



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114555618 A

(43) 申请公布日 2022. 05. 27

(21) 申请号 202080068236.2

(22) 申请日 2020.10.01

(30) 优先权数据

PA201901154 2019.10.01 DK

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2020/059201 2020.10.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/064629 EN 2021.04.08

(71) 申请人 格礼卡姆股份公司

地址 丹麦, 霍斯霍尔姆自治市

(72) 发明人 N·汉任 P·沙萨捏 F·马蒂森

J·托格森 M·马特维尤克

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

专利代理师 顾小曼 叶占洋

(51) Int.Cl.

C07H 1/06 (2006.01)

B01D 61/14 (2006.01)

B01D 61/16 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

B01D 61/04 (2006.01)

B01J 39/05 (2006.01)

权利要求书1页 说明书29页

(54) 发明名称

发酵液中中性寡糖的分离

(57) 摘要

本发明涉及将中性人乳寡糖(HMO)从生产它们的反应环境中(优选从发酵液中)分离和分离出,包括以下步骤:i)任选地,将反应环境离心、微滤,或在压滤机或鼓式过滤器上过滤反应环境,以获得预处理的反应环境,ii)将步骤i)中预处理的反应环境的pH,或直接将反应环境的pH设置为3-6,并可选地将步骤i)中预处理的反应环境或直接将反应环境加热至35-65℃,以及iii)将在步骤ii)中获得的反应环境与截留分子量(MWCO)为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,并收集渗透液,条件是当不执行步骤i)时,所述UF膜为非聚合物膜。

1. 一种从产生中性人乳寡糖 (HMO) 的反应环境中 (优选从发酵液中) 获得或分离中性 HMO 的方法, 包括以下步骤:

i) 任选地, 将所述反应环境离心、微滤, 或在压滤机或鼓式过滤器上过滤所述反应环境, 以获得预处理的反应环境,

ii) 将步骤 i) 中所述预处理的反应环境的 pH 或直接将所述反应环境的 pH 设置为 3-6, 并可选地将步骤 i) 中所述预处理的反应环境或直接将所述反应环境加热至 35-65°C, 和

iii) 将在步骤 ii) 中获得的反应环境与截留分子量 (MWC0) 为 5-1000kDa 的超滤 (UF) 膜接触, 并收集渗透液, 条件是当不执行步骤 i) 时, 所述 UF 膜为非聚合物膜。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述 UF 膜的截留分子量为 10-1000kDa。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中步骤 ii) 包括设置步骤 i) 中所述预处理的反应环境的 pH 并加热或直接设置所述反应环境的 pH 并加热。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其中不执行步骤 i) 且其中所述非聚合物膜为陶瓷膜。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法, 其中步骤 iii) 在 45-65°C 下执行。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述 UF 膜为陶瓷膜, 且所述方法还包括将在步骤 iii) 中获得的渗透液与纳滤 (NF) 膜接触并收集截留液的步骤。

7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述 NF 膜的截留分子量 (MWC0) 为 600-3500Da, 所述 NF 膜的活性 (顶) 层由聚酰胺组成, 且其中所述膜上的 MgSO_4 截留率为约 50-90%。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法, 其中用离子交换树脂处理纳滤截留液, 所述用离子交换树脂处理由用 H^+ -型的强阳离子交换树脂处理 NF 截留液, 紧接着用游离碱型的弱阴离子交换树脂处理组成。

9. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法, 其中用活性炭处理纳滤截留液, 优选使所述纳滤截留液在 30-60°C 下在活性炭上进行色谱, 以得到活性炭洗脱液, 其中所述炭的量约为所述纳滤截留液中所含中性 HMO 的 2-10 重量%。

10. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中用活性炭处理离子交换处理的洗脱液, 优选使所述洗脱液在 30-60°C 下在活性炭上进行色谱, 以得到活性炭洗脱液, 其中所述炭的量约为所述洗脱液中所含中性 HMO 的 2-10 重量%。

11. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中用离子交换树脂处理活性炭洗脱液, 所述用离子交换树脂处理由用 H^+ -型的强阳离子交换树脂处理所述活性炭洗脱液, 紧接着用游离碱型的弱阴离子交换树脂处理组成。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的方法, 其中所述中性 HMO 为 2'-FL、3-FL、DFL、LNT、LNnT 或 LNFP-I。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述中性 HMO 为 2'-FL 或 LNnT。

14. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其中产生中性 HMO 的所述反应环境为发酵液。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其中发酵由遗传修饰的微生物优选 E.coli 进行。

16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述遗传修饰的微生物为 LacY^+ 表型或 LacZ^- 、 LacY^+ 表型的 E.coli 细胞。

发酵液中中性寡糖的分离

技术领域

[0001] 本发明涉及将中性人乳寡糖(HMO)从产生它们的反应环境中分离和分离出。

背景技术

[0002] 在过去几十年中,人们对人乳寡糖(HMO)的制备和商业化的兴趣一直在稳步增长。HMO的重要性与其独特的生物活性直接相关,因此HMO已成为营养和治疗用途的重要潜在产品。因此,人们一直在寻求低成本的工业化HMO生产方式。

[0003] 迄今为止,已经确定了140多种HMO的结构,其中可能有相当多的HMO存在于母乳中(Urashima等人,Milk oligosaccharides,Nova Biomedical Books,2011;Chen Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.72,113(2015))。HMO在还原端包含乳糖(Gal β 1-4Glc)部分,并且可以被N-乙酰氨基葡萄糖、或一个或多个N-乙酰氨基乳糖部分(Gal β 1-4GlcNAc)和/或乳-N-二糖部分(Gal β 1-3GlcNAc)延伸。乳糖和N-乙酰氨基乳糖化或乳-N-二糖化乳糖衍生物可进一步被一个或多个岩藻糖和/或唾液酸残基取代,或乳糖可被额外的半乳糖取代,以提供迄今已知的HMO。

[0004] HMO,尤其是三糖的那些HMO的直接发酵生产,最近已成为现实(Han等人,Biotechnol.Adv.30,1268(2012)和其中引用的参考文献)。这种发酵技术使用重组E.coli系统,其中源自病毒或细菌的一种或多种类型的糖基转移酶被共表达以糖基化外源添加的已被E.coli的LacY通透酶内化的乳糖。然而,使用重组糖基转移酶,尤其是一系列重组糖基转移酶来生产四个或更多单糖单元的寡糖,总是会导致副产物的形成,从而导致得到发酵液中寡糖的复杂混合物。此外,发酵液不可避免地含有多种非寡糖物质,如细胞、细胞碎片、蛋白质、蛋白质碎片、DNA、DNA片段、内毒素、焦糖化副产物、矿物质、盐或其他带电分子。

[0005] 为了将HMO从碳水化合物副产物和其他污染成分中分离出来,活性炭处理与凝胶过滤色谱相结合已被提出作为一种选择的方法(WO 01/04341、EP-A-2479263、Dumo等人,Glycoconj.J.18,465(2001),Priem等人,Glycobiology 12,235(2002)、Drouillard等人,Angew.Chem.Int.Ed.45,1778(2006)、Gebus等人,Carbohydr Res.361,83(2012)、Baumgärtner等人,ChemBioChem 15,1896(2014))。虽然凝胶过滤色谱是一种方便的实验室规模的方法,但它不能有效地用于工业化生产。

[0006] 最近,EP-A-2896628描述了一种从微生物发酵获得的发酵液中提纯2'-FL的工艺,包括以下步骤:超滤、强阳离子交换树脂色谱(H⁺-型)、中和、强阴离子交换树脂色谱(醋酸盐形式)、中和、活性炭处理、电透析、二次强阳离子交换树脂色谱(H⁺-或Na⁺-型)、二次强阴离子交换树脂色谱(Cl⁻-型)、二次活性炭处理、可选的二次电透析和无菌过滤。

[0007] WO 2017/182965和WO 2017/221208公开了一种从发酵液中提纯LNT或LNT的工艺,其包括超滤、纳滤、活性炭处理和先用强阳离子交换树脂(H⁺-型),然后再用弱阴离子交换树脂(碱型)处理。

[0008] WO 2015/188834和WO 2016/095924公开了从提纯的发酵液中结晶2'-FL,该提纯包括超滤、纳滤、活性炭处理,以及先用强阳离子交换树脂(H⁺-型),然后再用弱阴离子交换

树脂(碱型)处理。

[0009] 其他现有技术文件已经公开对低乳糖或无乳糖发酵液详尽阐述的提纯方法。根据这些程序,在中性HMO的发酵生产过程中添加的过量乳糖在发酵完成后通过 β -半乳糖苷酶的作用在原位水解,导致发酵液基本上不含残余乳糖。因此,WO 2012/112777公开了提纯2'-FL的一系列步骤,包括离心、在炭上捕获寡糖、然后在离子交换介质上进行洗脱和快速色谱。WO 2015/106943公开了2'-FL的提纯,包括超滤、强阳离子交换树脂色谱(H^+ -型)、中和、强阴离子交换树脂色谱(Cl^- -型)、中和、纳滤/渗滤、活性炭处理、电透析、可选的二次强阳离子交换树脂色谱(Na^+ -型)、二次强阴离子交换树脂色谱(Cl^- -型)、二次活性炭处理、可选的二次电透析和无菌过滤。WO 2019/063757公开了一种中性HMO的提纯工艺,其包括从发酵液中分离生物物质,并用阳离子交换材料、阴离子交换材料和阳离子交换吸附树脂进行处理。

[0010] 然而,为了提高HMO的回收率和/或简化现有技术方法,同时至少保持(优选提高)HMO的纯度,需要将中性HMO从生产它们的发酵液的非碳水化合物成分中分离出和提纯的替代程序,尤其是那些适合工业化规模的程序。

发明内容

[0011] 本发明涉及一种从产生中性人乳寡糖(HMO)的反应环境中(优选从发酵液中)获得和分离中性HMO的方法,其中所述HMO是通过培养能够从内化的碳水化合物前体产生所述HMO的遗传修饰微生物产生的,包括以下步骤:

[0012] i) 将所述反应环境的pH设置为酸性,例如从约3到约6,优选不高于约5和/或将所述反应环境加热至高于室温(或环境)的温度,优选至约30-90 $^{\circ}C$,更优选至约35-85 $^{\circ}C$,和

[0013] ii) 将在步骤i)中获得的反应环境与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,其中所述膜优选由非聚合物材料组成。

[0014] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及一种从产生中性人乳寡糖(HMO)的反应环境中(优选从发酵液中)获得和分离中性HMO的方法,其包括以下步骤:

[0015] i) 任选地,将反应环境离心、微滤,或在压滤机或鼓式过滤器上过滤反应环境,

[0016] ii) 将步骤i)中的滤液或上清液的pH或直接将反应环境的pH设置为3-6和/或将步骤i)中的滤液或上清液或直接将反应环境加热至35-65 $^{\circ}C$,和

[0017] iii) 将在步骤ii)中获得的反应环境与截留分子量(MWC0)为5-1000kDa,优选10-1000kDa的超滤(UF)膜接触,并收集渗透液,

[0018] 条件是当不执行步骤i)时,所述UF膜为非聚合物膜。

[0019] 优选地,所述方法包括以下步骤:

[0020] i) 任选地,将反应环境离心、微滤,或在压滤机或鼓形过滤器上过滤反应环境,以获得预处理的反应环境,

[0021] ii) 将步骤i)中的预处理反应环境(通常是步骤i)中的滤液或上清液)的pH或直接将反应环境的pH设置为3-6,并可选地将步骤i)中的预处理反应环境或直接将反应环境加热至35-65 $^{\circ}C$,和

[0022] iii) 将在步骤ii)中获得的反应环境与截留分子量(MWC0)为5-1000kDa,优选10-1000kDa的超滤(UF)膜接触,并收集渗透液,

[0023] 条件是当不执行步骤i)时,所述UF膜为非聚合物膜。

[0024] 更优选地,上述步骤ii)包括pH设置和加热,尤其是首先进行pH设置,然后加热获得的pH设置的反应环境或预处理反应环境。

[0025] 在一个实施方式中,上述方法还包括纳滤步骤。

[0026] 在其他实施方式中,上述方法还包括使用一种或多种离子交换树脂的处理。

[0027] 在其他实施方式中,上述方法还包括用活性炭处理或在活性炭上的色谱。

[0028] 在其他实施方式中,上述方法还包括使用疏水性固定相的色谱,该疏水性固定相是与二乙烯基苯(PS-DVB)交联并在芳环上用溴官能化的聚苯乙烯。

[0029] 所述方法的一个实施方式涉及从产生中性HMO的反应环境中获得和分离中性HMO,其包括以下步骤:

[0030] i) 将所述反应环境的pH设置为酸性,例如从约3到约6,优选不高于约5和/或将所述反应环境加热至高于室温(或环境)的温度,优选约30-90℃,更优选约35-85℃,

[0031] ii) 将步骤i)中获得的反应环境与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,其中所述膜优选由非聚合物材料组成,和

[0032] iii) 将步骤ii)中获得的渗透液与纳滤膜接触。

[0033] 所述方法的一个实施方式涉及从产生中性HMO的反应环境中获得和分离中性HMO,其包括以下步骤:

[0034] i) 将所述反应环境的pH设置为酸性,例如从约3到约6,优选不高于约5和/或将所述反应环境加热至高于室温(或环境)的温度,优选至约30-90℃,更优选至约35-85℃,

[0035] ii) 将在步骤i)中获得的反应环境与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,其中所述膜优选由非聚合物材料组成,

[0036] iii) 将在步骤ii)中获得的渗透液与纳滤(NF)膜接触,和

[0037] iv) 使用离子交换树脂(优选强阳离子交换树脂和弱碱离子交换树脂)处理步骤iii)中获得的截留液,以使截留液脱矿。

[0038] 所述方法的一个实施方式涉及从产生中性HMO的反应环境中获得和分离中性HMO,其包括以下步骤:

[0039] i) 将所述反应环境的pH设置为酸性,例如从约3到约6,优选不高于约5和/或将所述反应环境加热至高于室温(或环境)的温度,优选至约30-90℃,更优选至约35-85℃,

[0040] ii) 将在步骤i)中获得的反应环境与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,其中所述膜优选由非聚合物材料组成,

[0041] iii) 将在步骤ii)中获得的渗透液与纳滤(NF)膜接触,

[0042] iv) 使用离子交换树脂(优选强阳离子交换树脂和弱碱离子交换树脂)处理步骤iii)中获得的截留液,以使截留液脱矿。

[0043] v) 将在步骤iv)中获得的溶液与活性炭(AC)接触,或使用疏水性固定相进行色谱,所述固定相是与二乙烯基苯(PS-DVB)交联并在芳环上用溴官能化的聚苯乙烯,或以任何顺序两者同时进行。

[0044] 优选地,所述中性HMO为2'-FL、3-FL、DFL、LNT、LNnT或LNFP-I。

[0045] 优选地,所述产生中性HMO的反应环境为发酵液。除了作为经适当设计的遗传修饰微生物(优选E.coli)生产的主要化合物的中性HMO外,所述发酵液通常还含有碳水化合物

副产物或污染物,例如来自作为前体的乳糖(优选外源添加的乳糖)的目的HMO生物合成途径中的碳水化合物中间体,和/或由于生物合成途径中的糖基化不足、缺陷或受损而产生的那些,和/或由于在培养条件下或发酵后操作下的重排或降解而产生的那些,和/或在发酵过程中过量添加的作为未消耗排出物的乳糖。此外,发酵液可含有细胞、蛋白质、蛋白质碎片、DNA、焦糖化副产物、矿物质、盐、有机酸、内毒素和/或其他带电分子。

[0046] 优选地,当所述发酵液在UF之前未经离心、微滤或在压滤机或鼓式过滤器上过滤时,所述UF膜由非聚合物材料组成(例如所述UF膜是陶瓷膜)。

[0047] 本发明的某些实施方式包括一个或多个进一步的可选步骤。优选地,所述进一步的可选步骤不是电透析。

[0048] 在一个实施方式中,优选地,当UF渗透液中乳糖含量低或基本上缺乏乳糖时,根据步骤iii)所述的NF步骤包括使用纳滤膜,该纳滤膜具有确保截留目的中性人乳寡糖的MWC0,也就是说,其MWC0约为中性人乳寡糖分子量的25-50%,通常约为150-500Da。在这方面,中性人乳寡糖积累在NF截留液(NFR)中,而诸如单价离子的盐或单糖则积累在渗透液中。

[0049] 在其他实施方式中,优选当UF渗透液含有大量乳糖时,根据步骤iii)所述的NF步骤包括使用MWC0约为600-3500Da的纳滤膜,确保截留中性HMO,并允许单价和二价盐以及至少一部分乳糖通过膜,其中NF膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,并且其中NF膜上的MgSO₄截留率约为50-90%。

[0050] 在其他实施方式中,当目的中性HMO为LNT、LNnT或LNFP-I时,为了将其与污染的寡糖分离,优选利用使用疏水性固定相的色谱,该固定相是根据步骤v)的与二乙烯基苯(PS-DVB)交联并在芳环上用溴官能化的聚苯乙烯。

[0051] 在另一方面,本发明涉及从发酵工艺或酶法中的水性介质中溶解的无机盐和有机盐、酸和碱中分离中性HMO,包括将水性介质按步骤i)、ii)、iii)、iv)和可选步骤v)处理的步骤。

具体实施方式

[0052] 1. 术语和定义

[0053] 术语“中性人乳寡糖”指人母乳中发现的非唾液酸化(因此为中性)复合碳水化合物(Urashima等人,Milk oligosaccharides,Nova Biomedical Books,2011;Chen Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.72,113(2015)),其包含还原末端为乳糖单元的核心结构,该核心结构a)被一个或两个 α -L-吡喃岩藻糖基部分取代,b)被半乳糖基残基取代,或c)通过其3'-OH基团被N-乙酰氨基葡萄糖、乳糖-N-二糖(Gal β 1-3GlcNAc)或N-乙酰氨基乳糖(Gal β 1-4GlcNAc)部分延伸。含N-乙酰氨基乳糖的衍生物可进一步被N-乙酰氨基乳糖和/或乳-N-二糖(乳-N-二糖始终是非还原性末端)取代。含N-乙酰氨基乳糖和乳-N-二糖的衍生物可选地被一个或多个 α -L-岩藻吡喃基部分取代。中性三糖HMO的实例包括2'-O-岩藻糖基乳糖(2'-FL,Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc)、3-O-岩藻糖基乳糖(3-FL,Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc)或乳-N-三糖II(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc);中性四糖HMO的实例包括2',3-二-O-岩藻糖基乳糖(DFL,Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc)、乳-N-四糖(LNT,Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)或乳-N-新四糖(LNnT,Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc);中性五糖HMO的实例包括乳-N-岩藻

五糖 I (LNFP I, Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)、乳-N-岩藻五糖 II (LNFP II, Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)、乳-N-岩藻五糖 III (LNFP III, Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)、乳-N-岩藻五糖 V (LNFP V, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc)、乳-N-岩藻五糖 VI (LNFP VI, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc); 中性六糖 HMO 的实例包括乳-N-二岩藻六糖 I (LNDFH I, Fuc α 1-2Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)、乳-N-二岩藻六糖 II (LNDFH II, Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc)、乳-N-二岩藻六糖 III (LNDFH III, Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) Glc)、乳-N-六糖 (LNH, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6) Gal β 1-4Glc)、对-乳-N-六糖 (pLNH, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)、乳-N-新六糖 (LNnH, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6) Gal β 1-4Glc) 或对-乳-N-新六糖 (pLNnH, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)。

[0054] 术语“遗传修饰的细胞”或“遗传修饰的微生物”优选地指已被遗传操纵以在其 DNA 序列包括至少一个改变的微生物的细胞,例如细菌或真菌细胞,例如 E. coli 细胞。术语“至少一个遗传改变”指可导致野生型细胞原始特征变化的遗传改变,例如,由于引入的编码野生型细胞中不存在的酶的表达的新遗传物质,改造后的细胞能够进行额外的化学转化,或者由于(单个)基因/(多个)基因的去除(敲除),不能进行转化如降解。可通过本领域技术人员熟知的基因工程技术以常规方式生产遗传修饰的细胞。

[0055] 术语“能够从内化的碳水化合物前体产生中性 HMO 的遗传修饰的微生物”优选指微生物(例如细菌或真菌(例如酵母),优选细菌,更优选 E. coli)的细胞,其经遗传操纵(参见上文)以包含一个或多个内源性或重组基因(其编码一个或多个糖基转移酶,这些酶能够将活性糖核苷酸的糖基残基转移到内化的受体分子,并且是合成所述中性 HMO 所必需的)、一种用于产生适合通过所述糖基转移酶转移到碳水化合物前体(受体)的相应活性糖核苷酸供体的生物合成途径、以及一种碳水化合物前体(受体)从培养基内化到细胞中并在其中糖基化产生目的中性 HMO 的机制。糖基转移酶选自 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,6-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,3-半乳糖基转移酶、 β -1,4-半乳糖基转移酶、 α -1,2-岩藻糖基转移酶、 α -1,3-岩藻糖基转移酶和 α -1,4-岩藻糖基转移酶。相应的活性糖核苷酸为 UDP-Gal、UDP-GlcNAc 和 GDP-Fuc。

[0056] 在发酵的上下文中,术语“生物量”指源自发酵细胞的悬浮、沉淀或不溶性物质,如完整细胞、破碎细胞、细胞碎片、蛋白质、蛋白质碎片、多糖。在酶反应的上下文中,术语“生物量”指源自所用酶的(主要是变性和/或沉淀的)蛋白质或蛋白质碎片。生物量可通过例如离心、微滤、超滤或压滤机或鼓式过滤器上的过滤等方式从上清液或反应混合物中分离。

[0057] 术语“Brix”指白利糖度,即水溶液中的糖含量(100克溶液中的糖含量)。在这方面,本申请中含有 N-乙酰氨基葡萄糖的中性寡糖溶液的 Brix 指溶液的总碳水化合物含量,包括含有 N-乙酰氨基葡萄糖的中性寡糖及它的伴随碳水化合物。Brix 由校准的折射计测量。

[0058] 盐的截留率(百分比)计算为 $(1 - \kappa_p / \kappa_r) \cdot 100$, 其中 κ_p 是渗透液中盐的电导率, κ_r 是截留液中盐的电导率。截留液浓度实际上等于与盐有关的料液浓度。下面的工作示例中公开了测量盐的截留率的程序。

[0059] 碳水化合物的截留率(百分比)计算为 $(1 - C_p / C_r) \cdot 100$, 其中 C_p 是渗透液中碳水化

合物的浓度, C_r 是截留液中碳水化合物的浓度。截留液浓度实际上等于与碳水化合物有关的料液浓度。下面的工作示例中公开了一种测量碳水化合物截留率的示例性程序。

[0060] 关于两种碳水化合物的分离系数计算为 $(C_{p1}/C_{r1}) / (C_{p2}/C_{r2})$, 其中 C_{p1} 和 C_{p2} 分别是渗透液中第一和第二种碳水化合物的浓度, C_{r1} 和 C_{r2} 分别是截留液中第一和第二种碳水化合物的浓度。

[0061] “纯水通量”是指在规定条件下 (约23-25℃、10bar和300l/h恒定错流条件下), 每单位时间、每单位面积通过膜的纯化水 (如蒸馏水、RO水) 的体积。

[0062] “脱矿”优选是指从液体中去除矿物质或矿物盐的工艺。在本发明的上下文中, 脱矿优选地指离子交换处理的步骤, 尤其是随后应用阳离子和阴离子交换树脂, 使得来自二次离子交换剂的洗脱液不含或含极少量矿物质或矿物质盐。此外, 脱矿可能发生在纳滤步骤中, 尤其是与渗滤相结合时。

[0063] “微滤”优选指通过具有约0.1至10μm孔径的膜过滤发酵液或酶促反应混合物的预处理分离工艺。就近似分子量而言, 这些膜可以分离截留液中分子量通常超过500000g/mol的大分子。

[0064] 在本发明的整个说明书中使用的与数值有关的术语“约”或“大约”意味着所述数值可能偏离指示值的高达10%。

[0065] 2. 从产生中性HMO的反应环境中获得或分离中性HMO的方法

[0066] 本发明涉及一种从水性介质中获得或分离中性HMO的方法, 所述水性介质为产生所述中性HMO的发酵液或酶促反应混合物。反应环境是一种复杂的基质, 其中中性HMO伴随有或被几种物质 (如副产物和残余的合成所述中性HMO所需的材料) 污染。因此, 在几个连续步骤的帮助下, 通过将中性HMO从副产物和残余材料中分离从反应环境中获得或分离出中性HMO, 从而获得或分离出比其在反应环境中更纯的中性HMO。因此, 本发明提供一种提纯方法, 通过该方法, 与现有技术相比, 可以以更有益的方式获得或分离出目的中性HMO。下面就相应的方法步骤公开这些益处。

[0067] 使用生物技术方法, 无论以何种方式 (发酵或体外酶促) 产生中性HMO, 反应环境都包含生物质。因此, 本发明的方法强制地包括从反应环境中分离生物质的步骤, 以提供包含目的中性HMO的水溶液。将生物质从反应环境中分离包括超滤 (UF, 详见下文) 和可选地超滤前的预过滤 (即离心、微滤、或压滤机或鼓式过滤器上的过滤)。UF后通常会进行纳滤步骤 (NF, 详见下文)。此外, 本发明的方法可选地但优选地包括使用离子交换树脂进行处理, 最好使用阳离子和阴离子交换树脂。此外, 本发明方法可选地包括用于脱色的活性炭处理和/或中性固相上的色谱步骤, 优选反相色谱, 以去除残余疏水污染物。在UF和NF之后, 可以按任何顺序执行任何可选步骤。此外, 本发明的方法可选地包括至少一个或多个NF步骤, 尤其是用于对中性HMO的水溶液进行浓缩和/或脱盐/脱矿。或者, 如果不需要脱矿 (例如, 由于料液含盐量低), 可选的附加NF可由蒸发代替。

[0068] UF、NF、“离子交换树脂处理”、“活性炭处理”和“中性固相色谱”的步骤将在下面相应的子章节中详细讨论。

[0069] 因此, 所述方法按任意顺序包括以下分离/提纯步骤:

[0070] a) 超滤 (UF),

[0071] b) 纳滤 (NF), 和

- [0072] c) 用离子交换树脂处理,和/或在中性固相上色谱。
- [0073] 优选地,所述方法不包括电透析。
- [0074] 有利地,在步骤b)之前执行步骤a)。更有利的是,在步骤b)和c)任一步骤之前进行步骤a)。优选地,按照以下顺序执行所述方法:步骤b)在步骤a)之后,且步骤c)在步骤b)之后。
- [0075] 在一个实施方式中,所述方法包括:
- [0076] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0077] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0078] -用离子交换树脂处理NFR并收集树脂洗脱液(RE),和
- [0079] -RE的色谱。
- [0080] 在另一个实施方式中,所述方法包括:
- [0081] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0082] -将UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0083] -NFR的色谱并收集色谱洗脱液(CE),和
- [0084] -用离子交换树脂处理CE。
- [0085] 本发明的方法可包括UF、NF、色谱或离子交换树脂处理后的活性炭处理。
- [0086] 在一个实施方式中,所述方法包括:
- [0087] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0088] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0089] -NFR的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),和
- [0090] -用离子交换树脂处理CCE。
- [0091] 优选地,所述方法包括:
- [0092] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0093] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0094] -NFR的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),和
- [0095] -用 H^+ -型强阳离子交换树脂和游离碱型弱阴离子交换树脂处理CCE。
- [0096] 更优选地,所述方法包括:
- [0097] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0098] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0099] -NFR的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),和
- [0100] -用 H^+ 型强阳离子交换树脂和游离碱型弱阴离子交换树脂处理CCE;
- [0101] 且所述方法不包括电透析。
- [0102] 在另一个实施方式中,所述方法包括:
- [0103] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0104] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0105] -用离子交换树脂处理NFR并收集树脂洗脱液(RE),和
- [0106] -RE的活性炭处理。
- [0107] 优选地,所述方法包括:
- [0108] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),

- [0109] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0110] -用H⁺-型强阳离子交换树脂和游离碱型弱阴离子交换树脂处理NFR,并收集树脂洗脱液(RE),和
- [0111] -RE的活性炭处理。
- [0112] 更优选地,所述方法包括:
- [0113] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0114] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0115] -用H⁺-型强阳离子交换树脂和游离碱型弱阴离子交换树脂处理NFR,并收集树脂洗脱液(RE),和
- [0116] -RE的活性炭处理;
- [0117] 且所述方法不包括电透析。
- [0118] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:
- [0119] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0120] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0121] -NFR的色谱并收集色谱洗脱液(CE),和
- [0122] -CE的活性炭处理。
- [0123] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:
- [0124] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0125] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0126] -NFR的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),和
- [0127] -CCE的色谱。
- [0128] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:
- [0129] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0130] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0131] -NFR的色谱并收集色谱洗脱液(CE),
- [0132] -CE的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),和
- [0133] -用离子交换树脂处理CCE。
- [0134] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:
- [0135] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0136] -UFP的纳滤(NF)和收集纳滤截留液(NFR),
- [0137] -NFR的色谱和收集色谱洗脱液(CE),
- [0138] -用离子交换树脂处理CE并收集树脂洗脱液(RE),和
- [0139] -RE的活性炭处理。
- [0140] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:
- [0141] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),
- [0142] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),
- [0143] -用离子交换树脂处理NFR并收集树脂洗脱液(RE),
- [0144] -RE的色谱并收集色谱洗脱液(CE),和
- [0145] -CE的活性炭处理。

[0146] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:

[0147] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),

[0148] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),

[0149] -用离子交换树脂处理NFR并收集树脂洗脱液(RE),

[0150] -RE的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),和

[0151] -CCE的色谱。

[0152] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:

[0153] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),

[0154] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),

[0155] -NFR的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),

[0156] -用离子交换树脂处理CCE并收集树脂洗脱液(RE),和

[0157] -RE的色谱。

[0158] 而在另一个实施方式中,所述方法包括:

[0159] -反应环境或离心反应环境的超滤(UF)并收集超滤渗透液(UFP),

[0160] -UFP的纳滤(NF)并收集纳滤截留液(NFR),

[0161] -NFR的活性炭处理并收集炭洗脱液(CCE),

[0162] -CCE的色谱并收集色谱洗脱液(CE),和

[0163] -用离子交换树脂处理CE。

[0164] 本发明的方法提供一种高度富集目的中性HMO的溶液,从该溶液中可以高收率地获得HMO,并且优选地具有令人满意的纯度,例如满足食品应用的严格监管要求。

[0165] 2.1.中性HMO的生产

[0166] 2.1.1通过遗传修饰的微生物生产中性HMO

[0167] 通过培养遗传修饰的细胞生产中性HMO优选执行如下。

[0168] 外源添加的受体被遗传修饰的细胞从培养基中内化,在包含一个或多个酶促糖基化步骤的反应中转化为目的中性HMO。在一个实施方式中,内化可通过被动转运机制发生,在此期间外源受体被动扩散穿过细胞的质膜。这种流动是由细胞外和细胞内空间中与待内化受体分子有关的浓度差来引导的,受体应该从高浓度的地方进入低浓度区域趋于平衡。在另一个实施方式中,外源性受体可借助主动运输机制内化到细胞内,在此期间,外源性受体在转运蛋白或细胞通透酶的影响下扩散穿过细胞的质膜。乳糖通透酶(LacY)对单糖或双糖,例如半乳糖、N-乙酰-氨基葡萄糖、半乳糖基化单糖(例如乳糖)和N-乙酰-氨基葡萄糖化单糖具有特异性。所有这些碳水化合物衍生物都可以被表达LacY通透酶的细胞(这种细胞在本文中也称为LacY⁺表型细胞)经主动运输方式轻易吸收,并在被糖基化之前在细胞中积累(参见例如WO 01/04341、Fort等人,J.Chem.Soc..Comm.2558(2005)、Drouillard等人,Angew.Chem.Int.Ed.45,1778(2006)、WO 2012/112777、WO2015/036138)。优选地,表达编码乳糖通透酶的lacY基因的细胞缺乏能够将内化的受体和/或目的中性HMO的生物合成途径中相应中间体降解的酶。优选地,所述细胞由于内源性lacZ基因的失活或缺失(这种细胞在本文中也称为lacZ⁻表型细胞)或至少具有活性降低的 β 1,4-半乳糖苷酶而缺乏 β 1,4-半乳糖苷酶活性,参见,例如根据WO2012/112777的具有低半乳糖苷酶活性的E.coli。

[0169] 在一个优选实施方式中,外源添加的受体是乳糖,其内化通过由细胞的乳糖通透

酶(更优选LacY)介导的主动运输机制发生。在其他实施方式中,外源受体为葡萄糖,例如在WO 2015/150328中所公开的。

[0170] 依靠通过已知技术引入细胞中的相应的异源基因或核酸序列(例如通过将它/它们整合到细胞染色体或使用表达载体)表达的一个或多个糖基转移酶对内化到细胞中的受体进行糖基化。制备目的中性HMO所需的糖基转移酶选自 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,6-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,3-半乳糖基转移酶、 β -1,4-半乳糖基转移酶、 α -1,2-岩藻糖基转移酶、 α -1,3-岩藻糖基转移酶和 α -1,4-岩藻糖基转移酶。遗传修饰的细胞通常包括生物合成途径,以产生适合由相应的糖基转移酶转移的一个或多个单糖核苷酸供体。大多数微生物能够通过它们天然的中心碳代谢产生UDP-Gal或UDP-GlcNAc。至于GDP-Fuc,遗传修饰的细胞可以通过两种方式产生。GDP-Fuc可由细胞在参与GDP-Fuc从头生物合成途径的酶(ManB、ManC、Gmd和WcaG)的作用下,以逐步反应顺序从如甘油、果糖或葡萄糖等简单碳源开始生成。或者,遗传修饰的细胞可以利用回收的岩藻糖,岩藻糖被激酶磷酸化,然后通过焦磷酸化酶转化为GDP-Fuc(参见,例如WO 2010/070104)。

[0171] 中性HMO可由根据如Dumon等人,Glycoconj.J.18,465(2001)、Priem等人,Glycobiology 12,235(2002)、Dumon等人,Biotechnol.Prog.20,412(2004)、Drouillard等人,Angew.Chem.Int.Ed.45,1778(2006)、Gebus等人,Carbohydr.Res.361,83(2012)、Baumgärtner等人,ChemBioChem 15,1896(2014)和Enzyme Microb.Technol.75-76,37(2015)、WO 01/04341、WO 2010/070104、WO 2010/142305、WO 2012/112777、WO 2014/153253、WO 2015/032412、WO 2015/036138、WO 2015/150328、WO 2015/197082、WO 2016/008602、WO 2016/040531、WO 2017/042382、WO 2017/101958、WO 2017/188684、US 2017/0152538、WO 2018/077892、WO 2018/194411或WO 2019/008133的遗传修饰的微生物产生。

[0172] 在优选实施方式中,遗传修饰的微生物为E.coli。

[0173] 因此,在优选实施方式中,生产工艺包括以下步骤:

[0174] a) 提供LacY⁺表型或LacZ⁻、LacY⁺表型的遗传修饰的E.coli细胞,其中所述细胞包含:

[0175] -一个或多个编码糖基转移酶的重组基因,该糖基转移酶选自合成中性HMO所必需的 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,6-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,3-半乳糖基转移酶、 β -1,4-半乳糖基转移酶、 α -1,2-岩藻糖基转移酶、 α -1,3-岩藻糖基转移酶和 α -1,4-岩藻糖基转移酶,和

[0176] -一个或多个编码用于如上所列的相应糖基转移酶的UDP-GlcNAc、UDP-Gal或GDP-Fuc的生物合成途径的基因,和

[0177] b) 在外源乳糖和合适碳源存在下培养LacY⁺表型或LacZ⁻、LacY⁺表型的遗传修饰的E.coli细胞,由此产生包含中性HMO的发酵液。

[0178] 这样生产的发酵液在生产细胞和培养基中都包含中性HMO。为了获取细胞内的中性HMO并由此提高产物的滴度,上述方法可进一步包括例如通过加热破坏或透化细胞的可选步骤c)。

[0179] 包含中性HMO的发酵液可伴随有其他碳水化合物。通常,另一种碳水化合物是在制造中性HMO的发酵过程中用作受体且剩下未转化的乳糖。此外,另一种伴随的碳水化合物可以是所需的中性HMO的生物合成途径中的中间碳水化合物,例如,在产生LNT或LNT的情况

下的乳-N-三糖 II。尽管在将其进行下文所述的分离/提纯步骤(例如,如WO 2012/112777或WO 2015/036138中所公开)之前,它们在发酵液中的含量可以大幅降低,但无需这样做。在一个实施方式中,所声称方法适于将伴随有碳水化合物的中性HMO与非碳水化合物污染物分离,而碳水化合物的相对比例在所声称方法的过程中没有实质性变化。因此,所声称方法的目的,在一个方面,是从发酵液或酶促反应环境中的水性介质中的非碳水化合物污染物中分离伴随有碳水化合物的中性HMO而不是从任何其他污染物(包括伴随的碳水化合物)中提纯中性HMO。中性人乳寡糖旨在用于营养目的,因此,在最终营养成分中除了主要的中性HMO之外,还存在的伴随的碳水化合物不是有害的,甚至可能是有利的。然而,所述方法的另一个实施方式适于通过将中性HMO与碳水化合物和非碳水化合物污染物分离来提纯中性HMO,从而以基本上纯的形式提供中性HMO。

[0180] 因此,在一个实施方式中,其中中性人乳寡糖为LNT并通过发酵产生,伴随的碳水化合物主要为乳糖(作为发酵中使用且剩下未反应的受体)、乳-N-三糖 II (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,作为LNT生物合成途径中的中间碳水化合物)和p-LNH II (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,作为与LNT具有类似生物学特性的过度糖基化LNT)。在另一个实施方式中,其中中性人乳寡糖是LNnT并通过发酵产生,伴随的碳水化合物主要是乳糖(作为发酵中使用且剩下未反应的受体),乳-N-三糖 II (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,作为LNnT生物合成途径中的中间碳水化合物)和p-LNnH (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,作为与LNnT具有类似生物学特性的过糖基化LNnT)。在另一个实施方式中,其中中性人乳寡糖为乳-N-三糖 II (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)并通过发酵产生,伴随的碳水化合物主要为乳糖(作为发酵中使用且剩下未反应的受体)。在其他实施方式中,其中中性HMO为2'-FL (Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc)并通过发酵产生,伴随的碳水化合物主要为乳糖(作为发酵中使用且剩下未反应的受体)和DFL (Fuc α 1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc)(作为具有与2'-FL类似的生物学特性的过岩藻糖基化的2'-FL)。在另一个实施方式中,其中中性人乳寡糖为LNFP I (岩藻糖基化LNT, Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)并通过发酵产生,伴随的碳水化合物主要为乳糖(作为发酵中使用且剩下未反应的受体)、乳-N-三糖 II (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,作为LNFP-I生物合成途径中的中间碳水化合物)、LNT(作为LNFP-I生物合成途径中的中间碳水化合物)、p-LNH II (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,作为与LNT具有类似生物学特性的过糖基化LNT)和2'-FL。所有上述伴随的碳水化合物也被认为是中性HMO。

[0181] 此外,发酵液中还可能含有非HMO碳水化合物污染物。它们通常是乳果糖及其糖基化衍生物。当将乳糖添加到发酵液之前的加热灭菌时和/或在发酵期间,乳果糖可由乳糖通过重排形成。由于乳果糖也被细胞内化,类似于乳糖,它可以在同时发生的生物转化反应中被糖基化。然而,乳果糖及其糖基化衍生物的量不超过生物质分离后发酵液总干固体物质的十分之二重量%。

[0182] 根据本发明,发酵液进一步经过中性HMO与其他非碳水化合物的化合物以及可选地与下文所述发酵液的碳水化合物分离/提纯的程序。

[0183] 2.1.2通过离体酶促反应生产中性HMO

[0184] 中性HMO可通过在生物体之外发生的反应或反应次序中向乳糖添加或连续添加单糖以酶促方式产生。通常,合适的酶可以是添加到含有起始受体(通常为乳糖)和相应供体

的反应混合物(其中pH值被适当地设置)中的相应糖基转移酶或(反式)糖苷酶。如果中性HMO是四糖或更大的,则第一个酶促步骤中的三糖产物用作后续酶促步骤的受体,以制备四糖,依此类推。在多酶促合成的情况下,单个步骤可以在分离的容器中连续进行;在某些情况下,酶促级联反应可以在一个烧瓶中进行。

[0185] 在糖基转移酶介导的酶促合成中,从乳糖中制备目的中性HMO所需的糖基转移酶选自 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,6-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,3-半乳糖基转移酶、 β -1,4-半乳糖基转移酶、 α -1,2-岩藻糖基转移酶、 α -1,3-岩藻糖基转移酶和 α -1,4-岩藻糖基转移酶,且对应于所使用的糖基转移酶,供体选自UDP-GlcNAc、UDP-Gal和GDP-Fuc。例如,WO 98/44145、Albermann等人,Carbohydr. Res. 334, 97 (2001) 或Scheppokat等人,Tetrahedron:Asymmetry 14, 2381 (2003) 中披露的此类中性HMO的酶促方法。

[0186] 在(转)糖苷酶介导的中性HMO酶促合成中,合适的酶选自 α 1,2-(转)岩藻糖苷酶、 α 1,3-(转)岩藻糖苷酶、 α 1,4-(转)岩藻糖苷酶、 β 1,3-(转)乳-N-二糖苷酶、 β 1,6-(转)乳-N-二糖苷酶、 β 1,3-(转)N-乙酰氨基乳糖苷酶、 β 1,6-(转)N-乙酰氨基乳糖苷酶、 β 1,3-(转)半乳糖苷酶、 β 1,4-(转)半乳糖苷酶、 β 1,3-(转)N-乙酰氨基葡萄糖苷酶和 β 1,6-(转)N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。转糖苷酶不同于糖苷酶,它们的水解活性降低和/或它们具有更高的供体向受体的转移活性。可以(例如,通过改变氨基酸序列)产生定向转糖苷酶突变体,其中水解酶活性被消去,有利于转糖苷酶的作用。关于合适的供体,它们可以是具有糖部分的二糖或寡糖,该糖部分由非还原末端的(转)糖苷酶转移(例如,对于 α 1,2-(转)岩藻糖苷酶为2'-FL;对于 β 1,4-(转)半乳糖苷酶为乳糖;对于 β 1,3-(转)N-乙酰氨基乳糖苷酶为LNnT,等)或该糖部分由叠氮化物、氟代、对硝基苯等异头物位置上的好的离去基团激活。在例如WO 2012/156897、WO 2012/156898、WO 2016/063261、WO 2016/063262、WO 2016/157108、WO 2016/199069或WO 2016/199071中广泛指导的产生中性HMO的此类酶促反应,其通过引用并入本文。

[0187] 根据本发明,酶促反应混合物进一步经受从其他非碳水化合物和可选地从下文所述的碳水化合物分离/提纯中性HMO的程序。

[0188] 2.2从产生中性HMO的反应环境中获得中性HMO

[0189] 2.2.1.超滤前反应环境的可选预处理

[0190] 发酵液通常除含有产生的中性HMO外,还含有所用微生物细胞的生物质,以及蛋白质、蛋白质碎片、DNA、DNA片段、内毒素、生物胺、无机盐、未反应的碳水化合物受体(如乳糖、类糖副产物、单糖、有色体等)。可选地,为了使发酵液或酶促反应混合物的大分子更容易过滤,将反应环境的pH调整至约2.5-7.5,和/或在30-75°C之间进行热处理和/或通过絮凝/凝结进行澄清。还可选地,将反应环境(无论是否按上述方式处理)离心、微滤或在压滤机或鼓式过滤器上过滤,从而去除至少一部分生物质或沉淀/絮凝/变性的酶。

[0191] 因此,本发明上下文中使用的术语“预处理反应环境”包括上述步骤中的至少一个。

[0192] 2.2.2.反应环境或预处理反应环境的超滤(UF)

[0193] 所声称方法的UF步骤包括:

[0194] a) 将所述反应环境的pH设置为酸性,例如从约3到约6,优选不高于约5和/或将所述反应环境加热至高于室温(或环境)的温度,优选至约30-90°C,更优选至约35-85°C,和

[0195] b) 将在步骤i)中获得的反应环境与截留分子量(MWCO)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,其中所述膜优选由非聚合物材料组成。

[0196] 超滤步骤是将生物物质(或预处理反应环境的生物物质的剩余部分)优选地以及高分子量悬浮固体从发酵液的可溶性组分中分离,其中可溶性组分在渗透液中通过超滤膜。所述UF渗透液(UFP)是含有产生的中性HMO的水溶液。

[0197] 在优选实施方式中,如果反应环境在压滤机或鼓式过滤器上离心、微滤或过滤,则所述UF膜由非聚合物材料(更优选陶瓷材料)组成。

[0198] 在一个实施方式中,将反应环境或预处理(例如离心)反应环境的pH设置为酸性,例如从约3到约6,优选设置为不高于约5的值,优选为不高于约4的值,更优选设置为约3-4的值。如上所述设置pH尤其有利,因为由于更有效的变性和沉淀,它导致溶解的生物分子(例如可溶性蛋白质和DNA)的数量大幅度减少。较低溶解的生物分子的数量允许在后续步骤中使用更高MWCO的UF膜,从而提供更好的通量(这是一个有助于提高生产力的因素)。

[0199] 在其他实施方式中,将反应环境或预处理(例如离心)反应环境加热至高于环境温度(即室温或反应环境温度)的温度,例如,加热至约30℃至约90℃,优选至约35℃-85℃范围内的温度,例如,约35℃-75℃,更优选约50℃-75℃,例如约60℃-65℃。UF前的这种热处理大幅度减少了反应环境中的活微生物总数(总微生物数),因此可能不需要在方法的后期进行无菌过滤步骤。此外,由于更有效的变性和沉淀,它减少了可溶性蛋白质的数量,从而提高了离子交换处理步骤(作为后续可选步骤)中残余蛋白质去除的效率。

[0200] 在一个实施方式中,上述步骤a)包括设置所述可选地预处理反应环境的pH值加热所述可选地预处理反应环境,优选地,pH设置之后是加热。优选地,上述步骤a)包括将所述可选地预处理反应环境的pH设置为不高于5,并将所述可选地预处理反应环境加热至约30℃-90℃,优选至约35℃-85℃,例如至约35℃-75℃,更优选至约50℃-75℃,例如约60℃-65℃,这尤其降低蛋白质的溶解度,从而在随后的UF步骤中降低蛋白质泄漏到UF渗透液中。

[0201] 在所述方法的步骤b)中,使用由非聚合物材料(优选陶瓷膜)组成的UF膜。如果在该温度下进行UF,则非聚合物UF膜可耐受高温。此外,非聚合物膜(最好是陶瓷膜)的适用通量通常高于具有相同或类似MWCO的聚合物UF膜的适用通量;此外,非聚合物膜(最好是陶瓷膜)不容易受到污染或堵塞。在工业应用中,UF膜的再生是一个重要的成本和技术因素。非聚合物膜(最好是陶瓷膜)允许使用苛刻的原位清洗(CIP)条件,包括高温下的苛性碱/强酸处理(不适用于聚合物膜),当对具有高悬浮固体含量的发酵液进行超滤时,可能需要这种条件。此外,非聚合物膜(最好是陶瓷膜)由于对以高错流循环的固体颗粒的惰性和耐磨性而具有更长的寿命。

[0202] 可使用截留分子量(MWCO)范围在约5至约1000kDa之间(例如约10-1000、5-250、5-500、5-750、50-250、50-500、50-750、100-250、100-500、100-750、250-500、500-750kDa或任何其他合适的子范围)的任何传统非聚合物超滤膜,有利的是陶瓷膜。

[0203] 所述方法的步骤b)可在低温(约5℃至rt)、室温或高温下进行,优选在高温下进行。高温优选不超过约65℃;合适的温度范围可以是,例如约35-50℃、35-65℃、45-65℃、50-65℃、55-65℃或60-65℃。在高温下进行的UF步骤可大幅减少反应环境中的活微生物总数(总微生物数),因此可能不需要在方法的后期进行无菌过滤步骤。此外,由于更有效的变性和沉淀,它减少了可溶性蛋白质的量,从而提高了离子交换处理步骤(作为后续可选步

骤)中残余蛋白质去除的效率。

[0204] 优选地,如果在高温下执行步骤b),则在前一步骤a)中将反应环境的pH设置为不高于约5是有利的,因为它尤其地降低蛋白质的溶解度,从而降低蛋白质泄漏到UF渗透液中。

[0205] 超滤步骤可用于无流动或错流模式。

[0206] 在一个实施方式中,在本发明的方法中仅进行单个UF步骤。

[0207] 在其他实施方式中,本发明的方法可包括使用具有不同MWC0的膜的不止一个超滤步骤,例如使用两个超滤分离,其中第一个膜的MWC0高于第二个膜的MWC0,前提是至少一个超滤膜是非聚合物膜,优选是陶瓷膜。这种安排可以提供更好的发酵液的高分子量成分的分离效果。

[0208] 然而,在一个实施方式中,超滤可与渗滤相结合。

[0209] 在进行包括上述步骤a)和b)的超滤后,包括目的中性HMO的UF渗透液含有分子量低于所用膜的MWC0(可选地,当使用一系列膜时,是最后一层膜的MWC0)的材料。

[0210] 2.2.3. 纳滤

[0211] 本发明的方法包括纳滤(NF)步骤。优选地,NF步骤直接在反应环境或离心的反应环境的超滤之后,即NF步骤的进料是含有目的中性HMO的UF渗透液。可选地,在进行NF步骤之前,可以使用活性炭(见下文)对UF渗透液进行脱色。该纳滤步骤可有利地用于浓缩UF渗透液和/或去除离子(主要是单价离子),以及分子量低于中性HMO的有机物质(例如单糖)。纳滤膜具有的MWC0比在前一步骤中使用的超滤膜的MWC0低,并确保截留目的中性HMO。

[0212] 在纳滤的第一个方面,NF膜的MWC0约为目的中性HMO分子量的25-50%,通常约为150-500Da。在这一方面,目的中性HMO在NF截留液(NFR)中累积。纳滤可以与用水进行的渗滤相结合,以更有效地去除或减少可渗透盐(如单价离子)的量。

[0213] 在第一个方面的一个实施方式中,NF在UF之后,使得UF渗透液在不进行渗滤的情况下进行纳滤,并且收集含有中性HMO的NF截留液并进行所述方法的进一步分离步骤。

[0214] 在第一个方面的其他实施方式中,NF在UF之后,使得UF渗透液先进行纳滤,后进行渗滤,并且收集含有中性HMO的NF截留液并进行所述方法的进一步分离步骤。

[0215] 纳滤的第一个方面有利地适用于不含乳糖或仅含少量乳糖(最多约为目的中性HMO重量的1-2%)的UF渗透液。

[0216] 纳滤的第二个方面有利地适用于含有更多乳糖的UF渗透液,膜的MWC0为600-3500Da,确保三糖或更高糖的中性HMO的保留,并允许至少一部分乳糖通过膜,其中,所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,并且其中所述膜上的 $MgSO_4$ 截留率约为20-90%,优选50-90%。

[0217] 术语“确保三糖或更高糖的中性HMO的保留”优选地意味着,在纳滤步骤期间,三糖或更高糖的中性HMO不通过或至少显著不通过膜,因此它们的绝大多数将存在于截留液中。术语“允许至少一部分乳糖通过膜”优选地意味着乳糖至少部分可以穿透膜并被收集在渗透液中。在乳糖的截留率很高(约90%)的情况下,则可能有必要随后用纯水进行渗滤,以将全部或至少大部分乳糖带入渗透液中。乳糖截留率越高,有效分离所必需的渗滤水就越多。

[0218] 根据NF的第二个方面,应用的纳滤膜应紧密适用于三糖或更高糖的中性HMO,以便它们被有效截留。优选地,三糖或更高糖的中性HMO的截留率大于95%,更优选97%,甚至更

优选99%。MWC0大于3500Da的膜预计允许更多或大量的三糖或更高糖的中性HMO通过膜,因此显示出三糖或更高糖的中性HMO的截留率降低,因此不适用于本发明的目的,并且可以排除。乳糖的截留率优选不超过80-90%。如果乳糖截留率变为 $90\pm 1-2\%$,则三糖或四糖中性HMO截留率优选为约99%或更高,以在实际情况下实现令人满意的分离。

[0219] 寡糖截留率和分离系数的测量和计算如WO 2019/003133中所公开。

[0220] 当膜对 MgSO_4 相对疏松时(即其截留率约为50-90%),上述要求同时得到满足。在这方面,上述规定的膜对于三糖或更高糖的中性HMO是紧密的,对于单糖和乳糖以及 MgSO_4 是疏松的。因此,可以以良好的效果从经纳滤后的中性人乳寡糖产品中分离乳糖(其为酶法或通过发酵合成人乳寡糖中的前体),此外,大量二价离子也会进入渗透液。在一些实施方式中, MgSO_4 截留率为30-90%、20-80%、40-90%、40-80%、60-90%、70-90%、50-80%、50-70%、60-70%或70-80%。优选地,所述膜上的 MgSO_4 截留率为80-90%。进一步优选地,所述膜对NaCl的截留率低于对 MgSO_4 的截留率。在一个实施方式中,对NaCl的截留率不超过约50%。在另一实施方式中,对NaCl的截留率不超过约40%。在其他实施方式中,对NaCl的截留率不超过约30%。在另一实施方式中,对NaCl的截留率不超过约20%。在NaCl截留率约为20-30%的情况下,截留液中所有单价盐的大幅减少也可以实现。

[0221] 膜上NaCl和 MgSO_4 截留率的测定在WO 2019/003133中公开。

[0222] 进一步优选地,在一些实施方式中,膜的纯水通量至少为 $50\text{l/m}^2\text{h}$ (当在23-25℃、10bar和300l/h恒定错流下测量时)。优选地,膜的纯水通量为至少 $60\text{l/m}^2\text{h}$ 、至少 $70\text{l/m}^2\text{h}$ 、至少 $80\text{l/m}^2\text{h}$ 或至少 $90\text{l/m}^2\text{h}$ 。

[0223] 适于NF步骤的第二方面的纳滤膜的活性或顶层优选由聚酰胺制成。尽管不同类型的膜看上去具有良好的分离效果,例如NTR-7450,其具有作为分离乳糖和3'-SL的活性层的磺化PES(Luo等人,(Biores.Technol.166,9(2014);Nordvang等人,(Separ.Purif.Technol.138,77(2014)),本发明中使用的上述特定膜显示始终更好的从中性HMO中的乳糖分离。此外,上述NTR-7450膜容易受到污染,这通常会导致通量下降,乳糖截留率增加以及从而分离系数的降低。然而,优选地,聚酰胺膜是具有苯二胺或哌嗪构建块作为胺的聚酰胺,更优选哌嗪(也被称为基于哌嗪的聚酰胺)。

[0224] 然而,优选地,适用于本发明目的的膜是薄膜复合(TFC)膜。

[0225] 一个合适的基于哌嗪的聚酰胺TFC膜的例子是TriSep[®]UA60。

[0226] 适用于NF步骤的第二方面的纳滤膜具有上述部分或全部特征,并且因此提供以下一个或多个益处:从三糖或更高糖的中性HMO中选择性且有效地去除乳糖,产生浓缩的三糖或更高糖的中性HMO部分;有效去除单价盐和二价盐,因此没有必要进行离子交换步骤,或者,如果仍然需要脱盐,则离子交换处理需要的树脂要少得多;与现有技术中用于相同或类似目的的其他膜相比,纳滤过程中可以保持更高的通量,这减少了操作时间;与现有技术解决方案相比,上述膜不易堵塞;上述膜可以被完全清洗和再生,因此可以在不大幅降低其性能的情况下回收。

[0227] 在所述NF步骤的第二方面的一个实施方式中,该步骤包括:

[0228] -将UF渗透液与截留分子量(MWC0)为600-3500Da的纳滤膜接触,确保截留三糖或更高糖的中性HMO,并允许至少一部分乳糖通过膜,其中,所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,其中所述膜上的 MgSO_4 截留率约为50-90%,

- [0229] -使用所述膜进行后续可选的渗滤，
- [0230] -并收集富含三糖或更高糖的中性HMO的截留液。
- [0231] 在其他实施方式中，所述NF步骤包括：
- [0232] -将UF渗透液与截留分子量(MWC0)为600-3500Da(优选1000-3500Da)的基于哌嗪的聚酰胺纳滤膜接触，确保截留三糖或更高糖的中性HMO，并允许至少一部分乳糖通过膜，其中，所述膜上的MgSO₄截留率约为80-90%，并且其中
- [0233] -所述膜上的NaCl截留率低于MgSO₄截留率，和/或
- [0234] -所述膜的纯水流量值为至少约50l/m²h，
- [0235] -使用所述膜进行后续可选的渗滤，
- [0236] -并收集富含三糖或更高糖的中性HMO的截留液。
- [0237] 优选地，膜的NaCl截留率最多为MgSO₄截留率的一半。
- [0238] 为了实现上述所有益处，拟应用于NF步骤第二方面的纳滤膜，优选：
- [0239] -是MWC0为600-3500Da，优选1000-3500Da的基于哌嗪的聚酰胺膜，
- [0240] -具有约50-90% (优选80-90%)的MgSO₄截留率，
- [0241] -具有不超过约30%的NaCl截留率，和
- [0242] -具有至少约为50l/m²h(在23-25℃、10bar和300l/h恒定错流下测量)，优选约为90l/m²h的纯水通量值。
- [0243] 在所述NF步骤的第二个方面的一个实施方式中，乳糖相对三糖或更高糖的中性HMO的分离系数大于约10，优选大于15-25，更优选地大于30-50，甚至更优选地大于75-100。
- [0244] 在所述NF步骤的第二个方面的其他实施方式中，乳糖相对LN_{Tri} II的分离系数大于约10，优选大于约20，更优选大于约30。
- [0245] 在所述NF步骤的第二个方面的其他实施方式中，乳糖相对LNT或LN_nT的分离系数大于约30，更优选大于约50。
- [0246] 在所述NF步骤的第二个方面的其他实施方式中，乳糖相对pLN_nH或pLN_H II的分离系数大于约150，更优选大于约250。
- [0247] 所述NF步骤的第二个方面可以在用于传统的切向流纳滤或正压错流纳滤(与渗透侧相比)的条件下进行，然后进行渗滤，其中两种操作都可以在间歇模式下进行，或者优选在连续模式下进行。可选的渗滤通过在上述纳滤步骤后向截留液中添加纯水，并在与纳滤相同或类似的条件下继续过滤过程，不断去除渗透液来进行。水添加的首选模式是连续的，即添加流速与渗透流速大致匹配。NF可以在间歇模式下进行，其中截留液流被循环回给料箱，通过向给料箱连续添加纯化水或去离子水来完成渗滤(DF)。最优选地，在至少一些通过去除一定量的渗透液的预浓缩后添加DF水。DF开始前的浓缩系数越高，DF效果越好。DF完成后，可以通过去除过量的渗透液来实现进一步的浓缩。或者，NF可以在连续模式下进行，优选在多回路系统中进行，其中每个回路的截留液被转移到下一个回路。在这种情况下，可以在每个回路中单独添加DF水，流速可以与每个回路中的渗透液流速相匹配，也可以在较低流速下进行。与分批模式DF一样，为了提高DF的效率，应在例如第一个回路中加入少量水或不加水，以获得更高的浓缩系数。多回路系统中的水分配以及其他工艺参数，如跨膜压力、温度和错流，均要受到常规优化。
- [0248] 适用于NF步骤的第二个方面的进料溶液的pH优选不高于约7，更优选在约3和7之

间,甚至更优选约4和5之间,或约5和6之间。pH值低于3可能会对膜和溶质性质产生不利影响。

[0249] 适用于NF步骤的第二个方面的适宜温度范围在约10℃到约80℃之间。温度越高,通量越大,因此过程越快。在更高的温度下,膜预计会更加开放以供流通,但这不会显著改变分离系数。根据本发明进行纳滤分离的优选温度范围为约15-45℃,例如20-45℃。

[0250] 纳滤分离中的优选施加压力为约2-50bar,例如约10-40bar。一般来说,压力越高,流量越大。

[0251] 在某些实施方式中,本发明的方法可包括附加(一个或多个)NF步骤,优选在活性炭处理(见下文)和/或离子交换处理(见下文)和/或中性固相上的色谱(见下文)之后,其中,主要目的是浓缩含有目的中性HMO的水溶液。

[0252] 2.2.4. 用离子交换树脂处理

[0253] 作为上述UF渗透液或上述NF截留液获得的中性HMO的水溶液可选地通过离子交换树脂进一步提纯。在用离子交换树脂处理之前,可以选择使用活性炭(见下文)对UF渗透液和NF截留液进行脱色。可通过树脂处理进一步去除残留盐、有色体、含有可电离基团的生物分子(如蛋白质、肽、DNA和内毒素)、含有可电离官能团的中性或两性离子化合物(如代谢物中的氨基,包括生物胺、氨基酸)、含有酸性基团的化合物(如有机酸、氨基酸)。特别是,如果在“用离子交换树脂处理”中应用阳离子和阴离子交换树脂,则可以实现树脂洗脱液的低盐含量(脱矿)。

[0254] 根据一个实施方式,离子交换树脂是阳离子交换树脂,优选强酸性阳离子交换树脂,优选质子化形式。在这一步中,当带正电的材料与树脂结合时,可以将其从进料溶液中去除。中性HMO溶液以任何合适的方式与阳离子交换树脂接触,使带正电的材料吸附在阳离子交换树脂上,并使中性HMO通过。在与阳离子交换树脂接触后,得到的液体除含有相应酸形式的阴离子外,还含有中性HMO和中性碳水化合物,如乳糖(如果在一个或多个之前的提纯步骤后仍剩余)。这些酸可以按常规中和。

[0255] 根据一个实施方式,离子交换树脂是阴离子交换树脂。阴离子交换树脂可以是具有优选OH⁻型的强阴离子交换树脂。在这一步中,带负电的材料可以在与树脂结合时从进料溶液中去除。中性HMO的水溶液以任何合适的方式与阴离子交换树脂接触,从而使带负电荷的材料吸附到阴离子交换树脂上,并使中性HMO通过。与阴离子交换树脂接触后,产生的液体主要含有水、阳离子(以相应碱的形式)和中性碳水化合物,如乳糖(如果在一个或多个之前的提纯步骤后仍剩余)。这些碱可以按常规中和。

[0256] 上述离子交换树脂处理之一可能足以获得所需纯度的中性HMO。如有必要,可采用任何顺序的阳离子和阴离子交换树脂色谱。

[0257] 在一个实施方式中,如果同时应用阳离子和阴离子树脂处理,则阳离子交换树脂为H⁺-型并且阴离子交换树脂是游离碱型的弱阴离子树脂。阳离子交换树脂优选为强交换剂。这种特殊的安排,除了从剩余培养基中去除盐和带电分子外,还能有效地物理吸附留在培养基中的蛋白质、DNA和着色/焦糖体。

[0258] 与OH⁻-型的强碱性阴离子交换剂相比,应用游离碱型的弱碱性阴离子交换剂(即,树脂的官能团为伯胺、仲胺或叔胺)是有利的。强碱性交换剂由于其强碱性,能够使中性HMO的异头OH-基团脱质子。这会在中性HMO的结构中引发重排反应,从而产生副产物,和/或大

量中性HMO与树脂结合。因此,这两个事件都会导致中性HMO的回收率的降低。

[0259] 此外,在 H^+ 型强阳离子交换树脂处理后,直接应用游离碱型的弱阴离子交换树脂还有额外的优点:

[0260] -它有效中和从阳离子交换剂中收集的酸性洗脱液,因此提供中性洗脱液,而无需在两个离子剂处理之间进行额外的中和步骤,

[0261] -它不会引入之后需要去除的强阴离子交换剂的阴离子,如 Cl^- 、 AcO^- 或 HCO_3^- 等,

[0262] -本发明的设置有效地将树脂装载的电导率降低近两个数量级,并直接提供具有低电导率(低于约 $200\mu S/cm$,优选低于约 $100\mu S/cm$,更优选低于约 $50\mu S/cm$)的洗脱液,因此具有低盐电解质含量。

[0263] 在一个实施方式中,所声称方法的可选离子交换树脂处理步骤由先用 H^+ -型的强阳离子交换树脂,然后使用游离碱型的弱阴离子交换树脂处理中性HMO的水溶液组成,所述水溶液为UF渗透液(其可选地用活性炭脱色(如上所述))或NF截留液(其可选地用活性炭脱色(如上所述))。

[0264] 在其他实施方式中,所述用于将中性HMO从产生它们的反应环境中获得或分离出的方法:

[0265] -包括离子交换树脂处理步骤,该步骤由先使用 H^+ -型的强阳离子交换树脂处理,然后再使用游离碱型的弱阴离子交换树脂处理中性HMO的水溶液组成,所述水溶液为UF渗透液(其可选地用活性炭脱色(如上所述))或NF截留液(其可选地用活性炭脱色(如上所述)),且

[0266] -不包括电透析。

[0267] 在其他实施方式中,所声称的用于将中性HMO从产生它们的反应环境中获得或分离出的方法仅包括单次离子交换树脂处理步骤,该步骤由先使用 H^+ -型的强阳离子交换树脂处理,然后再使用游离碱型的弱阴离子交换树脂处理中性HMO的水溶液组成,所述水溶液为UF渗透液(其可选地用活性炭脱色(如上所述))或NF截留液(其可选地用活性炭脱色(如上所述))。由 H^+ -型的强阳离子交换树脂,紧随其后的游离碱型的弱阴离子交换树脂组成的单次离子交换处理步骤,降低洗脱液的电导率,与WO 2019/063757中公开的三种离子交换剂的树脂设置相同。此外,如果树脂进料之前未用活性炭处理,则进料溶液的颜色减少约至少10倍是可以实现的。

[0268] 在其他实施方式中,所声称的用于从产生中性HMO的反应环境中获得或分离出中性HMO的方法不包括任何离子交换处理步骤,前提是该方法包括中性HMO的结晶,优选作为最终步骤。有利的是,中性HMO为2'-FL,并使用醋酸水溶液进行结晶,如WO 2016/095924中所公开。

[0269] 使用离子交换树脂时,可根据离子交换柱的操作条件选择其交联度。高度交联的树脂提供耐久性和高度的机械完整性的优点,然而其孔隙率降低且传质下降。交联度低的树脂更脆弱,容易吸收流动相而膨胀。选择离子交换树脂的粒径以允许洗脱液的有效流动,同时仍然有效去除带电材料。通过向柱的洗脱端施加负压或向柱的装载端施加正压获得合适的流速,并收集洗脱液。也可以使用正压和负压的组合。离子交换处理可按常规方式进行,例如分批或连续进行。

[0270] 合适的酸性阳离子交换树脂的非限制性示例可以是例如Amberlite IR100、

Amberlite IR120、Amberlite FPC22、Dowex 50WX、Finex CS16GC、Finex CS13GC、Finex CS12GC、Finex CS11GC、Lewatit S、Diaion SK、Diaion UBK、Amberjet 1000、Amberjet 1200、Dowex 88。

[0271] 合适的碱性阴离子交换树脂的非限制性示例可以是例如Amberlite IRA67、Amberlite IRA96、Amberlite IRA743、Amberlite FPA53、Diaion CRB03、Diaion WA10、Dowex 66、Dowex Marathon、Lewatit MP64。

[0272] 对于由H⁺-型的强阳离子交换树脂,紧随其后的游离碱型的弱阴离子交换树脂组成的单次离子交换处理步骤,对于两种树脂,树脂装载中目的中性HMO的量至少约为0.5kg/1树脂,更优选至少约为0.8kg/1树脂,例如约1.0-1.5kg/1树脂,其中树脂的体积对应于在水中完全膨胀的湿树脂的体积。

[0273] 2.2.5活性炭处理

[0274] 根据某些实施方式,本发明的方法包括活性炭处理的可选步骤。可选活性炭处理可在任何以上所有公开的UF步骤、NF步骤或离子交换处理步骤之后。如果需要,活性炭处理有助于去除着色剂和/或减少其他水溶性污染物(如盐)的量。此外,活性炭处理去除可能在之前的步骤后偶然剩余的残留或微量的蛋白质、DNA或内毒素。

[0275] 碳水化合物物质(如目的中性HMO)倾向于从其水溶液中(例如,UF步骤、NF步骤或离子交换处理步骤后获得的水溶液)结合到炭颗粒的表面。同样,着色剂也能吸附到炭上。当碳水化合物和显色物质被吸附时,不与炭结合或与炭结合较弱的水溶性物质可以用水洗脱。通过将洗脱液从水改为醇水溶液(例如乙醇),吸附的中性HMO可以很容易地洗脱并收集在单独的级分中。吸附的显色物质仍会吸附在炭上,因此,在这个可选步骤中,脱色和部分脱盐可以同时实现。然而,由于洗脱溶剂中存在有机溶剂(乙醇),与使用纯水进行洗脱的情况(见下文)相比,脱色效果较低。

[0276] 在某些条件下,中性HMO没有或至少基本上没有吸附到炭颗粒上,并且用水洗脱产生中性HMO的水溶液,其量没有显著损失,而显色物质仍被吸附。在这种情况下,无需使用乙醇等有机溶剂进行洗脱。确定在何种条件下中性HMO会与水溶液中的炭结合是一项常规技能。例如,在一个实施方式中,使用更稀释的中性HMO溶液或相对于中性HMO量更高量的炭,在另一个实施方式中,应用更浓缩的中性HMO溶液和相对于中性HMO量更低量的炭。

[0277] 炭处理可通过在搅拌下向中性HMO的水溶液中添加炭粉、过滤炭、在搅拌下重新悬浮在醇水溶液中以及通过过滤分离炭来进行。在更高规模的提纯中,中性HMO水溶液优选地装载到填充有炭(炭可选地与硅藻土混合)的柱中,然后用所需的洗脱液清洗柱。收集含有中性HMO的级分。如果用于洗脱,可通过例如蒸发的方式从这些级分中去除残余醇,以得到中性HMO的水溶液。

[0278] 优选地,所使用的活性炭是颗粒化的。这样确保没有施加高压时获得适宜的流速。

[0279] 还优选地,在高温下对含有来自UF步骤、NF步骤或离子交换处理步骤的目的中性HMO的水溶液进行活性炭处理,更优选活性炭色谱。在高温下,有色体、残余蛋白质等与炭颗粒的结合在较短的接触时间内发生,因此可以方便地提高流速。此外,在高温下进行的活性炭处理大幅度减少中性HMO的水溶液中的活微生物总数(总微生物数),因此,在该方法的后期进行无菌过滤步骤可能不是必需的。高温至少为30-35℃,例如至少40℃、至少50℃、约40-50℃或约60℃。

[0280] 还优选地,所施加的炭量不超过装载物中所含中性HMO的约10重量%,更优选约2-6重量%。这是经济的,因为上文公开的所有优势都可以用极少量的炭方便地实现。

[0281] 活性炭处理(优选色谱)尤其优选在高温下进行,相对于水溶液中目的中性HMO的量,活性炭的重量不超过约10%,优选约2-6%。

[0282] 2.2.6中性固相上的色谱提纯

[0283] 在该可选步骤中,可通过中性固相上的色谱的方式进一步提纯来自UF步骤、NF步骤、离子交换处理步骤或活性炭处理(所有这些都已在本文中详细公开)的中性HMO的水溶液。

[0284] UF步骤、NF步骤、离子交换处理步骤或活性炭处理后产生的水溶液可能含有少量应去除的其他可溶性疏水杂质。可通过在中性固相上对该水性介质进行色谱(有利的是反相色谱)来去除杂质。因此,由于疏水相互作用,含有疏水部分的污染物被固定相凝胶基质(树脂)的疏水配体(例如烷基或芳基侧链)吸附,并因此保留,而更亲水的中性HMO不会结合到反相色谱介质上且因此被用作流动相的水性介质洗脱。

[0285] 反相色谱可以用常规方式进行。优选地,使用疏水色谱介质,其选自:反相硅胶和有机聚合物,尤其是苯乙烯或二乙烯基苯和甲基丙烯酸酯聚合物的共聚物。优选地,用长度范围从C1到C18(最常见的是C1、C4、C5、C8和C18)的直链烷基烃或其他疏水配体(例如苯基或氰基)对硅胶进行衍生化。

[0286] 在用作反相色谱中流动相的水性介质中,可添加有机溶剂以改变其极性,从而增强提纯。许多有机溶剂,优选与水混溶的溶剂,可用于此目的,例如低烷醇(例如甲醇、乙醇和异丙醇)、或乙腈、四氢呋喃或丙酮。

[0287] 此外,为了增强中性HMO的提纯,在反相色谱之前,优选将水性介质的pH调节至约3-8,例如约4-7。这优选地通过添加例如甲酸铵、乙酸铵或碳酸氢铵等常规方式来实现。

[0288] 此外,为了增强中性HMO的提纯,优选在反相色谱之前将盐溶解在水性介质中。盐增加了非糖类污染物的疏水相互作用,以增加疏水色谱介质对它们的去除。可使用的盐包括: Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 、 NH_4Cl 、 NaBr 、 NaSCN 和 NaClO_4 。

[0289] 反相色谱可以以常规方式进行,例如分批或连续进行。通过使用实验室或工业规模的常规色谱柱或容器,可以轻松完成提纯,其中疏水色谱介质可以被包装或悬浮(例如,作为珠状物)。

[0290] 2.2.6.1溴官能化PS-DVB疏水性固定相上的色谱

[0291] 通常,高疏水性固定色谱介质的应用不适用于分离高极性寡糖(参见,例如WO 2017/221208)。然而,在微生物或酶促生产目的中性HMO的过程中,可能会形成除目的中性HMO以外的伴随寡糖作为副产品(见上文2.1)。其中一些可直接从反应环境中去除(见上文2.1),或至少可减少其在反应环境中的量(见上文2.1),或在特殊条件下通过纳滤去除(见上文2.2.2)。

[0292] 如果目的中性HMO需要具有高纯度且伴随的寡糖污染量非常低,则可能有必要进行进一步的提纯步骤,包括在与二乙烯基苯(PS-DVB)交联的溴官能化聚苯乙烯疏水固定相上进行色谱。

[0293] 优选地,BPS-DVB树脂的溴化水平约为25-61w/w%,例如约为25-35w/w%。

[0294] 上述色谱分离工艺从R&D实验室扩大到中试工厂再到工业全规模作为分批过程和

在多柱装置中都是稳健的。固相和相关的色谱运行可以通过使用例如醇水溶液施加梯度的方式进行,但也可以完全不使用有机溶剂(纯水)运行。该工艺在高温(例如高达60℃左右)下运行良好,这在降低微生物生长风险和提高生产率方面具有优势。此外,固相可以使用例如醋酸水溶液完全再生,因此非常适合食品相关加工。

[0295] 分离方法可以以常规方式进行。包含目的中性HMO的水溶液用作色谱中的流动相。可向水溶液中添加有机溶剂,优选 C_1 - C_4 醇。水溶液的pH优选在约3至约8之间,更优选在约4至约7之间。如有必要,可通过添加酸、碱或缓冲液的水溶液,以常规方式将pH值调整至所需值。使用实验室或工业规模的常规色谱柱或容器可以轻松完成分离,其中PS-DVB-Br树脂可以被包装或悬浮(例如作为珠状物)。优选地,分离方法在柱中执行。

[0296] 分离程度取决于许多参数,如流体性质/洗脱速率、收集的级分体积、低聚糖装载物相对于树脂质量或树脂床体积的质量等。这些参数可以通过常规技能进行优化。术语“分离”是指从伴随的寡糖中完全分离出目的中性HMO,即以不含其他寡糖的纯的形式从级分中收集和分离。术语“分离”还指部分分离,其中目的中性HMO可从至少一种级分中以纯的形式获得,或者级分中的目的中性HMO与伴随的寡糖的比率高于在进料溶液中的比率,从而使目的中性HMO富集。

[0297] 优选地,在BPS-DVB固定介质上的色谱包括:

[0298] -将含有目的中性HMO的水溶液装载到BPS-DVB介质上,

[0299] -用可选地含有 C_1 - C_4 醇的水洗脱,然后

[0300] -收集至少富集目的中性HMO的级分。

[0301] 色谱后,BPS-DVB培养基可通过用含有水混溶性有机溶剂的水洗脱而再生并回收。

[0302] 在通过在上述BPS-DVB上的色谱将目的中性HMO从伴随的寡糖中分离的方法中,目的中性HMO和伴随的寡糖在至少一个结构特征上彼此不同,例如,至少一个单糖单元不同、单糖单元的数量不同、或者至少一个糖苷间连接的方向不同(是 α 或 β)。在一个实施方式中,其中一种寡糖比另一种至少多由两个单糖单元组成,例如其中一种寡糖是三糖,另一种是五糖,或者一种寡糖是四糖,另一种是六糖。在另一实施方式中,一种目的中性HMO包含至少一个GlcNAc单元,而伴随的寡糖不包含。在另一实施方式中,其中一种寡糖比另一种包含更多GlcNAc单元。

[0303] 优选地,目的中性HMO是四糖,例如LNnT,并且伴随的寡糖是五糖或六糖,例如pLNnH。还优选地,中性HMO四糖是LNT,并且伴随的寡糖是五糖或六糖,例如pLNH II。

[0304] 2.2.7以分离形式提供目的中性HMO

[0305] 在上述2.2.2至2.2.6中任何一项所公开的分离/提纯步骤后,通过喷雾干燥、冷冻干燥或结晶,可以以固体形式提供所获得的中性HMO。因此,本发明的方法可包括以分离的、优选干燥形式提供目的中性HMO的一个或多个进一步的步骤,例如对UF步骤、NF步骤、活性炭处理、离子交换处理和/或中性固相上的色谱后获得的中性HMO的水溶液进行喷雾干燥的步骤;或对UF步骤、NF步骤、活性炭处理、离子交换处理和/或中性固相上的色谱后获得的中性HMO的水溶液进行冷冻干燥的步骤;或对UF步骤、NF步骤、活性炭处理、离子交换处理和/或中性固相上的色谱后获得的中性HMO(前提是目的中性HMO以结晶形式存在)进行结晶的步骤。或者,在UF步骤、NF步骤、活性炭处理、离子交换处理和/或中性固相上的色谱后获得的中性HMO可通过去除水(例如通过蒸馏、优选真空蒸馏或纳滤)以浓缩水溶液或糖浆的形

式提供。

[0306] 当目的中性HMO以喷雾干燥形式分离时,优选按照例如W0 2013/185780中所公开的方式进行,或使用目的中性HMO的15-65w/v水溶液在110-190℃的喷嘴温度和60-110℃的出口温度下进行喷雾干燥过程,前提是喷嘴温度至少比出口温度高10℃。

[0307] 当目的中性HMO以结晶形式分离时,优选地

[0308] -从W0 2016/095924中公开的乙酸水溶液中进行结晶,以根据W0 2011/150939分离2'-FL多晶型II,或

[0309] -从W0 2011/100980中公开的甲醇水溶液中进行结晶,以分离其中表征的LNnT多晶型。

[0310] 3. 本发明的优选实施方式

[0311] 本发明的实施方式,包括优选和更优选的实施方式,不包括电透析步骤。

[0312] 所述方法的一个实施方式涉及从产生中性HMO的发酵液中获得或分离出中性HMO,包括以下步骤:

[0313] a) 将所述反应液的pH设置为pH=3-5,

[0314] b) 可选地将步骤a)中获得的pH值调整后的发酵液冷却至5-15℃并储存1-15天,

[0315] c) 将步骤a)或步骤b)的发酵液加热至60-65℃,

[0316] d) 将步骤c)中获得的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa(例如10-1000kDa)的超滤(UF)膜接触,其中所述膜为陶瓷膜,可选地在40-65℃下,

[0317] e) 对在步骤d)中获得的渗透液进行可选的无菌过滤,

[0318] f) 将在步骤d)中获得的渗透液或在步骤e)中获得的经无菌过滤的渗透液与具有600-3500Da MWC0的纳滤(NF)膜接触,其中所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,其中,所述膜上的MgSO₄截留率约为20-90%,优选50-90%,

[0319] g) 先用H⁺-型的强阳离子交换树脂,然后再用碱型的弱碱离子交换树脂处理步骤f)中获得的截留液以使所述截留液脱矿,

[0320] h) 在30-60℃下对步骤g)中获得的溶液进行活性炭色谱,其中活性炭的量约为装载物中所含中性HMO的2-10重量%,

[0321] i) 使用150-500Da的膜对步骤h)中获得的溶液进行纳滤以浓缩溶液,

[0322] j) 通过喷雾干燥步骤i)中的溶液来去除水分,以获得作为无定形固体的中性HMO,或从步骤i)中获得的溶液中结晶中性HMO。

[0323] 所述方法的一个实施方式涉及将中性HMO从产生它们的发酵液中获得或分离出,包括以下步骤:

[0324] a) 将所述反应液的pH设置为约5.5,

[0325] b) 离心步骤a)中获得的发酵液,

[0326] c) 可选地将步骤b)的上清液加热至60-65℃,

[0327] d) 将步骤b)或步骤c)的上清液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选地在40-65℃下;

[0328] e) 将步骤d)中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF)膜接触:

[0329] -具有600-3500Da的MWC0,其中,所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,并且其中所述膜上的MgSO₄截留率约为20-90%,优选50-90%,或者

- [0330] -具有150-500Da的MWC0,
- [0331] f) 在30-60℃下对步骤e)中获得的截留液进行活性炭色谱,其中,炭的量约为装载物中所含中性HMO的2-10重量%,
- [0332] g) 先用H⁺-型强阳离子交换树脂,然后再用碱性弱碱离子交换树脂处理步骤f)中获得的溶液处理以使溶液脱矿,
- [0333] h) 用150-500Da的膜对步骤g)中获得的溶液进行纳滤以浓缩所述溶液,
- [0334] i) 对步骤i)中的溶液进行喷雾干燥,以获得作为无定形固体的中性HMO,或从步骤h)中获得的溶液中结晶中性HMO。
- [0335] 所述方法的一个实施方式涉及从产生2'-FL的发酵液中获得或分离出2'-FL,包括以下步骤:
- [0336] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6,和/或将所述发酵液加热至约35-65℃,
- [0337] b) 将步骤a)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选地在40-65℃下,
- [0338] c) 将步骤b)中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF)膜接触:
- [0339] -具有600-3500Da的MWC0,其中膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,其中,所述膜上的MgSO₄截留率约为20-90%,优选50-90%,或
- [0340] -具有150-500Da的MWC0,
- [0341] d) 在30-60℃下对步骤c)中获得的截留液进行活性炭色谱,
- [0342] e) 蒸发步骤d)中获得的溶液,直到2'-FL的浓度达到约400-700g/l,
- [0343] f) 借助甲醇或乙酸(优选乙酸)从步骤e)中获得的溶液中结晶2'-FL,以获得2'-FL多晶型II。
- [0344] 所述方法的一个实施方式涉及从产生2'-FL的发酵液中获得或分离出2'-FL,包括以下步骤:
- [0345] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6,和/或将所述发酵液加热至约35-65℃的温度,
- [0346] b) 将步骤a)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选在40-65℃下,
- [0347] c) 将步骤b)中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF)膜接触:
- [0348] -具有600-3500Da的MWC0,其中所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,其中,所述膜上的MgSO₄截留率约为20-90%,优选50-90%,或
- [0349] -具有150-500Da的MWC0,
- [0350] d) 在30-60℃下对步骤c)中获得的截留液进行活性炭色谱,
- [0351] e) 将步骤d)中获得的溶液与MWC0为600-3500Da的纳滤(NF)膜接触,其中,所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,并且其中所述膜上的MgSO₄截留率约为20-90%,优选50-90%,
- [0352] f) 对步骤e)中获得的渗透液进行蒸发或使用150-300Da的膜对步骤e)中获得的渗透液进行纳滤,以浓缩溶液,直到2'-FL的浓度达到约400-700g/l,
- [0353] g) 借助乙酸从步骤f)中获得的溶液中结晶2'-FL,以获得2'-FL多晶型II。
- [0354] 所述方法的一个实施方式涉及从产生2'-FL的发酵液中获得或分离出2'-FL,包括以下步骤:

- [0355] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6,和/或将所述发酵液加热至约35-65℃的温度,
- [0356] b) 将步骤a)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选在40-65℃下,
- [0357] c) 将步骤b)中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF)膜接触:
- [0358] -具有600-3500Da的MWC0,其中所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,其中,所述膜上的 MgSO_4 截留率约为20-90%,优选50-90%,或
- [0359] -具有150-500Da的MWC0,
- [0360] d) 先用 H^+ -型的强阳离子交换树脂,然后再用碱型的弱碱离子交换树脂处理步骤c)中获得的截留液,以使溶液脱矿,
- [0361] e) 在30-60℃下对步骤d)中获得的溶液进行活性炭色谱,
- [0362] f) 对步骤e)中获得的溶液进行蒸发,或使用150-300Da的膜对步骤e)中获得的溶液进行纳滤,以浓缩溶液,
- [0363] g) 借助乙酸从步骤f)中获得的溶液中结晶2'-FL,以获得2'-FL多晶型II,或对步骤f)中获得的溶液进行喷雾干燥,以获得作为无定形粉末的2'-FL。
- [0364] 所述方法的一个实施方式涉及从产生中性HMO的发酵液中获得或分离出中性HMO,包括以下步骤:
- [0365] a) 将所述反应液的pH设置为约3-6,
- [0366] b) 可选地将步骤a)的发酵液加热至30-65℃,
- [0367] c) 将步骤a)或步骤b)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为10-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选地在40-65℃下,
- [0368] d) 将步骤c)中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF)膜接触:
- [0369] -具有600-3500Da的MWC0,其中,所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,且其中所述膜上的 MgSO_4 截留率约为20-90%,优选50-90%,或
- [0370] -具有150-500Da的MWC0,
- [0371] e) 在30-60℃下对步骤d)中获得的截留液进行活性炭色谱,其中所述炭的量约为装载物中所含中性HMO的2-10重量%,
- [0372] f) 先用 H^+ 型强阳离子交换树脂,然后再用碱性弱碱离子交换树脂处理步骤e)中获得的溶液,以使溶液脱矿,
- [0373] g) 用150-300Da的膜对步骤f)中获得的溶液进行纳滤,以浓缩所述溶液,
- [0374] h) 从步骤g)中获得的溶液中结晶中性HMO,
- [0375] 其中中性HMO为2'-FL、LNnT或LNT。
- [0376] 所述方法的一个实施方式涉及从产生3-FL的发酵液中获得或分离出3-FL,包括以下步骤:
- [0377] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6,和/或将所述发酵液加热至约35-65℃的温度,
- [0378] b) 将步骤a)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选地在40-65℃下,
- [0379] c) 将步骤b)中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF)膜接触:
- [0380] -具有600-3500Da的MWC0,其中所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,其中,所述膜上的 MgSO_4 截留率约为20-90%,优选50-90%,或

[0381] -具有150-500Da的MWC0,

[0382] d) 先用 H^+ -型强阳离子交换树脂,然后再用碱型的弱碱离子交换树脂处理步骤c)中获得的截留液,使溶液脱矿,

[0383] e) 在30-60℃下对步骤d)中获得的溶液进行活性炭色谱,

[0384] f) 对步骤e)中获得的溶液进行蒸发,或使用150-300Da的膜对步骤e)中获得的溶液进行纳滤,以浓缩溶液,

[0385] g) 对步骤f)中获得的溶液进行喷雾干燥,以获得作为无定形粉末的3-FL。

[0386] 所述方法的一个实施方式涉及从产生LNnT的发酵液中获得或分离出LNnT,包括以下步骤:

[0387] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6,和/或将所述发酵液加热至约35-65℃的温度,

[0388] b) 将步骤a)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选地在40-65℃下,

[0389] c) 将步骤b)中获得的渗透液与MWC0为600-3500Da的纳滤(NF)膜接触,其中所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,并且其中所述膜上的 $MgSO_4$ 截留率约为20-90%,优选50-90%,

[0390] d) 在30-60℃下对步骤c)中获得的截留液进行活性炭色谱,

[0391] e) 先用 H^+ -型强阳离子交换树脂,然后再用碱性弱碱离子交换树脂处理步骤d)中获得的溶液,以使溶液脱矿,

[0392] f) 对步骤e)中获得的溶液进行蒸发,或用150-300Da的膜对步骤e)中获得的溶液进行纳滤以浓缩溶液,

[0393] g) 借助甲醇从步骤f)中获得的溶液中结晶LNnT。

[0394] 所述方法的一个实施方式涉及从产生LNnT的发酵液中获得或分离出LNnT,包括以下步骤:

[0395] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6,和/或将所述发酵液加热至约35-65℃,

[0396] b) 将步骤a)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选地在40-65℃下,

[0397] c) 将步骤b)中获得的渗透液与MWC0为600-3500Da的纳滤(NF)膜接触,其中所述膜的活性(顶)层由聚酰胺组成,其中,所述膜上的 $MgSO_4$ 截留率约为20-90%,优选50-90%,

[0398] d) 用 H^+ -型的强阳离子交换树脂,然后用碱型的弱碱离子交换树脂处理步骤c)中获得的截留液以使溶液脱矿,

[0399] e) 在30-60℃下对步骤d)中获得的溶液进行活性炭色谱,

[0400] f) 对步骤e)中获得的溶液进行蒸发,或用150-300Da的膜对步骤e)中获得的溶液进行纳滤,以浓缩溶液,

[0401] g) 借助甲醇从步骤f)中获得的溶液中结晶LNnT。

[0402] 所述方法的一个实施方式涉及从产生LNnT的发酵液中获得或分离出LNnT,包括以下步骤:

[0403] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6,和/或将所述发酵液加热至约35-65℃,

[0404] b) 将步骤a)的发酵液与截留分子量(MWC0)约为5-1000kDa的超滤(UF)膜接触,可选在40-65℃下,

- [0405] c) 将步骤b) 中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF) 膜接触:
- [0406] -具有600-3500Da的MWC0, 其中所述膜的活性(顶) 层由聚酰胺组成, 其中, 所述膜上的 MgSO_4 截留率约为20-90%, 优选为50-90%, 或
- [0407] -具有150-500Da的MWC0,
- [0408] d) 在30-60℃下对步骤c) 中获得的截留液进行活性炭色谱,
- [0409] e) 先用 H^+ -型强阳离子交换树脂, 然后再用碱型弱碱离子交换树脂处理步骤d) 中获得的溶液, 以使溶液脱矿,
- [0410] f) 在与二乙烯基苯(PS-DVB) 交联的溴官能化聚苯乙烯疏水固定相上对步骤e) 中获得的溶液进行色谱, 并收集富含LNnT的级分,
- [0411] g) 对步骤f) 中获得的级分进行蒸发或使用150-300Da的膜对步骤f) 中获得的级分进行纳滤以浓缩所述溶液,
- [0412] h) 对步骤g) 中获得的溶液进行喷雾干燥以获得作为无定形粉末的LNnT。
- [0413] 所述方法的一个实施方式涉及从产生LNnT的发酵液中获得或分离出LNnT, 包括以下步骤:
- [0414] a) 将发酵液的pH设置为约3至约6, 和/或将所述发酵液加热至约35-65℃的温度,
- [0415] b) 将步骤a) 的发酵液与截留分子量(MWC0) 约为5-1000kDa的超滤(UF) 膜接触, 可选地在40-65℃下,
- [0416] c) 将步骤b) 中获得的渗透液与如下所述的纳滤(NF) 膜接触:
- [0417] -具有600-3500Da的MWC0, 其中所述膜的活性(顶) 层由聚酰胺组成, 其中, 所述膜上的 MgSO_4 截留率约为20-90%, 优选50-90%, 或
- [0418] -具有150-500Da的MWC0,
- [0419] d) 用 H^+ -型的强阳离子交换树脂, 然后用碱型的弱碱离子交换树脂处理步骤c) 中获得的截留液, 以使溶液脱矿,
- [0420] e) 在30-60℃下对步骤d) 中获得的溶液进行活性炭色谱,
- [0421] f) 在与二乙烯基苯(PS-DVB) 交联的溴官能化聚苯乙烯疏水固定相上对步骤e) 中获得的溶液进行色谱, 并收集富含LNnT的级分,
- [0422] g) 蒸发步骤f) 中获得的级分, 或使用150-300Da的膜对步骤f) 中获得的级分进行纳滤, 以浓缩所述溶液,
- [0423] h) 对步骤g) 中获得的溶液进行喷雾干燥, 以获得作为无定形粉末的LNnT。
- [0424] 实施例
- [0425] 概述:
- [0426] 目的中性HMO的浓度通过HPLC在TSKgel Amide-80 (150mm×4.6mm, 粒径:3μm) 上用64v/v%乙腈以1.1ml/min的流速并在25℃下使用37℃下的折射率检测器进行测定。
- [0427] 有机杂质的浓度通过HPLC在apHera NH_2 polymer (250mm×4.6mm;5μm) 上用72v/v%乙腈以1.1ml/min的流速并在25℃下使用带电气溶胶检测器(CAD) 进行测定。
- [0428] 实施例1
- [0429] 发酵:通过使用LacZ⁻、LacY⁺表型的遗传修饰的E.coli菌株发酵产生含有2'-FL的发酵液, 其中, 所述菌株包含编码 α 1,2-岩藻糖基转移酶(其能够将GDP-岩藻糖的岩藻糖转移至内化的乳糖)的重组基因以及编码到GDP-岩藻糖的生物合成途径的基因。通过在外源

添加的乳糖和合适的碳源存在下培养菌株来进行发酵(例如,根据WO 2015/197082),从而产生2'-FL,其伴随着作为发酵液中的主要碳水化合物杂质的DFL和未反应的乳糖。

[0430] 发酵完成后,将发酵液冷却至10℃,并在几个小时内添加25%的硫酸溶液,直到pH稳定在4.0。

[0431] 获得的发酵液(16.69kg)含有99.86g/l 2'-FL、11.4g/l乳糖和3.61g/l DFL,电导率为5.65mS/cm,BWM(生物湿质量)为28.3%(其计算为将在室温下通过离心发酵液小样获得的上清液去除后的湿固体质量除以该发酵液样品的初始质量)。

[0432] 将一部分发酵液(约10kg)转移至配备有15kDa陶瓷膜的MMS SW18膜过滤系统,并在60℃下平衡约45分钟。在TMP=6bar和0.9m/s错流速度下开始分批超滤。剩下的发酵液分小份加入。在进料量减少到大约一半(浓缩系数,CF=2)后,开始使用与初始进料量(16.7kg,“1体积DF”)相同的水量进行渗滤(DF),并以5.41/h的流速连续添加,与DF开始前的渗透液流速大致匹配。结果,获得28.45kg的透明棕色UF渗透液,其中含有52.8g/l 2'-FL、4.94g/l乳糖、1.33g/l DFL和26.3mg/l蛋白质,Brix为8.5,电导率为5.96mS/cm,且pH为4.43。2'-FL产量的回收率为96%。

[0433] 将获得的UF渗透液(28.42kg)部分转移至另一个配备有螺旋缠绕Trisep-UA601812膜(根据说明书,MWCO为1000-3500Da)的SW18膜过滤系统。在TMP=35bar时开始收集NF渗透液,直到收集到20.38kg Brix为0.9的NF渗透液。用10ml的50%氢氧化钠溶液将截留液的pH从4.3调整到5.5。此时,开始使用25kg水以5.51/h的流速进行连续DF。在DF期间,TMP增加至40.0bar,温度稳定在45℃。如此获得的(1st)NF截留液(5.76kg,Brix 27.7,d=1.12g/cm³,电导率3.02mS/cm,pH 5.64)含有202.43g/l的2'-FL、7.24g/l的乳糖、7.63g/l的DFL和100.1mg/l的蛋白质,其中乳糖/2'-FL的比率从初始UF渗透液中的9.4%降低至3.6%。其他小分子的数量也被有效地减少。此外,冷冻干燥后固体样品中2'-FL的总纯度从62.4%(在UF渗透液中)提高到82.6%(NF截留液)。计算的步骤收率为78.6%。为了提高产量,DF渗透液(27.30kg)在如上文所述相同的NF系统中再处理浓缩至小体积(约2.31),然后用10kg水进行渗滤,得到2nd NF截留液(1.365kg)。1st和2nd NF截留液中2'-FL的综合回收率为94%。UF+NF步骤的2'-FL回收率为75.4%(没有再处理1st NF),通过再处理1st NF渗透液,回收率提高到90%。

[0434] 将1st NF截留液(5.74kg)通过一个管内径为5cm填充有0.81再生的Dowex 88树脂(带有磺酸基的强阳离子交换剂,H⁺-型)的1升柱,该柱与第二个填充有0.81再生的Dowex 66树脂(弱阴离子交换剂,叔胺,游离碱型)的1升柱相连接,流速约为2.41/h。丢弃640ml的初始空隙体积,然后收集主要级分。消耗整个进料溶液后,继续以相同的流速用约1.61去离子水进行洗脱。收集的主要级分重量为6760g(密度1.09,Brix 21.8,电导率0.152mS/cm,pH 6.21),含有180.17g/l 2'-FL、5.97g/l乳糖、6.2g/l DFL和仅0.9mg/l蛋白质,2'-FL回收率接近定量。此外,根据电导率下降估计,盐含量减少了95%以上,颜色也从深棕色大幅降低到淡黄色。在另一个具有类似进料量和成分的运行中,通过在400nm处的UV光吸收从NF截留液中的>3.0到脱矿后的0.44来量化颜色降低。为了说明其效力,树脂上的装载量约为2kg/l湿树脂(总固体)和1.4kg/l湿树脂(2'-FL)。如果使用150-300kDa MWCO的NF膜进行NF步骤,则至少需要5倍多的树脂(即不超过1/5th装载量)才能达到相同的低颜色和导电率。

[0435] 在上述脱矿步骤中获得的淡黄色溶液(6.74kg)通过悬浮在水中包装在热套GE

XK-16/100柱中的粒状活性炭(88g,占进料中总固体的6w/w%),并在60℃和1.5l/h流速下,然后加入200ml去离子水,以提供无色透明的溶液(6919g,密度1.086,Brix 20.7,电导率0.16mS/cm,pH 6.1),含有174.65g/l 2'-FL、5.60g/l乳糖、5.95g/l DFL和<1mg/l的蛋白质,产量接近2'-FL定量。在另一次类似有进料量和成分的运行中,通过在400nm处的UV光吸收对颜色减少进行量化,在炭色谱后进料中的颜色从0.44大幅减少至0.01。

[0436] 上一步中的溶液在减压下浓缩至3.45kg(Brix 41.6),并使用少量37%盐酸溶液将溶液的pH从pH=6.5调整至4.83。所得浓缩糖浆用200nm过滤器无菌过滤,并用去离子水洗涤。将如此获得的糖浆(3.97kg,Brix 36.2)冻干为7份,得到1405g最终产品,将其转移并研磨成含有86.07%的2'-FL、3.83%的乳糖、4.75%的DFL和2.81%的残余水的白色粉末;蛋白质<0.0017%,钾<10mg/kg,镁<5mg/kg,钠220mg/kg,铜<0.1mg/kg,铁<0.5mg/kg,锰<0.1mg/kg,铅<0.01mg/kg,锌0.2mg/kg,铵<50mg/kg,磷酸盐<50mg/kg,硫酸盐20mg/kg,氯化物282mg/kg,硫酸灰分0.09%,内毒素0.003EU/mg,总平板计数(微生物参数)<10cfu/g。

[0437] 实施例2:

[0438] 通过在室温下搅拌添加25% H_2SO_4 溶液,对2'-FL发酵液的几个样品进行pH调整;在平衡20分钟和2小时后测量pH。所得液体的样品在室温下离心,其他样品在室温下离心前在60℃下恒温10分钟。通过Bradford试验分析所得上清液的可溶性蛋白质含量。结果总结如下表所示。因此,低pH(<4)和适度热处理(60℃)的组合可将可溶性蛋白质的量减少至未处理的发酵液的0.1份。

[0439]

调整 and 平衡 20 min 后的 pH	室温下上清液中的蛋白质[mg/l]	60℃处理后上清液中的蛋白质[mg/l]
6.3 (未调整)	3561	3719
5.0	2777	2265
4.5	2213	1320
4.2	1839	1135
3.9	1574	808
3.3	900	390

[0440] 实施例3

[0441] 将实施例1中所述的201规模产生的几种2'-FL发酵液调整至不同pH值,并在与实施例1中所述的60℃相同UF条件下进行处理。在pH=3.8时,UF渗透液中的蛋白质含量比不进行pH调整的pH=6.3时的UF运行减少了5倍,这与实施例2中给出的类似pH值下上清液中的蛋白质减少一致。此外,在pH 5.8和6.3时,蛋白质含量几乎没有差异,但在pH 3.8相对于pH 4.35时,蛋白质含量可以减少2倍。

[0442] 实施例4

[0443] 通过使用WO 2017/182965中公开的遗传修饰的E.coli细胞发酵制备LNnT,由此产生含有LNnT的发酵液,该发酵液伴有中间体乳-N-三糖II、pLNnH和未反应的乳糖。

[0444] 将所得发酵液调整至pH=5.0,并将其分为三等份,每一份分别在40℃、50℃和60℃下用50nm陶瓷膜以分批模式通过UF处理,以与实施例1中2'-FL所述相同的方式,包括浓

度达到 $CF=2.0$,然后是用相对于初始进料量1体积的水进行DF。下表总结了UF渗透液中的LNnT产率和蛋白质含量。

[0445]

T (°C)	LNnT产率	蛋白质,mg/l
40	53%	141
50	65%	615
60	88%	672