMO (例如2'-岩藻糖基乳糖) 的纯化溶液。

[0018] 在连续色谱中纯化中性HMO的方法可以是以连续方式纯化中性HMO的方法。在这方面,中性HMO可以是2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-四糖。

[0019] 本申请人已发现,使用所开发的含有使用模拟移动床色谱的纯化步骤的方法,可以连续的方式提供不含重金属污染物且高纯度的HMOs。因此,可以以非常方便和经济的方式例如从微生物发酵的粗溶液中提供大量高品质的 HMOs。即使在模拟移动床色谱步骤中没有柱材料(例如阳离子柱材料)的再生步骤,本发明的方法也被证明是高度稳定的。事实上,整个过程可以以稳定且连续的方式操作几个月。

[0020] 在优选的实施方式中,粗溶液中的中性HMO的纯度为≤70%,≤60%,≤50%,≤40%,≤30%,≤20%,≤10%或≤5%和/或纯化溶液含有具有≥80%,优选≥90%的纯度的HMO。术语“粗溶液”指单个移动床色谱纯化步骤之前的含有中性HMO的溶液,而纯化溶液指单个移动床色谱纯化步骤之后的溶液。

[0021] 所述至少一个模拟移动床色谱步骤可以具有

[0022] i) 至少4个柱子,优选至少8个柱子,更优选至少12个柱子,其中至少一个柱子包括弱的或强的阳离子交换树脂,优选H<sup>+</sup>形式或Ca<sup>2+</sup>形式的阳离子交换树脂;和/或

[0023] ii) 具有不同流速的四个区域I,II,III和IV;和/或

[0024] iii) 洗脱液,包含水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95 体积%的水,最优选9-11体积%的乙醇和89-91体积%的水,或洗脱液由水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95体积%的水,最优选9-11 体积%的乙醇和89-91体积%的水组成,其中,所述洗脱液可选地进一步包含硫酸,优选≤10mM的硫酸;更优选≤2-5mM的硫酸;和/或

[0025] iv) 操作温度为15℃至60℃,优选20℃至55℃,更优选25℃至50℃。

[0026] 如果待纯化的HMO是2'-岩藻糖基乳糖,所述至少一个模拟移动床色谱步骤可以包含

[0027] i) 具有不同流速的四个区域I,II,III和IV,其中所述流速优选为:区域I中为28-32ml/min,区域II中为19-23ml/min,区域III中为21-25ml/min 和/或区域IV中为16-20ml/min;和/或

[0028] ii) 进料速率为2-4ml/min,优选为3ml/min;和/或

[0029] iii) 洗脱液流速为10-13ml/min,优选为11.5ml/min;和/或

[0030] iv) 转换时间为16-20min,优选为17-19min,更优选为18min。

[0031] 优选地,至少一个柱子包含0.1至5000kg的阳离子交换树脂,优选0.2 至500kg的阳离子交换树脂,更优选0.5至50kg的阳离子交换树脂,最优选1.0至20kg的阳离子交换树脂。

[0032] 重要的是,可以放大阳离子交换材料的量,不同区域的流速,进料速度,洗脱液流速和/或转换时间。可以放大2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30, 40,50,60,70,80,90,100,1000倍或放大在所述的数值之间的所有可能的比例。

[0033] 在柱子中,强阳离子交换树脂可以用作固定相。优选地,所述阳离子交换树脂是磺酸树脂,更优选Purolite<sup>®</sup> PCR833H(Purolite, Ratingen, 德国), Lewatit MDS 2368和/或Lewatit MDS1368树脂。如果在柱子中使用阳离子交换树脂,可以用硫酸进行再生。硫酸可以在洗脱液中使用,优选为10mM或更低浓度的硫酸。(强)阳离子交换树脂可以H<sup>+</sup>形式或Ca<sup>2+</sup>

形式存在。

[0034] 60°C以上的操作温度在模拟移动床色谱过程中是不优选的。已经证明,特别是在强阳离子交换树脂(H<sup>+</sup>形式或Ca<sup>2+</sup>形式)作为固定相存在,应用的中性的寡糖显著不稳定,即解聚,不利于中性HMO的最终产率。

[0035] 在本发明的有益实施方式中,本发明特征在于,将纯化溶液应用到至少一个使用模拟移动床色谱进一步的纯化步骤,提供含有具有≥90%,优选≥92%;更优选≥93%纯度的中性人乳寡糖的纯化溶液。特别是,本发明产生不含重组DNA和不含宿主菌蛋白质的HMO产物。

[0036] 进一步的模拟移动床色谱可以具有

[0037] i) 至少4个柱子,优选至少8个柱子,更优选至少12个柱子,其中至少一个柱子包括弱的或强的阳离子交换树脂,优选H<sup>+</sup>形式或Ca<sup>2+</sup>形式的阳离子交换树脂;和/或

[0038] ii) 具有不同流速的四个区域I,II,III和IV,和/或

[0039] iii) 洗脱液,包含水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95 体积%的水,最优选9-11体积%的乙醇和89-91体积%的水,或洗脱液由水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95体积%的水,最优选9-11 体积%的乙醇和89-91体积%的水组成,其中,所述洗脱液可选地进一步包含硫酸,优选≤10mM的硫酸;更优选≤2-5mM的硫酸,和/或

[0040] iv) 操作温度为15°C至60°C,优选为20°C至55°C,更优选为25°C至50 °C。

[0041] 如果待纯化的HMO是2'-岩藻糖基乳糖,进一步的模拟移动床色谱步骤可以包含

[0042] i) 具有不同流速的四个区域I,II,III和IV,其中所述流速优选为:区域I中为28-32ml/min,区域II中为19-23ml/min,区域III中为21-25ml/min 和/或区域IV中为16-20ml/min;和/或

[0043] ii) 进料速度为2-4ml/min,优选为3ml/min;和/或

[0044] iii) 洗脱液流速为10-13ml/min,优选11.5ml/min;和/或

[0045] iv) 转换时间为16-20min,优选17-19min,更优选18min。

[0046] 具体地,至少一个柱子含有0.1至5000kg的阳离子交换树脂,优选0.2 至500kg的阳离子交换树脂,更优选0.5至50kg的阳离子交换树脂,最优选1.0至20kg的阳离子交换树脂。

[0047] 重要的是,可以放大阳离子交换材料的量,不同区域中的流速,进料速度,洗脱液流速和/或开关时间。可以放大2,3,4,5,6,7,8,9,10,20, 30,40,50,60,70,80,90,100,1000倍或放大在上述数值之间的所有可能的比例。

[0048] 使用模拟移动床色谱的纯化步骤后,纯化溶液的pH优选可以通过加入碱,更优选通过加入NaOH(例如0.2M的NaOH)调节至pH7。

[0049] 根据本发明,含有中性HMO和污染物的粗溶液包括选自微生物发酵物,微生物发酵提取物,生物催化反应溶液,化学合成溶液,及其组合的溶液,或由选自微生物发酵物,微生物发酵提取物,生物催化反应溶液,化学合成溶液及其组合的溶液组成。作为中性HMO的来源的发酵具有比化学合成或生物催化例如酶合成更节省成本的优点。因此,生物发酵提取物是优选的。

[0050] 优选地,在将所述溶液应用到所述至少一个模拟移动床色谱步骤前,将所述包含

中性HMO的溶液(优选微生物发酵液)

[0051] i) 进行过滤或离心以去除生物质和/或任何不溶性物质, 优选用活性炭, 木炭, 硅藻土和/或通过交叉流过滤进行过滤以去除任何不溶性物质和有机污染物, 更优选通过交叉流过滤进行过滤, 最优选使用微滤膜的交叉流过滤进行过滤; 和/或

[0052] ii) 应用到至少一个使用阳离子和/或阴离子交换色谱的纯化步骤中, 优选先应用到至少一个阳离子交换色谱步骤然后应用到至少一个阴离子交换色谱步骤。

[0053] 在进一步优选的实施例中, 在将所述溶液应用到至少一个使用模拟移动床色谱的纯化步骤之前, 或在将所述溶液应用到使用模拟移动床色谱的纯化步骤之后, 将所述含有中性HMO溶液进行电渗析和/或渗滤, 优选用纳滤膜进行渗滤, 更优选用具有 $\leq 20\text{ \AA}$ 的尺寸排阻极限的纳滤膜进行渗滤。最优选地, 将所述溶液渗析到 $\leq 15\text{mS/cm}$ , 优选 $\leq 10\text{mS/cm}$ , 更优选 $\leq 5\text{mS/cm}$ 的电导率。

[0054] 如果粗溶液在被应用到至少一个使用模拟移动床色谱的纯化步骤之前被渗析, 主要的污染物取决于中性HMO馏分的来源(即化学合成, 生物催化或发酵)。典型的污染物是单糖(例如葡萄糖, 半乳糖, 岩藻糖等), 二糖(例如乳糖)和副产物(例如乳果糖)。当发酵用作中性HMO的来源的情况下, 粗溶液通常包括所使用的碳源(例如丙三醇, 蔗糖和/或葡萄糖)以及所使用的微生物的副产物(如较高分子量的寡糖)作为污染物。作为进一步的污染物, 也可以有寡糖, 该寡糖是由于所使用的糖基转移酶(例如在合成细胞中的糖基转移酶将所需的产物, 底物或中间产物转化为污染的寡糖)的混杂性而产生的。所述污染物可以通过使用模拟床(SMB)色谱的纯化步骤被有效的去除。

[0055] 在渗析之后, 优选在电渗析和/或渗滤之后(可选地在将所述溶液应用到 SMB色谱过程之前), 可以将所述包含HMO的溶液进行浓缩, 特别是

[0056] i) 浓缩到 $\geq 50\text{g/l}$ ,  $\geq 100\text{g/l}$ , 优选 $200\text{g/l}$ , 更优选 $\geq 300\text{g/l}$ 的浓度; 和/或

[0057] ii) 采用真空浓缩器浓缩; 和/或

[0058] iii) 通过纳滤浓缩; 和/或

[0059] iv) 在 $4^\circ\text{C}$ 至 $50^\circ\text{C}$ , 优选 $10^\circ\text{C}$ 至 $45^\circ\text{C}$ , 可选的 $20^\circ\text{C}$ 至 $40^\circ\text{C}$ 或 $30^\circ\text{C}$ 至 $35^\circ\text{C}$ 的温度下进行浓缩。

[0060] 更优选地, 含HMO的馏分通过采用纳滤浓缩。纳滤步骤可以进一步用于渗析去除污染的盐类。这里, HMO馏分可以首先通过纳滤浓缩, 将所得浓缩的HMO馏分随后用水, 优选二次蒸馏水( $\text{ddH}_2\text{O}$ )或去离子水进行稀释, 然后可使用纳滤膜将稀释的HMO馏分再次浓缩。

[0061] 由于不需要将中性HMOs暴露于高温, 利用纳滤进行浓缩是特别优选的。因此, 所述的浓缩方法与热处理相比, 对HMO结构的损害较少, 即浓缩期间不会对中性HMOs造成热损伤。纳滤的另一个优点是, 它可以用于浓缩中性HMOs和渗析(渗滤)中性HMOs。换句话说, 如果在本发明方法中连续实施浓缩步骤和渗析步骤, 不用更换纳滤中所使用的膜。另外, 所述含有中性HMOs溶液的盐浓度可以显著降低。这节省材料和时间, 并使得整个过程更加经济。优选的, 纳滤与电渗析相组合。这种组合在浓缩和脱盐中可以带来优异的结果。

[0062] 在本发明的优选实施方式中, 纯化溶液是无菌过滤的和/或去除内毒素的, 优选通过使纯化溶液通过3kDa的过滤器进行过滤。

[0063] 纯化溶液可以是经喷雾干燥的, 特别是在中性HMO浓度为20-60% (w/v), 优选30-50% (w/v), 更优选35-45% (w/v)下, 入口温度为110-150°C, 优选为120-140°C, 更优选125-

135°C, 和/或出口温度为60-80°C, 优选为65-70 °C下进行喷雾干燥。

[0064] 在本发明方法的优选实施方式中, 待纯化的中性HMO是具有多于3个单糖单元的中性HMO, 优选中性人乳三糖, 四糖, 戊糖或己糖。更优选的是, 所述中性HMO选自2'-岩藻糖基乳糖, 3-岩藻糖基乳糖, 2', 3-双岩藻糖基乳糖, 乳糖基-N-丙糖II, 乳糖基-N-四糖, 乳糖基-N-新四糖, 乳糖基-N-岩藻五糖I, 乳糖基-N-新岩藻五糖I, 乳糖基-N-岩藻五糖II, 乳糖基-N-岩藻五糖III, 乳糖基-N-岩藻五糖V, 乳糖基-N-新岩藻五糖V, 乳糖基-N-双岩藻己糖I, 乳糖基-N-双岩藻己糖II, 6'-半乳糖基乳糖, 3'-半乳糖基乳糖, 乳糖基-N-己糖, 乳糖基-N-新己糖, 对乳糖基-N-己糖, 对乳糖基-N-新己糖和双岩藻糖基-乳糖基 -N-新己糖。最优选的, 中性HMO是2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖。

[0065] 可选地, 中性HMO也可以不是2'-岩藻糖基乳糖。

[0066] 在本发明的有益的实施方式中, 本发明的方法特征在于, 所述含有中性人乳寡糖和污染物的粗溶液包含微生物发酵提取物或由微生物发酵提取物组成, 其中所述微生物提取物在至少一个微生物发酵步骤获得, 优选在其后进行以下至少一个步骤

[0067] a) 对溶液, 优选对所述粗溶液进行过滤, 以在微生物发酵后将可溶性物质与不溶性物质分离; 和/或

[0068] b) 对溶液, 优选对步骤a)中获得的溶液进行离子交换色谱, 优选阳离子交换色谱, 更优选在进行阳离子交换色谱后进行阴离子交换色谱; 和/或

[0069] c) 对溶液, 优选对在步骤b)中获得的溶液进行浓缩, 更优选通过水的蒸发和/或通过纳滤进行浓缩, 可选的进行多于一次浓缩; 和/或

[0070] d) 对溶液, 优选对在步骤c)中获得的溶液进行渗析, 更优选进行电渗析和/或渗滤, 最优选用纳滤膜进行渗滤, 可选的进行多于一次渗析; 和/或

[0071] e) 使用模拟移动床色谱对溶液, 优选对在步骤d)中获得的溶液进行色谱分离; 和/或

[0072] f) 对溶液, 优选对在步骤e)中获得的溶液进行过滤, 以将中性人乳寡糖与有色污染物分离, 更优选通过穿过活性炭的过滤进行分离; 和/或

[0073] g) 对含有所述中性人乳寡糖的纯化溶液, 优选对在步骤f)中获得的纯化溶液进行喷雾干燥; 。

[0074] 最优选地, 连续实施所有的步骤a)至g)。连续实施所有的步骤a)至 g)已被证明是本发明方法的最有益的实施方式。所述方式是节省成本和时间高效的, 且使从微生物发酵(提取物)的经喷雾干燥的(即无定形态的)HMOs 满足大量高纯度的要求。特别是, 使用纳滤的HMO溶液的浓缩和脱盐步骤显示了非常经济有效且温和的操作步骤, 防止了不需要副产物的形成。

[0075] 因此, 本发明提供一种可使用本发明的方法产生的中性HMO。中性HMO (例如2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-四糖) 优选是喷雾干燥的。纯化的中性 HMO具有高纯度的且不含重金属污染物和/或有机溶剂的优点。

[0076] 根据本发明的中性HMO可以具有

[0077] i) 固体颗粒的形式; 和/或

[0078] ii) 60 °C至90 °C, 优选62 °C至88 °C, 更优选64 °C至86 °C的玻璃化转变温度, 该温度通过差示扫描量热法测定; 和/或

- [0079] iii) 5至500μm, 优选10至300μm的粒径, 所述粒径通过激光衍射来测定; 和/或
- [0080] iv) 10至100μm, 优选20至90μm, 更优选30至80μm, 最优选40至70μm的平均颗粒尺寸, 由激光衍射法测定; 和/或
- [0081] v) 无定形态, 优选在X射线粉末衍射中没有结晶物质特征峰的无定形态, 和/或
- [0082] vi) ≤10%, 优选≤8%, 更优选<5%的水分含量。
- [0083] 中性HMO可以在医药中, 优选在胃肠道疾病的预防或治疗中应用。其也可以在营养品中, 优选在药用营养品或乳制品营养品(例如谷物产品)中使用。
- [0084] 在本发明方法的优选实施方式中, 中性人乳寡糖是具有多于3个单糖单元的HMO, 优选中性人乳三糖, 四糖, 戊糖或己糖。更优选的是中性HMO 选自2'-岩藻糖基乳糖, 3-岩藻糖基乳糖, 2', 3-双岩藻糖基乳糖, 乳糖基-N-丙糖II, 乳糖基-N-四糖, 乳糖基-N-新四糖, 乳糖基-N-岩藻五糖I, 乳糖基-N-新岩藻五糖I, 乳糖基-N-岩藻五糖II, 乳糖基-N-岩藻五糖III, 乳糖基-N-岩藻五糖V, 乳糖基-N-新岩藻五糖V, 乳糖基-N-双岩藻己糖I, 乳糖基-N-双岩藻己糖II, 6'-半乳糖基乳糖, 3'-半乳糖基乳糖, 乳糖基-N-己糖, 乳糖基-N-新己糖, 对乳糖基-N-己糖, 对乳糖基-N-新己糖和双岩藻糖基-乳糖基-N-新己糖。最优选的是, 中性HMO是2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖。
- [0085] 可选地, 中性HMO也可以不是2'-岩藻糖基乳糖。
- [0086] 此外, 也提出本发明的中性HMO在作为食品添加剂, 优选作为人类食品和/或宠物食品中的添加剂, 更优选作为人类婴儿食品的添加剂中的应用。

## 附图说明

- [0087] 参考以下附图和实施例, 根据本发明的内容不仅严格限定于本文所示的具体实施例, 将在下文进行更详细的描述。
- [0088] 图1示意性示出了使用模拟移动床色谱的纯化步骤。模拟移动床色谱可具有例如在串行装置1中的12个柱子, 其中所述装置被划分为四个不同的区域I, II, III和IV。将所述含有中性HMO 2'-岩藻糖基乳糖和污染物的粗溶液应用到区域II和区域III之间的进料口2。将提取物从区域I和区域II之间的出口4去除, 而残液在区域III和区域IV之间的出口3去除。在出口3处的残液含有纯化的HMO 2'-岩藻糖基乳糖, 而在出口4处的提取物含有低分子量的污染物(例如单糖和二糖)。
- [0089] 图2示意性示出了两个后续的使用模拟移动床色谱的纯化步骤。每个模拟移动床色谱可具有例如在串行装置1, 1'中的12个柱子, 其中每个装置被分别划分为四个不同的区域Ia, IIa, IIIa和IVa或区域Ib, IIb, IIIb和IVb。将所述含有中性HMO 2'-岩藻糖基乳糖和污染物的粗溶液施用于第一装置1的区域IIa和区域IIIa之间的进口2。提取物在区域Ia和区域IIa之间的出口4处去除, 而残液在区域IIIa和区域Ia之间的出口3处离开第一串行装置1, 且被应用于第二串行装置1'的区域IIb和区域IIIb之间。在第二串行装置1'中, 提取物在出口6处去除, 而残液在区域IIIb和区域IVb之间的出口5处去除。在出口5处的残液含有高纯度的2'-岩藻糖基乳糖, 而在出口6处的提取物含有高分子量的污染物(例如更高的寡糖)。
- [0090] 图3示意性示出了根据本发明的优选的纯化方案。首先, 将含有中性 HMO 2'-岩藻糖基乳糖和污染物的溶液7应用到电渗析步骤8, 直到获得≤0.5mS/cm的电导率。浓缩所述

溶液直到溶液达到约为40% (w/v) 的2'-岩藻糖基乳糖的浓度。接着,所述溶液被应用到至少一个使用模拟移动床色谱的纯化步骤9。在模拟移动床色谱后,获得含有高纯度2'-岩藻糖基乳糖的纯化溶液。将该纯化溶液进行无菌过滤11(优选也去除内毒素)。无菌过滤11之前,可以可选地进行电渗析10以及随后浓缩的附加步骤。无菌过滤11之后,对含有2'-岩藻糖基乳糖的纯化溶液进行喷雾干燥12,纯化的、喷雾干燥的2'-岩藻糖基乳糖13以固体颗粒的形式获得。

[0091] 图4示出了根据本发明的喷雾干燥的2'-岩藻糖基乳糖的两个样品(样品#1和样品#2)的X射线粉末衍射分析结果。所获得的两个衍射图谱表明,这两个样品#1和样品#2是完全无定形态的(没有结晶物质的特征峰)。

[0092] 图5示出了根据本发明的通过激光衍射测定的喷雾干燥的2'-岩藻糖基乳糖(样品#1和样品#2)的粒径分布。样品#1测定的平均粒径约为68 $\mu\text{m}$ 。样品#2具有约为44 $\mu\text{m}$ 的平均粒径。对于喷雾干燥的产品,这两个数值被认为是高的。

[0093] 图6示出了中性的人乳四糖乳糖基-N-新四糖17的生物合成。生物合成是从由 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡糖胺转移酶15将二糖乳糖14转化成三糖乳糖基-N-丙糖16开始。三糖乳糖基-N-丙糖16随后由酶1,4-半乳糖基转移酶17转化为四糖乳糖基-N-新四糖18。在体内,一定比例的乳糖基-N-新四糖18由酶 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡糖胺转移酶15和1,4-半乳糖基转移酶17被进一步转换成更大的寡糖 19,20,21。如果本发明的方法的目的是纯化乳糖基-N-新四糖17,较大的寡核苷酸以及较小的寡核苷酸(离析物)乳糖14和乳糖基-N-丙糖16可在含有乳糖基-N-新四糖17的粗溶液中作为污染物22存在。本发明方法允许有效的去除所述污染物22。

[0094] 图7示出了两个不同纳滤膜通过纳滤浓缩含2'-岩藻糖基乳糖的溶液的比较(VCF:体积浓度因子,通量:表示水透过纳滤膜的速率)。阿法拉伐纳(Alfa Laval)滤膜类型NF99(NF)和阿法拉伐纳滤膜类型NF99HF用作纳滤膜。由此可见,当VCF $\leq 6$ 时,NF99HF纳滤膜允许较高的通量,即溶液更快浓缩。

[0095] 图8示出实施例6(蔗糖用作内标;参见图8A)的SMB色谱的进料(图8A)和残液(图8B)的HPLC分析。ReproSil碳水化合物柱(氨基官能化二氧化硅柱;5 $\mu\text{m}$ ;250 $\times$ 4.6mm;Dr.Maisch GmbH;Ammerbuch)用作分析柱,采用1.4ml/min的流速。使用乙腈和水的混合物(68体积%:32体积%)作为洗脱液。洗脱是等梯度的。进样量为20 $\mu\text{l}$ 。烘箱温度为35 $^{\circ}\text{C}$ 。在SMB色谱中,使用的强阳离子交换树脂以H<sup>+</sup>形式存在。

[0096] 图9示出实施例6的SMB色谱的提取物的HPLC分析。ReproSil碳水化合物柱(氨基官能化的二氧化硅柱;5 $\mu\text{m}$ ;250 $\times$ 4.6mm;Dr.Maisch GmbH; Ammerbuch)用作分析柱,采用1.4ml/min的流速。使用乙腈和水的混合物(68体积%:32体积%)的混合物作为洗脱液。洗脱是等梯度的。进样量为20 $\mu\text{l}$ 。烘箱温度为35 $^{\circ}\text{C}$ 。在SMB色谱中,使用的强阳离子交换树脂以H<sup>+</sup>形式存在。

[0097] 图10示出了实施例6的第二SMB色谱(根据本发明的进一步的SMB色谱)的提取物的HPLC分析。ReproSil碳水化合物柱(氨基官能团化的二氧化硅柱;5 $\mu\text{m}$ ;250 $\times$ 4.6mm;Dr.Maisch GmbH;Ammerbuch)用作分析柱,使用1.4ml/min的流速。使用丙酮和水的混合物(68体积%:32体积%作为洗脱液。洗脱是等梯度的。进样量为20 $\mu\text{l}$ 。烘箱温度为35 $^{\circ}\text{C}$ 。在SMB色谱中,使用的强阳离子交换树脂以H<sup>+</sup>形式存在。

[0098] 图11示出了实施例7的SMB色谱的进料(图11A)和残液(图11B)的HPLC分析。

ReproSil碳水化合物柱(氨基官能团化的二氧化硅柱;5μm; 250×4.6mm;Dr.Maisch GmbH; Ammerbuch)用作分析柱,使用1.4ml/min的流速。使用丙酮和水的混合物(68体积%:32体积%)作为洗脱液。洗脱是等梯度的。进样量为20μl。烘箱温度为35℃。在SMB色谱中,使用的强阳离子交换树脂以Ca<sup>+</sup>形式存在。

[0099] 图12示出了实施例7的SMB色谱的提取物的HPLC分析。ReproSil碳水化合物柱(氨基官能团化的二氧化硅柱;5μm;250×4.6mm;Dr.Maisch GmbH;Ammerbuch)用作分析柱,使用1.4ml/min的流速。使用丙酮和水的混合物(68体积%:32体积%)作为洗脱液。洗脱是等梯度的。进样量为20μl。烘箱温度为35℃。在SMB色谱中,使用的强阳离子交换树脂以Ca<sup>+</sup>形式存在。

## 具体实施方式

[0100] 实施例1:使用模拟移动床色谱(SMB色谱)纯化2'-岩藻糖基乳糖

[0101] 使用配备有PC-Cell1 E200膜叠堆(membrane stack)的PC-cell1 BED 1-3电渗析装置(PC-cell1,霍伊斯韦勒,德国),将澄清的含有浓度为250g/L的2'-岩藻糖基乳糖的无颗粒溶液电渗析至0.5mS/cm。所述叠堆包含以下的膜:具有60Da的尺寸排阻极限的阳离子交换膜CEM:PC SK和阴离子交换膜AEM: PcAcid60。

[0102] 对于SMB纯化,在40℃温度下使用真空浓缩器将2'-岩藻糖基乳糖溶液浓缩至300g/L。对于SMB色谱,采用配备有在4个区域中设置的12个柱子(具有尺寸为40mm×740mm的Prosep®柱子(拉泰褐,埃佩尔海姆,德国))的闭合环路SMB系统。每个柱子包含760g的Purolite® PCR833H<sup>+</sup>(漂莱特,拉廷根,德国)强阳离子交换树脂。

[0103] 在25℃的温度下,在以下设定的流动参数下操作所述系统:流速区I为30.00ml/min,流速区II设定为21.00ml/min,流速区III为21.48ml/min,流速区IV的流速为18.44ml/min,进料设定为3.00ml/min,洗脱液流设定为11.56ml/min,转换时间设定为17.92min。含10% (v/v)的食品级乙醇的水作为洗脱液。

[0104] 主要污染物例如乳糖,单糖例如岩藻糖,葡萄糖,半乳糖和甘油,被分馏成提取物。2'-岩藻糖基乳糖以及较大的寡糖污染物(例如双岩藻糖基乳糖)被分馏进残液。

[0105] 2'-岩藻糖基乳糖通过SMB纯化步骤被略微稀释-在残液中的2'-岩藻糖基乳糖的浓度测定为200g/1。残液的pH通过使用0.2N的NaOH调节至pH 7。如所述设置的SMB系统可以连续操作至少3个月。

[0106] 然后,将所得的溶液再次进行电渗析,直至获得小于0.5mS/cm的电导率,并浓缩以获得40% (w/v)的2'-岩藻糖基乳糖。

[0107] 然后使溶液通过3kDa的过滤器(Pall Microza公司超滤中空纤维组件 SEP-2013, Pall公司,德赖艾希)以进行无菌过滤和去除内毒素。

[0108] 使用该方案,可以获得具有90.4%的纯度的2'-岩藻糖基乳糖。主要的污染物是3'-岩藻糖基乳糖(2.6%)、双岩藻糖基乳糖(1.5%)和乳糖(1.4%)。纯化的产率约为80%。

[0109] 实施例2:使用多组分SMB色谱分离法纯化2'-岩藻糖基乳糖。

[0110] 使用配备有PC-Cell1 E200膜叠堆的PC-cell1 BED 1-3电渗滤装置(PC-cell1,霍伊斯韦勒,德国)将澄清的含浓度为250g/L的2'-岩藻糖基乳糖的无颗粒溶液电渗析至0.5mS/cm。所述叠堆包含以下膜:具有60Da的尺寸排阻极限的阳离子交换膜的CEM:PC SK和阴离子

交换膜AEM:PcAcid60。

[0111] 对于SMB纯化,在40℃温度下使用真空浓缩器将2'-岩藻糖基乳糖溶液浓缩至300g/L。对于SMB色谱,采用配备有在2×4个区域中设置的24个柱子(具有尺寸为40mm×740mm的Prosep®柱子(拉泰褐,埃佩尔海姆,德国))的闭合环路多组分SMB系统。每个柱子包含760g的Purolite® PCR833H+(漂莱特,拉廷根,德国)强阳离子交换树脂。

[0112] 在25℃的温度下,在以下设定的流动参数下操作所述系统:流速区Ia为30.00ml/min,流速区IIa设定为21.00ml/min,流速区IIIa为21.48ml/min,流速区IVa的流速为18.44ml/min,进料设定为3.00ml/min,洗脱液流设定为11.56ml/min,转换时间设定为17.92min。

[0113] 第一次分离的残液以3.04mL/min的流速向第二分离步骤传递。区域Ib的流速保持在30ml/min,区域IIb的流速设定为19.61ml/min,区域IIIb的流速设定为21.63ml/min,区域IVb的流速设定为18.46ml/min,洗脱液流设定为近似11.56ml/min,且区域Ib到IVb的转换时间为10.46min。

[0114] 含10% (v/v)的食品级乙醇的水作为洗脱液。

[0115] 在多组分分离中,在第一个分离步骤的提取物中,污染物被证明为例如乳糖,单糖例如岩藻糖,葡萄糖,半乳糖和甘油。且较大的寡糖污染物(例如双岩藻糖基乳糖)被分馏进第二分离步骤的残液中。

[0116] 2'-岩藻糖基乳糖被分馏到第一分离步骤的残液(raffinate)和第二分离步骤的提取物中,并因此不含低分子量和高分子量的污染物。2'-岩藻糖基乳糖通过SMB纯化步骤仅被略微稀释-在第二纯化步骤的提取物中的2'-岩藻糖基乳糖的浓度测定为200g/l。

[0117] 在第一分离步骤后残液的pH使用0.2N的NaOH调节至pH 7。

[0118] 使用该方案,可以获得具有93.0%的纯度的2'-岩藻糖基乳糖。主要的污染物是3'-岩藻糖基乳糖(1.1%)、双岩藻糖基乳糖(0.9%)和乳糖(1.0%)。

[0119] 实施例3:通过喷雾干燥获得固体形式的2'-岩藻糖基乳糖

[0120] 对通过SMB色谱得到的2'-岩藻糖基乳糖馏分再次进行电渗析处理,直到获得低于0.5mS/cm的电导率。然后将馏分在真空下浓缩以得到含有40% (w/v)的2'-岩藻糖基乳糖的2'-岩藻糖基乳糖馏分。将该溶液随后通过3kDa 的过滤器(Pall Microza超滤中空纤维组件SEP-2013,Pall公司,德赖艾烯,德国)以去进行无菌过滤和除内毒素。

[0121] 然后将由此获得的无菌的2'-岩藻糖基乳糖溶液使用NUBILOSA LTC-GMP喷雾干燥器(NUBILOSA,康斯坦茨,德国)喷雾干燥。对于2'-岩藻糖基乳糖的喷雾干燥,40% (w/v)溶液在压力下通过设定为130℃的进口温度的喷雾干燥器的喷嘴。流量调节为维持67℃至66℃的出口温度。

[0122] 使用这些设置,可以获得具有小于5%的水分的喷雾干燥的粉末。使用卡尔-费歇尔滴定法测定水分含量。

[0123] 实施例4:表征喷雾干燥的2'-岩藻糖基乳糖

[0124] 1. 差示扫描量热法(Differential scanning calorimetry) (DSC)

[0125] 使用梅特勒-托利多821e(梅特勒-托利多,吉森,德国)测定喷雾干燥的2'-岩藻糖基乳糖的两个样品(样品#1和样品#2)的热事件(thermal events)。

[0126] 将约25mg的喷雾干燥的样品在卷曲铝坩埚(梅特勒-托利多,吉森,德国)中进行分

析。将样品以10K/min冷却至0°C，并以10K/min的扫描速率再加热到100°C。在将样品冷却至0°C后，在第二次加热循环中样品被加热至150°C。在热扫描过程中，取基线的吸热偏移(endothemic shift)的中点作为Tg。通过事件的峰值温度和归一化能量的方式报告放热峰和吸热峰。样品的DSC分析的结果总结于表1中。

[0127] 表1

[0128]	样品	第一次加热扫描					第二次加热扫描				
		Tg		吸热		放热		Tg1	Tg2	放热	
		°C	°C	J/g	°C	J/g	°C	°C	°C	J/g	
	#1	63.9	87.9	-0.5	82.8	0.7	67.4	122.6	n.d.	n.d.	
	#2	87.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	84.6	n.d.	125.9	1.1	

[0129] n.d.:未检出

[0130] 样品#1的DSC分析表明在第二次加热扫描中在67.4°C有主要的玻璃化转变(Tg)。在第二次加热扫描中在122.6°C检测到小的第二Tg。在第一次加热扫描中检测到主要的玻璃化转变Tg，之后在高于该Tg的温度下检测到吸热和放热事件。这些事件归因于样品中的松弛效果(relaxation effects)。

[0131] 样品#2的DSC分析显示第二次加热扫描中在84.6°C呈实质上更高的玻璃化转变(Tg)，也在第一次加热扫描中被检测到。这可能表明样品#2相比于样品#1具有较低的残余水含量。由于检测到的玻璃化转变温度接近于第一次加热扫描的最终温度，潜在的松弛现象可能不会被检测到。在本实施例中，尽管在第二次加热扫描中在125.9°C下可看到小放热峰，无法检测到第二个玻璃化转变。

[0132] 2.X射线粉末衍射(X-ray powder diffraction)

[0133] 使用广角X-射线粉末衍射(XRD)研究的样品#1和样品#2的形态。使用配备有铜阳极(45kV, 40mA, 在0.154nm的波长下K<sub>α1</sub>发射)和PIXcel3D检测器的X射线衍射装置Empyrean(PANalytical公司, 阿尔默洛, 荷兰)。对约100mg的喷雾干燥的样品以5-45°2θ的角度范围，以0.04°2θ的步长以及每步100秒的计数时间，以反射模式进行分析。

[0134] 样品#1和样品#2的XRD分析表明完全无定型状态的两种样品，并显示出没有结晶物质的特征峰(参见图4两个衍射图谱的重合)。

[0135] 3.激光衍射(Laser diffraction)

[0136] 使用配备有用于检测>500nm的颗粒的605nm的激光二极管以及用于检测<405nm的颗粒的405nm的蓝色发光二极管(LED)的Partica LA-950激光衍射颗粒分布分析仪(Horiba公司, 京都, 日本)进行激光衍射测定。异辛烷作为分散介质(1.391的折射率)。由于样品的折射率是未知的，使用糖(二糖)颗粒的折射率(1.530)。通过最多5分钟的超声处理将样品分散在异辛烷中。在测量之前，系统用异辛烷做空白。测定3次各样品的分散度，报告平均值和标准偏差。

[0137] 记录平均粒径(按体积的加权平均粒径)和模式粒径(峰值分布)。除了按体积(q%)的颗粒分布，结果记录为：

[0138] d(v,10)：对应于10体积%的累计筛下分布的粒径

[0139] d(v,50)：对应于50体积%的累计筛下分布的粒径

[0140] d(v,90)：对应于90体积%的累计筛下分布的粒径

[0141] 样品#1和样品#2的颗粒尺寸分布在图5中示出。对于两种样品,表示最高强度的粒径的模式尺寸是相当的。总体而言,对于喷雾干燥的颗粒,平均粒径分别为67.85 $\mu\text{m}$ (样品#1)和43.65 $\mu\text{m}$ (样品#2),被视为是异常高的。具有较大粒径检测到的馏分可能是由聚结的粉末颗粒而引起的。

[0142] 表2.样品#1和样品#2的粒径特性总结。

[0143]

尺寸	样品#1	样品#2
平均 [ $\mu\text{m}$ ]	67.84 $\pm$ 38.12	43.65 $\pm$ 0.57
模式值	12.60 $\pm$ 0.07	13.92 $\pm$ 0.01
D10 [ $\mu\text{m}$ ]	10.39 $\pm$ 0.17	10.65 $\pm$ 0.01
D50 [ $\mu\text{m}$ ]	25.67 $\pm$ 4.41	19.68 $\pm$ 0.03
D90 [ $\mu\text{m}$ ]	68.13 $\pm$ 26.30	52.37 $\pm$ 0.76

[0144] 实施例5:使用纳滤将含有2'-岩藻糖基乳糖的上清液减小体积和脱盐

[0145] 采用配备有NF99(Alfa Laval NF99)或NF99HF(Alfa Laval NF99HF)纳滤膜的Alfa laval M-20膜过滤组件对含有2'-岩藻糖基乳糖的培养基上清液进行浓缩和脱盐。所使用的含有2'-岩藻糖基乳糖的培养基上清液(含25g/1的2'-岩藻糖基乳糖)通过使用交叉流过滤从发酵微生物生物质中分离。交叉流过滤膜的分子限值为150kDa (StrassBurger过滤微交叉Module<sup>®</sup> FS10LFC-FUS1582)。

[0146] 在进行纳滤之前,将不含细胞的滤液使用阳离子交换器(质子形式(Lanxess)的Lewatit S2568)和阴离子交换器(碳酸盐形式(Lanxess)的Lewatit S6368)进行处理。该溶液在每个离子交换器步骤后分别使用氢氧化钠或盐酸中性化。膜组件的入口压力为42bar,出口压力为40bar,膜组件中的进料流速为8升/min。将滤出物(permeate)从过程中除去,而滤余液(retendate)重新提供给贮存器和膜组件。连接到膜叠堆的贮存器的体积为6升。在含有2'-岩藻糖基乳糖溶液的浓缩过程中,2'-岩藻糖基乳糖的培养基上清液被连续填充到贮存器,直到获得8倍浓缩的溶液。

[0147] 图7显示出两个使用的膜获得的通量( $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$ )相对于体积浓缩因子(volume concentration factor) (VCF)的图。将2'-岩藻糖基乳糖浓缩液浓缩8倍至约为200g/1的2'-岩藻糖基乳糖,通过以与从膜组件中获得滤出物相同的速率加入去离子水将所述浓缩的溶液进行渗滤脱盐。利用渗滤步骤,使用HF99HF膜,2'-岩藻糖基乳糖浓缩物的导电率可以从25mS减小到小于7mS。

[0148] 通过使用该纳滤方法,可在温和的条件下(避免热暴露),将2'-岩藻糖基乳糖溶液浓缩8倍至具有 $\geq 200\text{g}/1$ 的2'-岩藻糖基乳糖的2'-岩藻糖基乳糖浓缩物,并且在该渗滤步骤大量盐成分可以被去除。将2'-岩藻糖基乳糖浓缩物进行电渗析,用于进一步减低盐含量。

[0149] 实施例6:使用两个模拟移动床色谱步骤和H<sup>+</sup>形式的离子交换树脂纯化乳糖基-N-四糖。

[0150] 使用PC-细胞电渗析装置(见上文)将从细菌发酵物获得的澄清不含颗粒的乳糖基-N-四糖的溶液(30g/1)电渗析至0.5mS/cm的电导率。对于SMB色谱,将乳糖基-N-四糖溶液在40°C的真空下浓缩至50g/1。可替代地,含有乳糖基-N-四糖的溶液可以使用纳滤膜(例如Alfa Laval的纳滤膜HF99HF)脱盐并浓缩。

[0151] 对于SMB色谱,采用装配有在4个区域中设置的12个柱子(具有尺寸为40mm×740mm的Prosep®玻璃柱子(拉泰褐,埃佩尔海姆,德国))的闭合环路SMB系统。每个玻璃柱子包含760g的Purolite® PCR833H+强阳离子交换树脂。所述强阳离子交换树脂以H<sup>+</sup>形式存在。

[0152] 在25°C的温度下,在以下设定的流动参数下操作该系统:流速区I的流速设定为30.00ml/min,流速区II的流速设定为19.07ml/min,流速区IV的流速设定为18.44ml/min。进料保持在1.00ml/min,洗脱液流设定为11.56 ml/min,转换时间设定为17.92min。含10%(v/v)的食品级乙醇的水作为洗脱液。

[0153] 在这些参数下,乳糖基-N-四糖以及较大的中性寡糖被分馏进残液。乳糖基-N-四糖的纯度为86.3%,而不是在SMB进料的33.4%(参照图8A的SMB 进料的HPLC分析,图8B的SMB残液的HPLC分析)。在SMB提取物馏分中发现污染物如乳糖、单糖和甘油(参照图8,对SMB提取物馏分的HPLC 分析)。将含有乳糖基-N-四糖的残液用0.2N的NaOH溶液调节至中性pH。

[0154] 将获得的含有乳糖基-N-四糖的提取物的pH通过使用0.2N的NaOH调节至pH 7。然后,将获得的溶液进行电渗析直至再次获得小于0.5mS的电导率。然后将溶液在真空下浓缩至约50g/1的乳糖基-N-四糖,然后通过3kDa的交叉流过滤器(Pall Microza超滤中空纤维组件SEP-2013,Pall公司,德赖艾希) 进行无菌过滤。

[0155] 为了将较大的寡糖污染物与乳糖基-N-四糖分离,进行第二次SMB色谱分离。使用相同的SMB系统,参数改变如下:流速区域I为30ml/min,流速区域II为19.27ml/min,流速区域IV为17.30ml/min。进料设定为2.08 ml/min,洗脱液流为12.70ml/min。残液流为4.04ml/min和提取物流为10.73 ml/min。SMB分离的转换时间设定为10.46min。洗脱液再次采用水/乙醇混合物9:1 (v/v)。通过SMB色谱的第二次乳糖基-N-四糖分离提取物的HPLC 分析在图10中示出。

[0156] 在这些条件下,乳糖基-N-四糖被分馏成提取物以及在残液中占总量的5 至10%的较大中性寡糖。使用本方法(第二次SMB步骤之后的氨基官能化的二氧化硅柱),可以获得93.1%的纯度的乳糖基-N-四糖。

[0157] 实施例7:使用具有Ca<sup>2+</sup>形式的离子交换树脂的模拟移动床色谱纯化乳糖基-N-四糖

[0158] 使用PC-细胞电渗析装置(见上文)将从细菌发酵物获得的澄清不含颗粒的乳糖基-N-四糖的溶液(30g/1)电渗析至0.5mS/cm的电导率。

[0159] 对于钙作为反离子的SMB色谱,乳糖基-N-四糖溶液在40°C的真空下被浓缩至50g/1。对于SMB色谱,采用装配有在4个区域中设置的12个柱子(具有尺寸为40mm×740mm的Prosep®玻璃柱子(拉泰褐,埃佩尔海姆,德国)) 的闭合环路SMB系统。

[0160] 每个柱子包含760g的Purolite® PCR833H+强阳离子交换树脂。用50升的200mM CaCl<sub>2</sub>洗涤阳离子交换树脂,从而用Ca<sup>2+</sup>置换H<sup>+</sup>离子。因此,强阳离子交换树脂以Ca<sup>2+</sup>形式存在。

[0161] 在25°C的温度下,在以下设定的流动参数的操作该系统:流速区域I设定为30.00ml/min,流速区域II的流速设定为20.07ml/min,流速区域IV的流速为17.04ml/min。进料设定为2.5ml/min,洗脱液流设定为11.56ml/min,转换时间设定为17.92min。含10%(v/v)的食品级乙醇的水作为洗脱液。

[0162] 实施例8:通过喷雾干燥获得固体形式的乳糖基-N-四糖。

[0163] 将含有乳糖基-N-四糖的馏分在真空下浓缩以获得25%的浓度(w/v)的乳糖基-N-四糖浓缩物。将该溶液随后通过3kDa的过滤器(Pall Microza超滤中空纤维组件SEP-1013, Pall公司,德赖艾烯,德国)以进行无菌过滤和去除内毒素。

[0164] 然后将由此获得的无菌乳糖基-N-四糖溶液使用迷你型喷雾干燥仪B-290(步琪实验室有限公司,埃森,德国)喷雾干燥。对于乳糖基-N-四糖的喷雾干燥,将该溶液在压力下通过具有120°C和130°C之间的出口温度的喷雾干燥器喷嘴,且流量调节为维持66°C至67°C之间的排气温度。使用这些设置,可以获得具有7-9%的水分的喷雾干燥粉末,72%产率的喷雾干燥的乳糖基-N-四糖。水分含量用卡尔-费歇尔滴定法测定。

[0165] 本发明特别涉及以下方面:

[0166] 1. 一种用于在连续色谱中从含有中性人乳寡糖和污染物的粗溶液中纯化中性人乳寡糖的方法,

[0167] 其中所述的含有中性人乳寡糖和污染物的粗溶液包含选自微生物发酵提取物,生物催化反应溶液,化学合成溶液,及其组合的溶液,或者由选自微生物发酵提取物,生物催化反应溶液,化学合成溶液,及其组合的溶液组成,其中所述溶液中的中性人乳寡糖的纯度<80%,

[0168] 其中,将所述粗溶液应用到至少一个使用模拟移动床色谱的纯化步骤,提供其中含有具有≥80%纯度的所述中性人乳寡糖的纯化溶液。

[0169] 2. 根据方面1所述的方法,其中,所述粗溶液中的中性人乳寡糖的纯度为≤70%,≤60%,≤50%,≤40%,≤30%,≤20%,≤10%或≤5%和/或纯化溶液含有具有≥85%的纯度,优选≥90%的纯度的所述中性人乳寡糖。

[0170] 3. 根据方面1或2中所述的方法,其中,至少一个模拟移动床色谱具有

[0171] i) 至少4个柱子,优选至少8个柱子,更优选至少12个柱子,其中至少一个柱子包括弱的或强的阳离子交换树脂,优选H<sup>+</sup>形式或Ca<sup>2+</sup>形式的阳离子交换树脂;和/或

[0172] ii) 具有不同流速的四个区域I,II,III和IV;

[0173] iii) 洗脱液,包含水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95体积%的水,最优选9-11体积%的乙醇和89-91体积%的水,或由水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95体积%的水,最优选9-11体积%的乙醇和89-91体积%的水组成,其中,所述洗脱液可选地进一步包含硫酸,优选≤10mM或更少的硫酸;和/或

[0174] iv) 操作温度为15°C至60°C,优选20°C至55°C,更优选25°C至50°C。

[0175] 4. 根据方面1至3中任一项所述的方法,其中,将所述纯化溶液应用到至少一个进一步的使用模拟移动床色谱的纯化步骤,提供其中含有具有≥92%纯度的所述中性的人乳寡糖的纯化溶液。

[0176] 5. 根据方面4所述的方法,其中,进一步的模拟移动床色谱具有

[0177] i) 至少4个柱子,优选至少8个柱子,更优选至少12个柱子,其中至少一个柱子包括弱的或强的阳离子交换树脂,优选H<sup>+</sup>形式或Ca<sup>2+</sup>形式的阳离子交换树脂;和/或

[0178] ii) 具有不同流速的四个区域I,II,III和IV;

[0179] iii) 洗脱液,包含水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95体积%的水,最优选9-11体积%的乙醇和89-91体积%的水,或由水,优选乙醇和水,更优选5-15体积%的乙醇和85-95体积%的水,最优选9-11体积%的乙醇和89-91体积%的水组成,其中,

所述洗脱液可选地进一步包含硫酸, 优选 $\leq 10\text{mM}$ 或更少的硫酸; 和/或

[0180] iv) 操作温度为15°C至60°C, 优选20°C至55°C, 更优选25°C至50°C。

[0181] 6. 根据方面1至5中任一项所述的方法, 其中, 所述含有中性人乳寡糖和污染物的粗溶液包含微生物发酵提取物或由微生物发酵提取物组成, 其中所述微生物发酵提取物是在至少一个微生物发酵步骤获得的, 优选在其后进行以下至少一个步骤

[0182] a) 对溶液, 优选对所述粗溶液进行过滤, 以在微生物发酵后将可溶性物质与不溶性物质分离;

[0183] b) 对溶液, 优选对步骤a)中获得的溶液进行离子交换色谱, 优选阳离子交换色谱, 更优选在进行阳离子交换色谱后进行阴离子交换色谱;

[0184] c) 对溶液, 优选对在步骤b)中获得的溶液进行浓缩, 更优选通过水的蒸发和/或通过纳滤进行浓缩, 可选的进行多于一次浓缩;

[0185] d) 对溶液, 优选对在步骤c)中获得的溶液进行渗析, 更优选进行电渗析和/或渗滤, 最优选用纳滤膜进行渗滤, 可选的进行多于一次渗析;

[0186] e) 使用模拟移动床色谱对溶液, 优选对在步骤d)中获得的溶液进行色谱分离;

[0187] f) 对溶液, 优选对在步骤e)中获得的溶液进行过滤, 以将中性人乳寡糖与有色污染物分离, 更优选通过穿过活性炭的过滤进行分离; 以及

[0188] g) 对含有所述中性人乳寡糖的纯化溶液, 优选对在步骤f)中获得的纯化溶液进行喷雾干燥;

[0189] 其中最优选, 所有步骤a)至g)以连续方式实施。

[0190] 7. 根据方面1至6中的任一项所述的方法, 其中, 在将所述溶液应用到所述至少一个模拟床移动色谱步骤之前, 将所述含有中性人乳寡糖的溶液

[0191] i) 进行过滤以去除任何不溶物质, 优选用活性炭、木炭和/或硅藻土过滤以去除任何不溶物质和有机污染物, 更优选的通过交叉流过滤进行过滤, 最优选的通过使用微滤膜的交叉流过滤进行过滤; 和/或

[0192] ii) 应用到至少一个使用阳离子和/或阴离子交换色谱的纯化步骤, 优选先应用到至少一个阳离子交换色谱步骤然后应用到至少一个阴离子交换色谱步骤。

[0193] 8. 根据方面1至7中任一项所述的方法, 其中, 在将所述溶液应用到至少一个使用模拟移动床色谱的纯化步骤之前, 或在将所述溶液应用到使用模拟移动床色谱的纯化步骤之后, 将所述含有中性人乳寡糖的溶液进行电渗析和/或渗滤, 优选用纳滤膜进行渗滤, 更优选用具有 $\leq 20\text{\AA}$ 的尺寸排阻极限的纳滤膜进行渗滤, 其中最优选地, 将所述溶液渗析到 $\leq 15\text{mS/cm}$ , 优选 $\leq 10\text{mS/cm}$ , 更优选 $\leq 5\text{mS/cm}$ 的电导率。

[0194] 9. 根据方面8所述的方法, 其中, 在渗析之后, 将所述包含中性人乳寡糖的溶液进行浓缩

[0195] i) 浓缩到 $\geq 100\text{g/l}$ , 优选 $200\text{g/l}$ , 更优选 $\geq 300\text{g/l}$ 的浓度; 和/或

[0196] ii) 采用真空浓缩器浓缩; 和/或

[0197] iii) 通过纳滤浓缩; 和/或

[0198] iv) 在4°C至50°C, 优选10°C至45°C, 可选的20°C至40°C或30°C至35°C的温度下进行浓缩。

[0199] 10. 根据方面1-9中任一项所述的方法, 其中, 所述纯化溶液是无菌过滤的和/或经

去除内毒素的,优选所述纯化溶液通过3kDa的过滤器过滤。

[0200] 11.根据方面1至10中任一项所述的方法,其中,所述纯化溶液是经喷雾干燥的,特别是在中性人乳寡糖浓度为20-60% (w/v),优选浓度为30-50% (w/v),更优选浓度为35-45% (w/v)的浓度下,喷嘴温度为110-150°C,优选为120-140°C,更优选为125-135°C和/或出口温度为60-80°C,优选为65-70 °C下进行喷雾干燥。

[0201] 12.根据方面1-11中任一项所述的方法,其中,所述中性人乳寡糖是具有多于3个单糖单元的中性人乳寡糖,优选中性人乳三糖,四糖,戊糖或己糖,更优选所述中性HMO选自2'-岩藻糖基乳糖,3-岩藻糖基乳糖,2',3-双岩藻糖基乳糖,乳糖基-N-丙糖II,乳糖基-N-四糖,乳糖基-N-新四糖,乳糖基-N-岩藻五糖I,乳糖基-N-新岩藻五糖I,乳糖基-N-岩藻五糖II,乳糖基-N-岩藻五糖III,乳糖基-N-岩藻五糖V,乳糖基-N-新岩藻五糖V,乳糖基-N-双岩藻己糖I,乳糖基-N-双岩藻己糖II,6'-半乳糖基乳糖,3'-半乳糖基乳糖,乳糖基-N-己糖,乳糖基-N-新己糖,对乳糖基-N-己糖,对乳糖基-N-新己糖和双岩藻糖基-乳糖基-N-新己糖,最优选的中性HMO是2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖。

[0202] 13.根据方面1至12中任一项所述的方法,其中,在连续色谱中用于纯化中性人乳寡糖的方法是以连续方式用于纯化中性人乳寡糖的方法,其中所述中性人乳寡糖是优选为2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-四糖。

[0203] 14.一种用根据方面1至13中的任一项所述的方法制备的中性人乳寡糖,其中所述中性人乳寡糖是优选经喷雾干燥的。

[0204] 15.根据方面14所述的中性人乳寡糖,其中所述中性人乳寡糖具有

[0205] i) 固体颗粒的形式;和/或

[0206] ii) 60°C至90°C,优选62°C至88°C,更优选64°C至86°C的玻璃化转变温度,该温度通过差示扫描量热法测定;和/或

[0207] iii) 5至500μm,优选10至300μm的粒径,所述粒径通过激光衍射来测定;和/或

[0208] iv) 10至100μm,优选20至90μm,更优选30至80μm,最优选40至 70μm的平均颗粒尺寸,由激光衍射法测定;和/或

[0209] v) 无定形态,优选在X射线粉末衍射中没有结晶物质特征峰的无定形态,和/或

[0210] vi) ≤10%,优选≤8%,更优选<5%的水分含量。

[0211] 16.根据方面14或15所述的中性人乳寡糖,在医药中的应用,优选在胃肠道疾病的预防或治疗中的应用。

[0212] 17.根据方面14至16中任一项所述的中性人乳寡糖,其中,所述中性人乳寡糖是具有多于3个单糖单元的中性人乳寡糖,优选中性人乳三糖,四糖,戊糖或己糖,更优选的是所述中性HMO选自2'-岩藻糖基乳糖,3-岩藻糖基乳糖,2',3-双岩藻糖基乳糖,乳糖基-N-丙糖II,乳糖基-N-四糖,乳糖基-N-新四糖,乳糖基-N-岩藻五糖I,乳糖基-N-新岩藻五糖I,乳糖基-N-岩藻五糖II,乳糖基-N-岩藻五糖III,乳糖基-N-岩藻五糖V,乳糖基-N-新岩藻五糖V,乳糖基-N-双岩藻己糖I,乳糖基-N-双岩藻己糖II,6'-半乳糖基乳糖,3'-半乳糖基乳糖,乳糖基-N-己糖,乳糖基-N-新己糖,对乳糖基-N-己糖,对乳糖基-N-新己糖和双岩藻糖基-乳糖基-N-新己糖,最优选的是,所述中性HMO 是2'-岩藻糖基乳糖或乳糖基-N-新四糖。

[0213] 18.一种根据方面14至17中任一项所述的中性人乳寡糖作为食品的添加剂,优选作为人类食品和/或宠物食品中的添加剂,更优选作为人类婴儿食品的添加剂的应用。

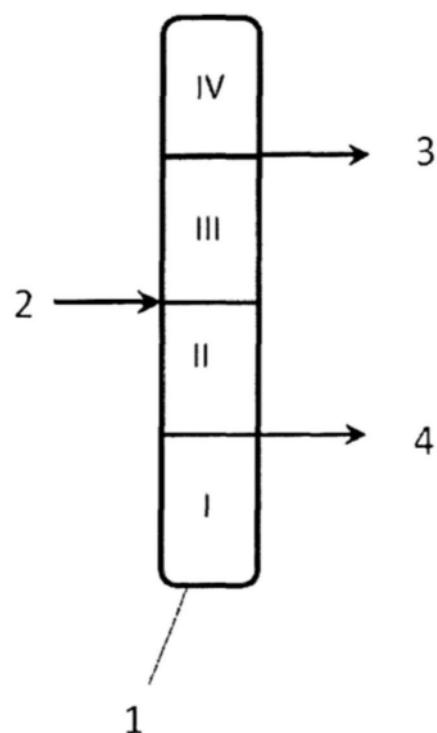


图1

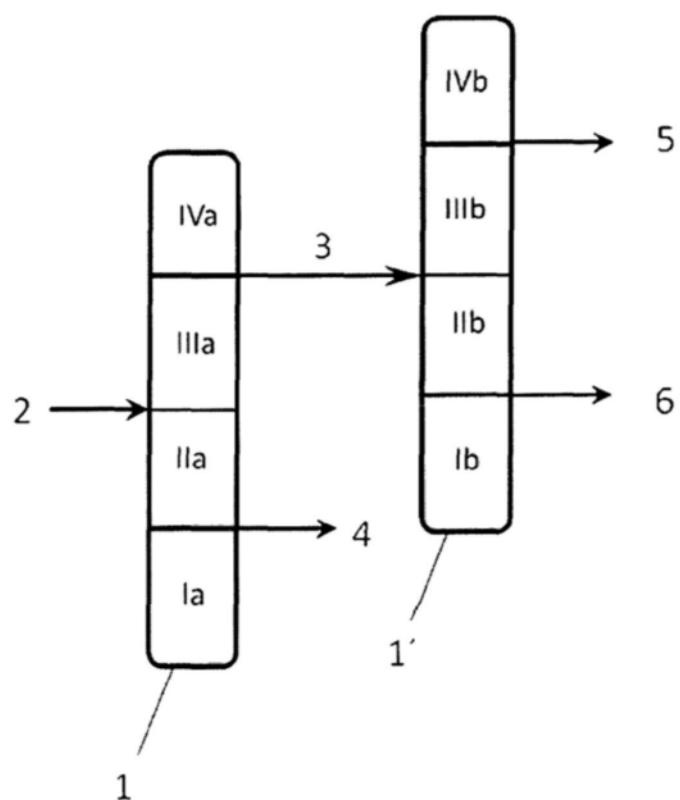


图2

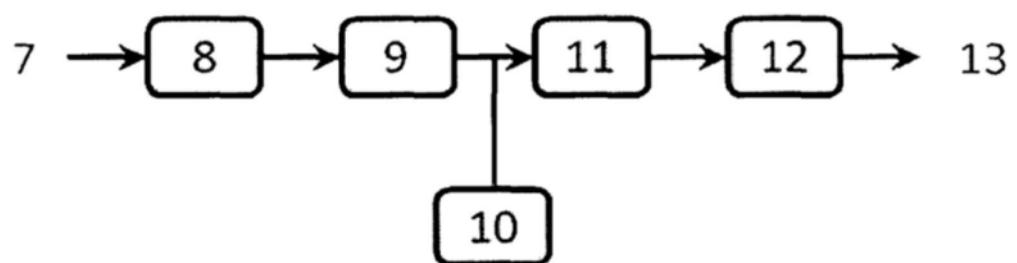


图3

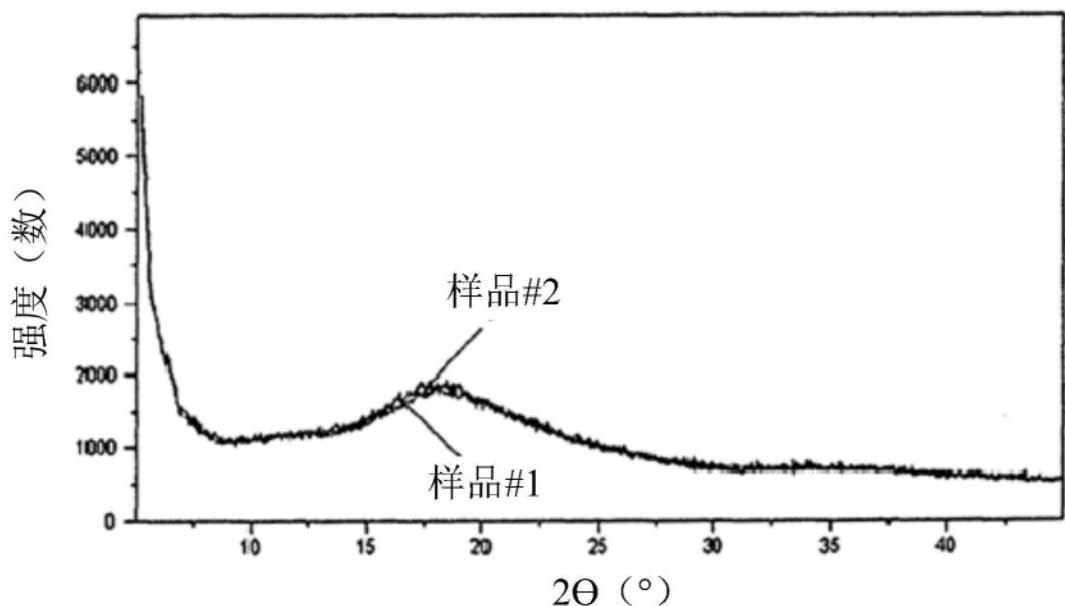


图4

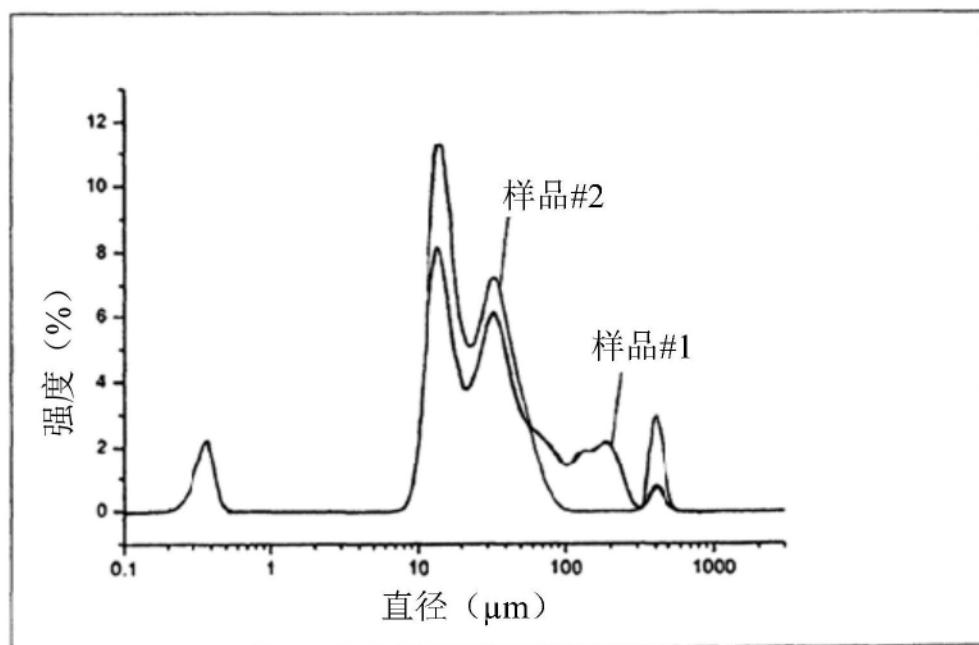


图5

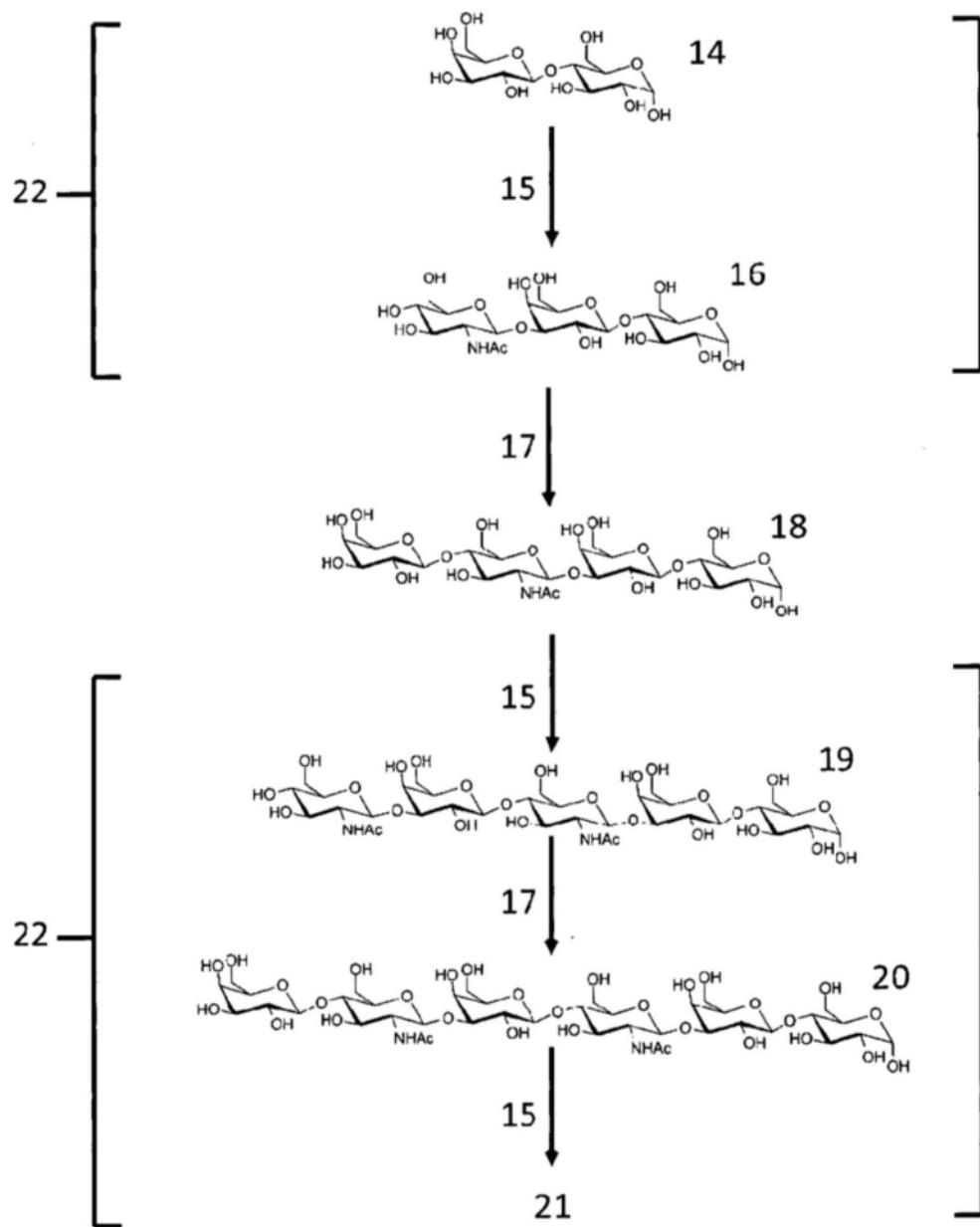


图6

通量 相对于 VCF

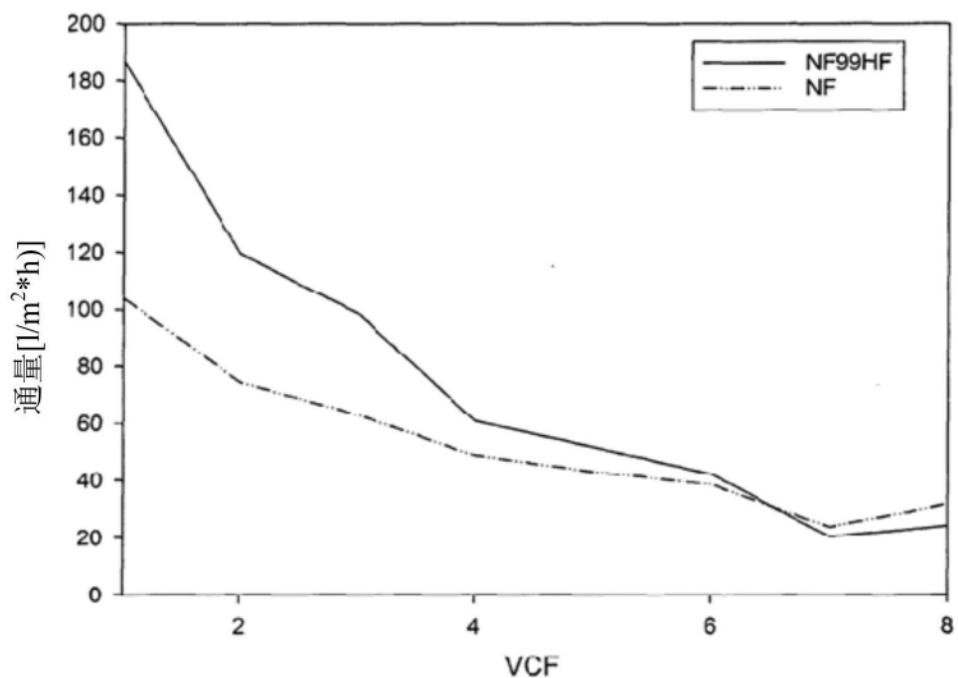


图7

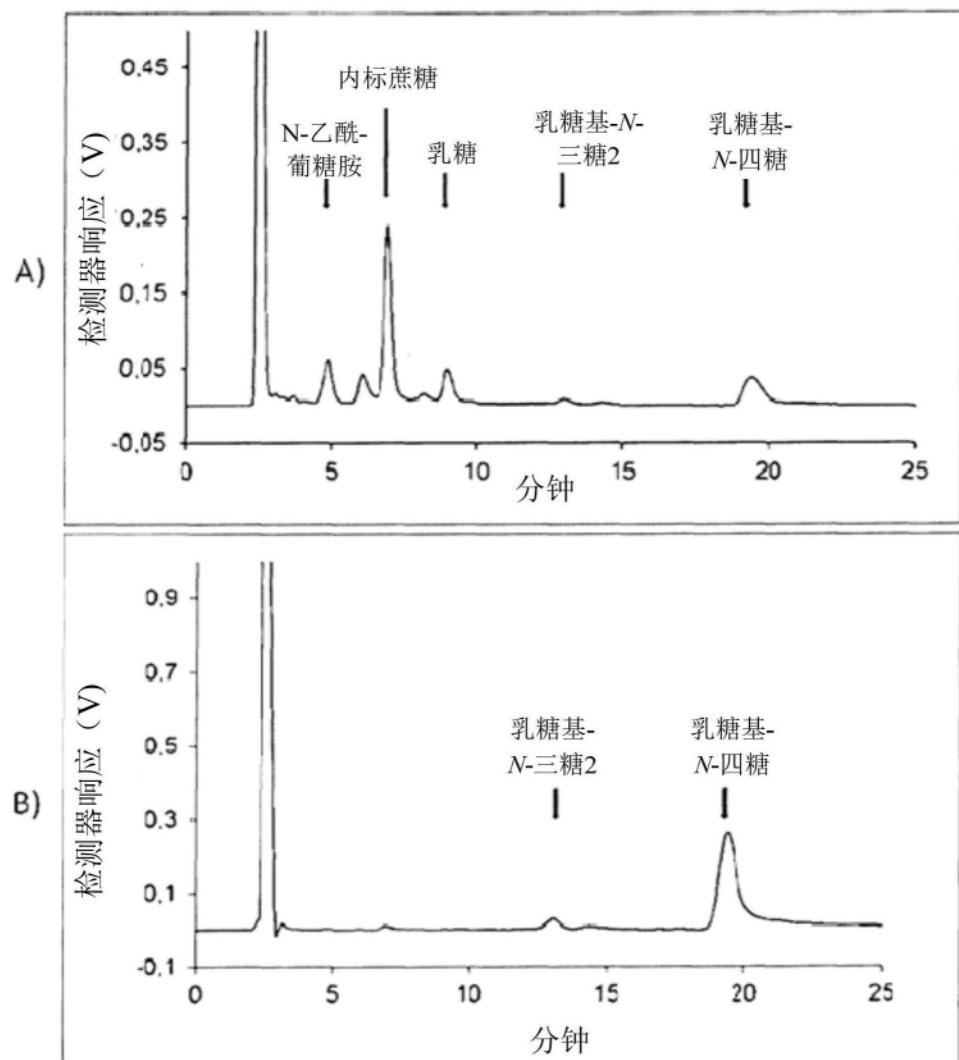


图8

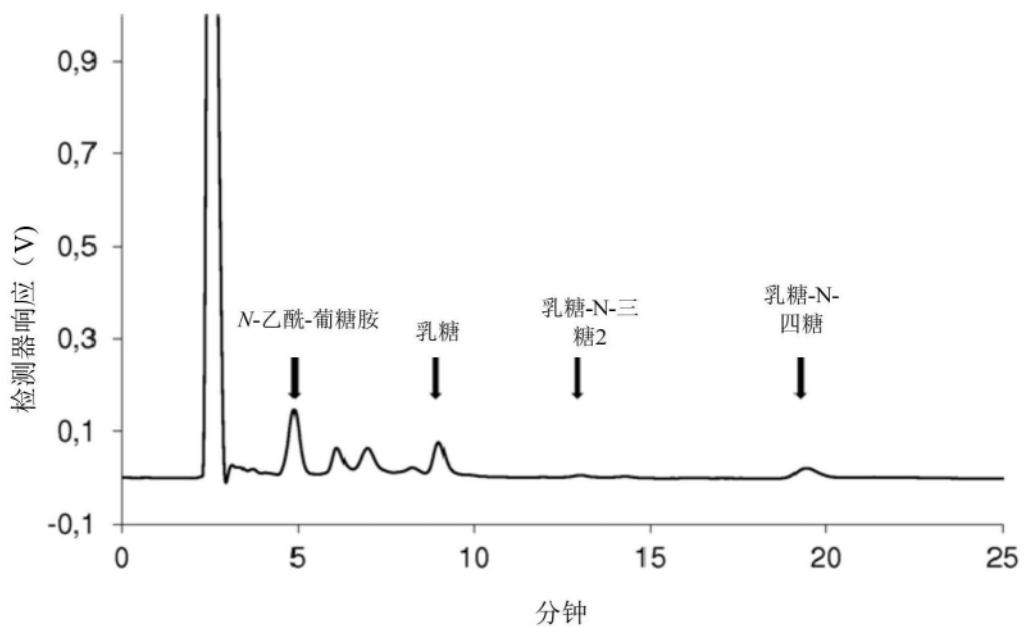


图9

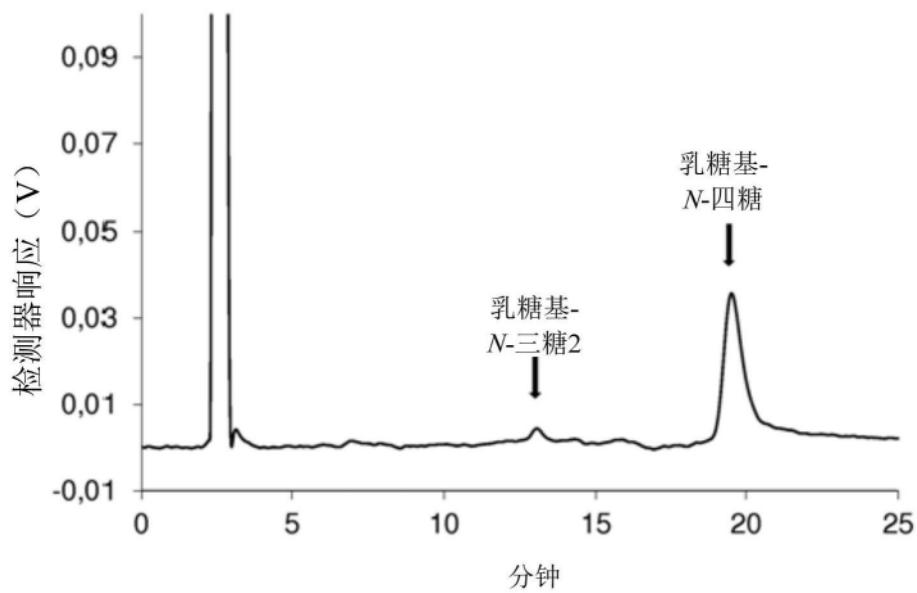


图10

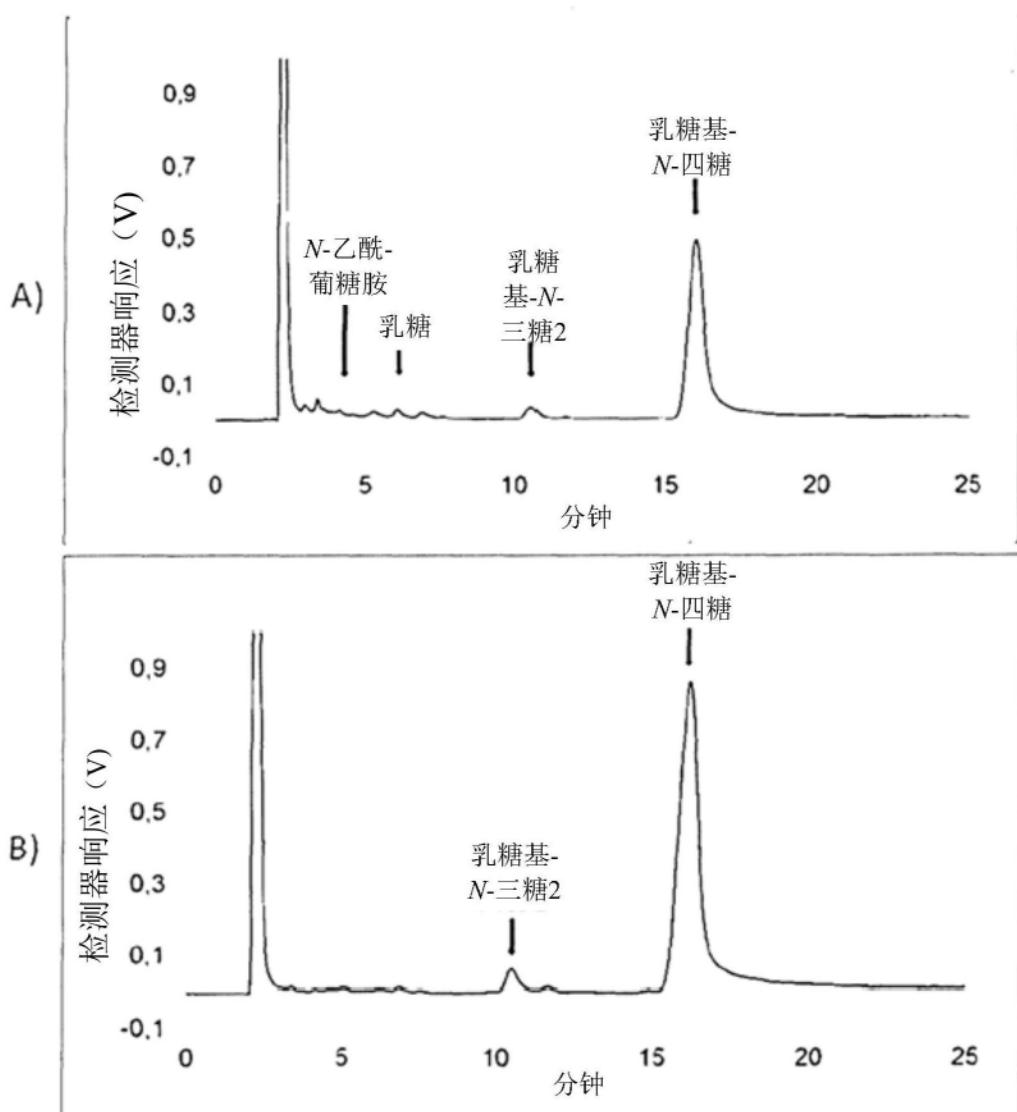


图11

