



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113366005 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(21) 申请号 201980076308.5

(22) 申请日 2019.11.20

(30) 优先权数据

16/198,545 2018.11.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/062454 2019.11.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/106870 EN 2020.05.28

(71) 申请人 阿迈瑞斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·沃尔特 J·A·勒门

M·丽维尔 B·亚普

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶家蓉 陈扬扬

(51) Int.Cl.

C07H 13/04 (2006.01)

权利要求书3页 说明书24页 附图9页

(54) 发明名称

酵母中化合物的生物合成

(57) 摘要

本文提供了能够产生一种或多种人乳寡糖的遗传修饰的酵母细胞。酵母细胞包括一种或多种编码人乳寡糖生物合成途径的酶的异源核酸。酵母细胞不包括编码岩藻糖激酶的异源核酸。还提供了包括所公开的遗传修饰的酵母细胞的发酵组合物,以及生产和回收由酵母细胞产生的人乳寡糖的相关方法。

|                   | 乳糖 | 半乳糖 | 岩藻糖 | 唾液酸 | N-乙酰葡萄糖胺 |
|-------------------|----|-----|-----|-----|----------|
| 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL) |    |     |     |     |          |
| 6'-唾液酸乳糖 (6'-SL)  |    |     |     |     |          |
| 乳-N-四糖 (LNf)      |    |     |     |     |          |

1. 一种能够产生一种或多种人乳寡糖的遗传修饰的酵母细胞,所述酵母细胞包括一种或多种异源核酸,每种核酸独立编码人乳寡糖生物合成途径的至少一种酶,其中,所述酵母细胞不包括编码岩藻糖激酶的异源核酸。

2. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种异源核酸整合到所述酵母细胞的基因组中。

3. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种人乳寡糖包含2'-岩藻糖基乳糖。

4. 根据权利要求3所述的遗传修饰的酵母细胞,其中由一种或多种异源核酸编码的酶包含GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶和岩藻糖苷酶中的一种或多种。

5. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种人乳寡糖包含3-岩藻糖基乳糖。

6. 根据权利要求5所述的遗传修饰的酵母细胞,其中由一种或多种异源核酸编码的酶包含GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、 $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶和岩藻糖苷酶中的一种或多种。

7. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种人乳寡糖包含乳-N-四糖。

8. 根据权利要求7所述的遗传修饰的酵母细胞,其中由一种或多种异源核酸编码的酶包含 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶、 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶和UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶中的一种或多种。

9. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种人乳寡糖包含乳-N-新四糖。

10. 根据权利要求9所述的遗传修饰的酵母细胞,其中由一种或多种异源核酸编码的酶包含 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶、 $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶和UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶中的一种或多种。

11. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种人乳寡糖包含3'-唾液乳糖。

12. 根据权利要求11所述的遗传修饰的酵母细胞,其中由一种或多种异源核酸编码的酶包含CMP-Neu5Ac合酶、唾液酸合酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向异构酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶和CMP-N-乙酰神经氨酸- $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,3-唾液酸转移酶中的一种或多种。

13. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种人乳寡糖包含6'-唾液乳糖。

14. 根据权利要求13所述的遗传修饰的酵母细胞,其中由一种或多种异源核酸编码的酶包含CMP-Neu5Ac合酶、唾液酸合酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向异构酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶和 $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶中的一种或多种。

15. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述一种或多种人乳寡糖包含二岩藻糖基乳糖。

16. 根据权利要求15所述的遗传修饰的酵母细胞,其中由一种或多种异源核酸编码的酶包含GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶和 $\alpha$ -1,3-岩藻

糖基转移酶中的一种或多种。

17. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中酵母细胞是酿酒酵母,并且其中由一种或多种异源核酸编码的酶进一步包含乳糖通透酶。

18. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述酵母细胞是马克斯克鲁维酵母,其中所述酵母细胞进一步包含编码 $\beta$ -半乳糖苷酶的核酸的至少一部分缺失。

19. 根据权利要求1所述的遗传修饰的酵母细胞,其中一种或多种异源核酸中的至少一种的表达由对小分子作出响应的启动子的活性负调节。

20. 根据权利要求19所述的遗传修饰的酵母细胞,其中所述小分子是麦芽糖或赖氨酸。

21. 一种生产一种或多种人乳寡糖的方法,所述方法包括:

提供能够产生一种或多种人乳寡糖的遗传修饰的酵母细胞群,每个酵母细胞包含一种或多种异源核酸,每种核酸独立编码人乳寡糖生物合成途径的酶;

提供包含蔗糖和乳糖的培养基,其中蔗糖与乳糖的质量比小于40;和

在适合酵母细胞的条件下在培养基中培养酵母细胞以产生一种或多种人乳寡糖。

22. 如权利要求21所述的方法,所述方法还包括:

在培养之前,在包含小分子的生长培养基中生长所述遗传修饰的酵母细胞群,其中所述一种或多种核酸中的至少一种的表达由响应于所述小分子的启动子的活性负性调节,并且其中在培养期间培养基中的小分子的浓度足够低,使得所述启动子不再具有活性。

23. 如权利要求22所述的方法,其中,所述小分子是麦芽糖或赖氨酸。

24. 如权利要求21所述的方法,其中所述遗传修饰的酵母细胞群包含权利要求1所述的酵母细胞。

25. 如权利要求21所述的方法,其中所述一种或多种人乳寡糖包含2'-岩藻糖基乳糖,且其中2'-岩藻糖基乳糖相对于蔗糖的产率大于0.01g/g。

26. 如权利要求21所述的方法,其中所述一种或多种人乳寡糖包含2'-岩藻糖基乳糖,且其中培养基中2'-岩藻糖基乳糖的浓度大于5g/l。

27. 如权利要求21所述的方法,其中所述一种或多种人乳寡糖包含2'-岩藻糖基乳糖,且其中酵母细胞产生少于1克二岩藻糖基乳糖/克产生的2'-岩藻糖基乳糖。

28. 如权利要求21所述的方法,其中,所述培养基不包含岩藻糖。

29. 如权利要求21所述的方法,所述方法还包括:

调节蔗糖与乳糖的质量比,从而改变一种或多种人乳寡糖中至少一种的产量。

30. 一种发酵组合物,其包含:

包含如权利要求1所述的酵母细胞的遗传修饰的酵母细胞群;和

一种培养基,其包含由酵母细胞产生的一种或多种人乳寡糖。

31. 根据权利要求30所述的发酵组合物,其中所述培养基还包含蔗糖和乳糖,且其中蔗糖与乳糖的质量比小于40。

32. 根据权利要求30所述的发酵组合物,其中包含二岩藻糖基乳糖的一种或多种人乳寡糖的摩尔分数小于50%。

33. 如权利要求30所述的发酵组合物,其中,所述培养基不包含岩藻糖。

34. 一种从权利要求30所述的发酵组合物中回收一种或多种人乳寡糖的方法,所述方法包括:

从培养基中分离所述遗传修饰的酵母细胞群的至少一部分;和  
将分离的酵母细胞与加热的含水洗涤液接触;和  
从分离的酵母细胞中移除洗涤液。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述加热的含水洗涤液具有大于48°C的温度。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中所述分离和移除中之一或两者包括离心。

37. 根据权利要求34所述的方法,其中培养基和洗涤液一起包括至少70%质量的一种或多种从酵母细胞产生的人乳寡糖中的至少一种。

38. 一种处理发酵组合物的方法,所述方法包括:

提供包含二岩藻糖基乳糖的发酵组合物;和

在适合催化至少一部分二岩藻糖基乳糖由 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶转化为2'-岩藻糖基乳糖的条件下将发酵组合物与 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶接触。

39. 如权利要求38所述的方法,其中至少20%的二岩藻糖基乳糖由 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶转化。

40. 如权利要求38所述的方法,其中所述发酵组合物是如权利要求30所述的发酵组合物。

## 酵母中化合物的生物合成

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求对2018年11月21日提交的第16/198,545号美国专利申请的优先权,其公开内容全部并入本文。

### 背景技术

[0002] 人乳寡糖(HMO)是人乳中第三大丰富成分,只有乳糖和脂类的浓度更高。人乳寡糖种类多样,迄今为止在人乳中发现了200多种不同的物质。越来越多的证据表明,这些乳化合物对健康有各种益处。典型的益处包括促进保护性肠道微生物(如双歧杆菌)的生长、增强对胃肠道感染的保护、增强免疫系统和改善认知发展。由于HMO不存在于其他奶源,如牛或山羊中,HMO的唯一来源传统上是人乳。为了提高婴儿配方的营养价值,以及探索将HMO作为儿童和成人营养的用途,人们对合成这些化合物越来越感兴趣。本公开就是为了满足这些以及其他需求。

### 发明内容

[0003] 在一个方面中,本发明涉及一种能够产生一种或多种人乳寡糖的遗传修饰的酵母细胞。酵母细胞包含一种或多种异源核酸,其中每种核酸独立地编码人乳寡糖生物合成途径的至少一种酶。酵母细胞不包括编码岩藻糖激酶的异源核酸。在一些实施例中,一种或多种异源核酸整合到酵母细胞的基因组中。

[0004] 在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包含2'-岩藻糖基乳糖。在一些实施例中,由一种或多种异源核酸编码的酶包含GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶和 $\alpha$ 1-3,4-岩藻糖苷酶中的一种或多种。

[0005] 在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包含3-岩藻糖基乳糖。在一些实施例中,由一种或多种异源核酸编码的酶包含GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、 $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶和 $\alpha$ 1-3,4-岩藻糖苷酶中的一种或多种。

[0006] 在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包含乳-N-四糖。在一些实施例中,由一种或多种异源核酸编码的酶包含 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶, $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶和UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶中的一种或多种。

[0007] 在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包含乳-N-新四糖。在一些实施例中,由一种或多种异源核酸编码的酶包含 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶, $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶和UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶中的一种或多种。

[0008] 在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包含3'-唾液乳糖。在一些实施例中,由一种或多种异源核酸编码的酶包含CMP-Neu5Ac合酶、唾液酸合酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向异构酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶和CMP-N-乙酰神经氨酸- $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,3-唾液酸转移酶中的一种或多种。

[0009] 在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包含6'-唾液乳糖。在一些实施例中,由一种或多种异源核酸编码的酶包含CMP-Neu5Ac合酶、唾液酸合酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向

异构酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺二磷酸化酶和 $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶中的一种或多种。

[0010] 在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包含二岩藻糖基乳糖。在一些实施例中,由一种或多种异源核酸编码的酶包含GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶和 $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶中的一种或多种。

[0011] 在一些实施例中,酵母细胞是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),并且由一种或多种异源核酸编码的酶进一步包含乳糖通透酶。在一些实施例中,所述酵母细胞是马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*),其中所述酵母细胞进一步包括编码 $\beta$ -半乳糖苷酶的核酸至少一部分的缺失或与野生型马克斯克鲁维酵母比较降低的 $\beta$ -半乳糖苷酶的表达。

[0012] 在一些实施例中,一种或多种异源核酸中的至少一种的表达由对小分子作出响应的启动子的活性负调节。在一些实施例中,小分子为麦芽糖或赖氨酸。

[0013] 在另一方面,本发明涉及生产一种或多种人乳寡糖的方法。该方法包括提供能够产生一种或多种人乳寡糖的遗传修饰的酵母细胞群体。每个酵母细胞包含一种或多种异源核酸,其中每种核酸独立地编码人乳寡糖生物合成途径的酶。该方法还包括提供包含蔗糖和乳糖的培养基,其中蔗糖与乳糖的质量比小于40。

该方法还包括在适合酵母细胞的条件下在培养基中培养酵母细胞以产生一种或多种人乳寡糖。

[0014] 在一些实施例中,所述方法还包括在培养之前,在包含小分子的生长培养基中生长所述遗传修饰的酵母细胞群,其中所述一种或多种核酸中的至少一种的表达由响应于所述小分子的启动子的活性负性调节,并且其中在培养期间培养基中的小分子的浓度足够低,使得所述启动子不再具有活性。在一些实施例中,小分子为麦芽糖或赖氨酸。

[0015] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞群包含本文公开的任何遗传修饰的酵母细胞。在一些实施例中,一种或多种人乳寡糖包括2'-岩藻糖基乳糖,相对于蔗糖的2'-岩藻糖基乳糖的产率大于0.01g/g。在一些实施例中,培养基中2'-岩藻糖基乳糖的浓度大于5g/l。在一些实施例中,酵母细胞产生少于1g的二岩藻糖基乳糖/克2'-岩藻糖基乳糖。在一些实施方式中,培养基不含岩藻糖。在一些实施例中,该方法还包括调节蔗糖与乳糖的质量比,从而改变一种或多种人乳寡糖中至少一种的产量。

[0016] 在另一方面,本发明涉及发酵组合物。发酵组合物包含遗传修饰的酵母细胞群,其中包含本文公开的任何遗传修饰的酵母细胞。发酵组合物进一步包含培养基,该培养基包含从酵母细胞产生的一种或多种人乳寡糖。

[0017] 在一些实施方式中,培养基还包含蔗糖和乳糖,其中蔗糖与乳糖的质量比小于40。在一些实施例中,包含二岩藻糖基乳糖的一种或多种人乳寡糖的摩尔分数小于50%。在一些实施例中,包含二岩藻糖基乳糖的一种或多种人乳寡糖的摩尔分数大于或等于50%。在一些实施方式中,培养基不含岩藻糖。

[0018] 在另一方面,本公开涉及从本文公开的任何发酵组合物中回收一种或多种人乳寡糖的方法。该方法包括从培养基中分离至少一部分遗传修饰的酵母细胞群。该方法还包括将分离的酵母细胞与加热的含水洗涤液接触。该方法还包括从分离的酵母细胞中移除洗涤液。

[0019] 在一些实施例中,加热的含水洗涤液具有大于48℃的温度。在一些实施例中,分离和移除之一或两者包括离心。在一些实施例中,培养基和洗涤液一起包括至少70%质量的一种或多种从酵母细胞产生的人乳寡糖中的至少一种。

[0020] 在另一方面,本发明涉及处理发酵组合物。该方法包括提供包含二岩藻糖基乳糖的发酵组合物。该方法还包括在适合催化至少一部分二岩藻糖基乳糖由 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶转化为2'-岩藻糖基乳糖的条件下将发酵组合物与 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶接触。

[0021] 在一些实施例中,至少50mol%的二岩藻糖基乳糖由 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶转化。在一些实施例中,发酵组合物是本文公开的任何发酵组合物。

## 附图说明

[0022] 图1给出了由活化的糖形成的人乳寡糖的示意性示例。

[0023] 图2说明了用于形成人乳寡糖的活化的糖的生物合成途径。

[0024] 图3说明了在酿酒酵母中通过岩藻糖接合到乳糖来生物合成2'-岩藻糖基乳糖。

[0025] 图4显示了在乳糖与蔗糖比率增加的培养基中培养时,三种遗传修饰的酵母菌株与基础菌株相比,2'-岩藻糖基乳糖的批次发酵产量增加。

[0026] 图5显示,在乳糖与蔗糖比例增加的培养基中培养的遗传修饰的酵母降低批次发酵生产二岩藻糖基乳糖的生产。

[0027] 图6显示,在乳糖与蔗糖比例增加的培养基中培养的遗传修饰的酵母中,作为总岩藻糖基产物部分的批次发酵生产二岩藻糖基乳糖的生产减少。

[0028] 图7显示了通过用加热的水性洗涤液洗涤培养的酵母来提高2'-岩藻糖基乳糖回收率的图表。

[0029] 图8给出了通过用岩藻糖苷酶处理组合物来提高发酵组合物中2'-岩藻糖基乳糖产量的图。

[0030] 图9展示了使用本文所公开的方法和组合物制备的2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL)、二岩藻糖基乳糖(DFL)、乳-N-新四糖(LNnT)和6'-唾液乳糖(6'-SL)的示例性浓度的图。

## 具体实施方式

### I. 概述

[0031] 本文提供用于从遗传修饰的酵母细胞生产一种或多种人乳寡糖的组合物和方法。人乳寡糖是具有共同二糖乳糖核心的未偶联复合碳水化合物。通过在乳糖中添加的不同键和立体化学的单糖,进一步区分各种各样的人乳寡糖化合物。人乳寡糖中的单糖包括岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac,通常称为唾液酸)。

[0032] 图1示意性地说明了三种人乳寡糖-2'-岩藻糖基乳糖、6'-唾液乳糖和乳-N-四糖的结构,显示了每种寡糖中添加到乳糖的二糖核心中形成完整化合物的组成单糖。从图1的结构可以看出,要产生大范围的人乳寡糖,必须产生上述所有五种单糖的活化形式。五种活化的糖——UDP葡萄糖、UDP半乳糖、UDP-N-乙酰葡萄糖胺、CMP唾液酸和GDP-岩藻糖——与乳糖一起用于衍生所有人乳寡糖。

[0033] 图图2显示了细胞内活化的单糖的合成途径网络。如图所示,微生物(如酿酒酵母)

中活化的糖的生物合成需要酵母固有的代谢步骤(如图2中粗箭头所示)和需要来自其他生物体基因的异源表达的非天然步骤(如图2中的细箭头所示)的组合。因此,在酵母等微生物中生产人乳寡糖至少需要对微生物进行广泛的基因修饰和操作。

[0034] 尽管使用图2所示的途径对人乳寡糖生物合成存在障碍,但没有实用的替代途径可用于商业应用。有些糖,如岩藻糖和唾液酸,在商业上无法获得工业规模所需的数量。此外,合成这些糖的活化形式成本高昂。例如,目前市面上最便宜的GDP-岩藻糖的成本约为73美元/mg。此外,即使这些活化的糖的成本不是一个重要的考虑因素,运送人乳寡糖形成底物的糖通过细胞膜未被了解,或以太低速率发生,无法提供所需的总生产率。

[0035] 常规遗传修饰的微生物已被应用于生产一些人乳寡糖,但这些几乎只使用微生物宿主细胞,如大肠杆菌。虽然已有推测,这些传统的方法可以应用于类似工程改造更具工业吸引力的酵母宿主细胞,但迄今为止,这样做的尝试一直没有成功。迄今为止,目前唯一报道的在酵母中生产人乳寡糖依赖于一种替代合成途径,其中外源岩藻糖必须以培养基组分的形式供应给细胞(Yu等人, *Microb. Cell Fact.* 17:101 (2018))。由于上述原因,这种岩藻糖饲养法不太可能适用于商业或工业用途。

[0036] 本发明人现在发现了特殊的基因修饰和发酵方法,使酵母细胞能够产生多种人乳寡糖。重要的是,这种生产可以在没有外源岩藻糖的情况下进行,并且已经证明具有较高的产量和生产力。具体而言,本文公开的遗传修饰的酵母细胞使用图3中所述的途径来合成活化糖CMP-唾液酸、UDP-葡萄糖、UDP-N-乙酰-葡萄糖胺、UDP-半乳糖和GDP-岩藻糖,以及人乳寡糖,例如2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖,乳-N-新四糖、3'-唾液乳糖和6'-唾液乳糖。有利的是,所提供的酵母细胞可以通过单菌株在单次发酵中产生多种人乳寡糖。此外,发明人已经发现,例如在操作发酵期间,可以通过改变供给酵母培养物的碳源的比率来调节这种共产生的人乳寡糖的相对量。通过使用本文公开的回收方法来获得高百分比的产生的人乳寡糖,实现了其他优点。

## II. 定义

[0037] 本文使用的缩略语具有其化学和生物技术领域中的常规含义。

[0038] 本说明书和所附权利要求书中,单数形式“一”和“所述”包括复数含意,除非另有明确说明。

[0039] 如本文所用,术语“人乳寡糖”指主要或仅在人乳中天然存在的糖分子。

[0040] 本文所用的术语“核酸”或“核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非另有说明,否则具体核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代),等位基因,直系同源物,SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,可通过产生一个或多个选定(或所有)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来获得简并密码子取代形式(Batzer等, *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka等, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); 和Rossolini等, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

[0041] 本文所用的术语“基因”可以表示参与产生或编码多肽链的DNA区段。它可以包括编码区之前和之后的区域(前导区和尾区)以及个体编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。或者,术语“基因”可以表示参与产生或编码非翻译的RNA,如rRNA、tRNA、gRNA或微小RNA的DNA区段。

[0042] 本文所用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。这些术语涵盖任意长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基通过共价肽键相连。

[0043] 本文所用短语“异源性”指通常不天然存在的物质。术语“异源性核酸”指通常不天然存在于给定细胞的核酸。如此,异源性核酸可以是:(a)对其宿主细胞而言是外来的(即,对所述细胞而言为外源性的);(b)天然存在于宿主细胞中(即,内源性),但以不自然量存在于细胞中(即,比宿主细胞中天然存在的量大或少);或(c)天然存在于宿主细胞中但位于其天然基因座外。

[0044] 如本文所用,在将核酸或蛋白质引入宿主细胞的上下文中,术语“引入”指导致宿主细胞内存在异源性核酸或多肽的任何过程。例如,术语包括引入核酸分子(例如,质粒或线性核酸),其编码感兴趣的核酸(例如,RNA分子)或感兴趣的多肽并导致RNA分子的转录和多肽的翻译。该术语还包括将编码RNA分子或多肽的核酸整合到祖细胞的基因组中。然后核酸通过后续世代传递至宿主细胞,从而(例如)将编码RNA引导的内切核酸酶的核酸“预整合(pre-integrate)”到宿主细胞基因组中。在一些情况中,引入指核酸或多肽从宿主细胞外部至宿主细胞内部的易位。考虑了将核酸、多肽和其他生物分子引入宿主细胞的多种方法,包括但不限于,电穿孔,与纳米线或纳米管接触,原生质球化,PEG 1000介导的转化,基因枪,乙酸锂转化,氯化锂转化等。

[0045] 如本文所用,术语“转化”指因为将外源性遗传物质例如核酸引入宿主细胞而导致的宿主细胞的遗传改变。

[0046] 如本文所用,术语“启动子”指可直接转录核酸的核酸控制序列。启动子包括靠近转录起始位点的必需的核酸序列。启动子还任选地包括远端增强子或阻抑物元件,其可位于距转录起始位点多达几千个碱基对处。

[0047] 如本文所用,术语“遗传开关”指允许酶(例如,催化人乳寡糖生物合成途径的反应的酶)的受控表达的一个或多个遗传元件。例如,遗传开关可包括一个或多个可操作地连接到一个或多个编码生物合成酶的基因的启动子,或一个或多个可操作地连接到调控一个或多个生物合成酶的表达的转录调节物的启动子。

[0048] 如本文所用,术语“操作性连接”指核酸序列之间的功能性连接,从而使序列编码所需的功能。例如,当连接的启动子和/或调节区功能性地控制编码序列的表达时,感兴趣基因(例如选择性标志物)的编码序列与其启动子和/或调节序列操作性连接。它还指编码序列之间的连接,从而使它们可以被相同的连接的启动子和/或调节区所控制;编码序列之间的这种连接也可以称为在框内或相同编码框中连接。“操作性连接”还指功能性但非编码序列,如自主繁殖序列或复制起点的连接。当这类序列能够进行其正常功能时,例如,在宿主细胞中能够使携带该序列的载体复制、繁殖和/或分离,这类序列处于操作性连接。

### III. 遗传修饰的酵母

[0049] 本文提供了能够产生一种或多种人乳寡糖的遗传修饰的酵母细胞。酵母细胞包括一种或多种编码人乳寡糖生物合成途径的酶的异源核酸。如图3所示,所提供的酵母细胞的生物合成途径从外部糖(例如葡萄糖或蔗糖)而不是从外部岩藻糖生成GDP岩藻糖。结果,本文公开的遗传修饰的酵母细胞不包括编码岩藻糖激酶的异源核酸,岩藻糖激酶是在将岩藻糖转化为GDP-岩藻糖的替代途径中使用的酶。

[0050] 所提供的遗传修饰的酵母细胞能够产生UDP-葡萄糖人乳寡糖前体。活化的糖UDP-葡萄糖由焦磷酸基、戊糖核糖、葡萄糖和核碱基尿嘧啶组成。UDP-葡萄糖是由酵母细胞天然产生的,其产生水平可随着例如磷酸葡萄糖变位酶-2 (PGM2) 或UTP葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (UGP1) 的过表达而增加。

[0051] 所提供的遗传修饰的酵母细胞能够产生UDP-半乳糖人乳寡糖前体。活化的糖UDP-半乳糖由焦磷酸基、戊糖核糖、半乳糖和核碱基尿嘧啶组成。UDP-半乳糖是由酵母细胞天然产生的,其产生水平可以随着例如UDP-葡萄糖-4-差向异构酶 (GAL10) 的过表达而增加。

[0052] 所提供的遗传修饰的酵母细胞能够产生UDP-N-乙酰基葡萄糖胺人乳寡糖前体。活化的糖UDP-N-乙酰葡萄糖胺由焦磷酸基、戊糖核糖、N-乙酰基葡萄糖胺和核碱基尿嘧啶组成。UDP-N-乙酰葡萄糖胺是由酵母细胞天然产生的,其产生水平可随着例如UDP-N-乙酰葡萄糖胺-二磷酸化酶的表达或例如葡萄糖胺6-磷酸N-乙酰转移酶 (GNA1) 或磷酸乙酰葡萄糖胺变位酶 (PCM1) 的过表达而增加。

[0053] 所提供的遗传修饰的酵母细胞能够产生GDP-岩藻糖人乳寡糖前体。活化的糖GDP-岩藻糖由焦磷酸基、戊糖核糖、岩藻糖和核碱基鸟嘌呤组成。GDP-岩藻糖不是由酵母细胞天然产生的,其生产可以通过引入例如来自大肠杆菌的GDP-甘露糖4,6-脱水酶和例如来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的GDP-L-岩藻糖合酶来实现。

[0054] 所提供的遗传修饰的酵母细胞能够产生CMP-唾液酸人乳寡糖前体。活化的糖CMP-唾液酸由焦磷酸基、戊糖核糖、唾液酸和核碱基胞嘧啶组成。CMP唾液酸不是由酵母细胞天然产生的,其产生可以通过引入例如CMP-Neu5Ac合成酶 (例如来自空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)), 唾液酸合酶 (例如来自空肠弯曲杆菌), 和UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向异构酶 (例如来自空肠弯曲杆菌) 来实现。

[0055] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生2'-岩藻糖基乳糖。除了编码一种或多种上述酶的一种或多种异源核酸外,酵母还可包括编码GDP-甘露糖4,6-脱水酶 (例如来自大肠杆菌), GDP-L-岩藻糖合酶 (例如来自拟南芥),  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶 (例如来自幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)) 和岩藻糖苷酶 (例如 $\alpha$ -1,3-岩藻糖苷酶) 中的一种或多种的一种或多种异源核酸。

[0056] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化GDP-甘露糖转化为GDP-4-脱氢-6-脱氧-D-甘露糖的酶,例如,GDP甘露糖4,6-脱水酶的异源核酸。在一些实施例中,GDP-甘露糖4,6-脱水酶来自大肠杆菌。其他合适的GDP-甘露糖4,6-脱水酶来源包括,但不限于,秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、智人 (*Homo sapien*)、拟南芥、盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*)、小家鼠 (*Mus musculus*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fredii*) HH103、费氏中华根瘤菌NGR234、浮霉菌 (*Planctomycetes bacterium*) RBG\_13\_63\_9、硅杆菌 (*Silicibacter sp.*) TrichH4B、维瓦潘多拉菌 (*Pandora veruacti*)、慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium sp.*) YR681、刺骨鱼菌 (*Epulopiscium sp.*) SCG-B11WGA-EpuloA1、双梳隐杆线虫 (*Caenorhabditis briggsae*)、柯蒂斯菌念珠菌 (*Candidatus*

*Curtissbacteria*) RIFCSLOW02\_12\_FULL\_38\_9、假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) EpS/L25、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium sp.*) KLE 1755、矿井排水宏基因组,硝化刺菌 (*Nitrospira sp.*) SG-bin2、中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*)、杂硅盐矿物节杆菌

(*Arthrobacter siccitolerans*) 和副伯克霍尔德氏菌 (*Paraburkholderia piptadeniae*)。

[0057] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化GDP-4-脱氢-6-脱氧-D-甘露糖转化为GDP-L-岩藻糖的酶,例如,GDP-L-岩藻糖合酶的异源核酸。在一些实施例中,GDP-L-岩藻糖合酶来自拟南芥。其他合适的GDP-L-岩藻糖合酶来源包括(例如)但不限于:小家鼠、大肠杆菌K-12、智人、盐海杆状菌 (*Marinobacter salarius*)、费氏中华根瘤菌 NGR234、日本水稻属 (*Oryza sativa Japonica*)、食铜绿菌迈卡弧菌 (*Micavibrio aeruginosavorus*) ARL-13、柠檬酸杆菌86、婆罗洲猩猩 (*Pongo abelii*)、秀丽隐杆线虫、斯氏假丝酵母 (*Candidatus Staskawiczbacteria bacterium*) RIFCSPHIGH02\_01\_FULL\_41\_41、果蝇、茎瘤固氮根瘤菌 (*Azorhizobium caulinodans*) ORS 571、硝化螺旋念珠菌 (*Candidatus Nitrospira nitrificans*)、象皮病大杆菌 (*Emobacterium elephantis*)、迷踪菌 (*Elusimicrobia bacteria*) RBG\_16\_66\_12、海洋弧菌 (*Vibrio sp.*) JCM 19231、丝状浮丝藻 (*Plankothrix sertta*) PCC 8927、热脱硫弧菌 (*Thermodesulfobacterium sp.*) RBG\_19FT\_COMBO\_42\_12、厌氧弧菌 (*Anaerovibrio sp.*) JC8、盘基网柄菌和中国仓鼠。

[0058] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化GDP-L-岩藻糖和乳糖转化为2'-岩藻糖基乳糖的酶,例如, $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶的异源核酸。在一些实施例中, $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶来自幽门螺杆菌。其他合适的 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶来源包括(例如)但不限于:大肠杆菌、欧洲野猪 (*Sus scrofa*)、智人、绿猴 (*Chlorocebus sabaeus*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*)、西部低地大猩猩 (*Gorilla gorilla gorilla*)、恒河猴 (*Macaca mulatta*)、穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、婆罗洲猩猩 (*Pongo pygmaeus*)、小家鼠、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)、秀丽隐杆线虫、长臂猿 (*Hylobates lar*)、家牛 (*Bos taurus*)、黑掌长臂猿 (*Hylobates agilis*)、褐狐猴 (*Eulemur fulvus*)、肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticus*) ATCC51449、念珠菌 (*Candidata moranbaterium*)、盐浮游假交互单胞菌 (*Pseudoalteromonas haloplanktis*) 和嗜石硫卵菌 (*Sulfurovum lithotrophicum*)。

[0059] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化二岩藻糖基乳糖转化为2'-岩藻糖基乳糖和岩藻糖的酶,例如, $\alpha$ 1-3,4-岩藻糖苷酶的异源核酸。合适的 $\alpha$ 1-3,4-岩藻糖苷酶来源包括例如但不限于多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、双歧双歧杆菌、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*)、产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、解硫胺素类芽孢杆菌 (*Paenibacillus thiaminolyticus*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris pv. campestris*)、拟南芥和褐家鼠。

[0060] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生3'-岩藻糖基乳糖。除了编码一种或多种上述酶的一种或多种异源核酸外,酵母还可包括编码GDP-甘露糖4,6-脱水酶(例如来自大肠杆菌),GDP-L-岩藻糖合酶(例如来自拟南芥), $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶(例如来自幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)) 和岩藻糖苷酶(例如 $\alpha$ -1,2-岩藻糖苷酶)中的一种或多种的一种或多种异源核酸。

[0061] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化GDP-L-岩藻糖和乳糖转化为3-岩藻糖基乳糖的酶,例如, $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶的异源核酸。在一些实施例中, $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶来自幽门螺杆菌。其他合适的 $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶来源包括(例如)但

不限于：智人、大肠杆菌、欧洲野猪 (*Sus scrofa*)、绿猴 (*Chlorocebus sabaeus*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*)、西部低地大猩猩 (*Gorilla gorilla gorilla*)、恒河猴 (*Macaca mulatta*)、穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、婆罗洲猩猩 (*Pongo pygmaeus*)、小家鼠、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)、秀丽隐杆线虫、长臂猿 (*Hylobates lar*)、家牛 (*Bos taurus*)、黑掌长臂猿 (*Hylobates agilis*)、褐狐猴 (*Eulemur fulvus*)、和肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticus*) ATCC 51449。

[0062] 在一些实施例中，遗传修饰的酵母能够产生乳-N-四糖。除了编码上述一种或多种酶的一种或多种异源核酸外，酵母还可以包括编码 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶(例如来自脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*))， $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶(例如来自大肠杆菌)，以及UDP-N-乙酰葡萄糖胺-二磷酸化酶(例如，来自大肠杆菌)中一种或多种的一种或多种异源核酸。

[0063] 在一些实施例中，遗传修饰的酵母细胞包括编码酶的异源核酸，该酶可催化UDP-N-乙酰基- $\alpha$ -D-葡萄糖胺和乳糖转化为乳-N-三糖II和UDP，例如 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶。在一些实施例中，所述 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶来源于脑膜炎奈瑟菌。其他合适的 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶来源包括但不限于拟南芥、停乳链球菌似马亚种 (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*)、大肠杆菌K-12、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PA01、智人、大肠杆菌、小家鼠、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 菌株MC2 155、盘基网柄菌、汉氏葡糖醋杆菌 (*Komagataeibacter hansenii*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) FGSC A4、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 972h、粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) OR74A、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) Af293、玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis*) 521、枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*) 菌株168、褐家鼠、单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) EGD-e、大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)、蓝藻 (*Nostoc* sp.) PCC 7120、嗜盐嗜盐杆菌 (*Haloferax volcanii*) DS2、新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) CB15、鸟分枝杆菌森林亚种 (*Mycobacterium avium* subsp. *Silvaticum*)、酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*)、淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、费氏丙酸杆菌谢氏亚种、(*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*)、大肠杆菌0157:H7，伴放线放线杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、重氮根瘤菌 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) USDA 110，土拉弗朗西斯菌新凶手亚种 (*Francisella tularensis* subsp. *novicida*) U112、木质醋酸菌 (*Komagataeibacter xylinus*)，流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) Rd KW20，具核梭杆菌具核亚种 (*Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*) ATCC 25586、芽孢杆菌噬菌体SPbeta、波萨达斯球孢子菌 (*Coccidioides posadasii*)、欧洲山杨x银白杨 (*Populus tremula* x *Populus alba*)、少孢根霉小孢变种 (*Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*)、副鳃链球菌 (*Streptococcus parasanguinis*)、弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、秀丽隐杆线虫、大麦 (*Hordeum vulgare*)、集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803Kazusa亚株、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、葡萄霜霉病菌 (*Plasmopara viticola*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) RP62A、志贺氏菌噬菌体SfII、质粒pWQ799、禾谷镰刀菌、苜蓿根瘤菌1021、小立碗藓 (*Physcomitrella patens*)、鞘氨醇单胞菌S88、吸水链霉菌井冈亚种 (*Streptomyces*

hygroscopicus subsp.jinggangensis) 5008、果蝇、致病疫霉 (*Phytophthora infestans*)、金黄色葡萄球菌金黄色亚种 (*Staphylococcus aureus* subsp.aureus) Mu50、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、出血败血性巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*)、淋病奈瑟氏菌、杜氏嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)、脑膜炎奈瑟菌和反硝化金氏菌 (*Kingella denitrificans*)。

[0064] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码酶的异源核酸,该酶可催化UDP-半乳糖和乳-N-三糖II转化为乳-N-四糖和UDP,例如 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶。在一些实施例中, $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶来自大肠杆菌。其它合适的 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶来源包括例如且不限于拟南芥、停乳链球菌似马亚种 (*Streptococcus dysgalactiae* subsp.equisimilis)、铜绿假单胞菌PA01、智人、小家鼠、垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 菌株MC2 155、盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*)、汉氏葡糖醋杆菌 (*Komagataeibacter hansenii*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) FGSC A4、粟酒裂殖酵母972h-、粉色面包霉菌 (*Neurospora crassa*) OR74A、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) Af293、玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis*) 521、枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168、褐家鼠、脑膜炎奈瑟氏菌、单核细胞增多性李斯特菌EGD-e、大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)、蓝藻PCC 7120、沃氏盐杆菌 (*Haloferax volcanii*) DS2、新月形杆菌 (*Caulobacter crescentus*) CB15、鸟分枝杆菌森林亚种 (*Mycobacterium avium* subsp.Silvaticum)、酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*)、淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、费氏丙酸杆菌谢氏亚种 (*Propionibacterium freudenreichii* subsp.Shermanii.)、伴放线放线杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、二偶氮高效慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) USDA 110、土拉热弗朗西丝氏菌新凶手亚种 (*Francisella tularensis* subsp.novicida) U112、木质醋酸菌 (*Komagataeibacter xylinus*)、流感嗜血菌Rd KW20、具核梭杆菌具核亚种ATCC 25586、芽孢杆菌噬菌体SPbeta、波萨达斯球孢子菌 (*Coccidioides posadasii*)、欧洲山杨x银白杨 (*Populus tremula* x *Populus alba*)、少孢根霉小孢变种 (*Rhizopus microsporus* var.oligosporus)、副鳃链球菌 (*Streptococcus parasanguinis*)、弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、秀丽隐杆线虫、大麦、集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803Kazusa亚株、无乳链球菌、葡萄霜霉病菌、表皮葡萄球菌RP62A、志贺氏菌噬菌体SfII、质粒pWQ799、禾谷镰刀菌、苜蓿根瘤菌1021、小立碗藓 (*Physcomitrella patens*)、鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.) S88、吸水链霉菌井冈亚种5008、果蝇、致病疫霉、金黄色葡萄球菌金黄色亚种Mu50、产黄青霉和赤拟谷盗。

[0065] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码酶的异源核酸,该酶可催化N-乙酰基- $\alpha$ -D-葡萄糖胺-1-磷酸转化为UDP-N-乙酰基- $\alpha$ -D-葡萄糖胺,例如UDP-N-乙酰基葡萄糖胺-二磷酸化酶。在一些实施例中,UDP-N-乙酰基葡萄糖胺-二磷酸化酶来自大肠杆菌。

[0066] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生乳-N-新四糖。除了编码上述一种或多种酶的一种或多种异源核酸外,酵母还可以包括编码 $\beta$ -1,3-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶(例如来自脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*)),  $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶(例如来自脑膜炎奈瑟氏菌),以及UDP-N-乙酰葡萄糖胺-二磷酸化酶(例如,来自大肠杆菌)中一种或多种的一种或多种异源核酸。

[0067] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码酶的异源核酸,该酶可催化UDP-

半乳糖和乳-N-三糖II转化为乳-N-新四糖和UDP,例如 $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶。在一些实施例中, $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶来自脑膜炎奈瑟氏菌。其它合适的 $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶来源包括例如但不限于智人、淋球菌、流感嗜血菌、阿米巴变形虫拟菌病毒(*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*)、流感嗜血菌Rd KW20、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*) 35000HP、粘膜炎莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、杜克雷[嗜血杆菌]、杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida*) A449、和幽门螺杆菌26695。

[0068] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生3'-唾液乳糖。除了编码一种或多种前述酶的异源核酸外,酵母还可包括编码CMP-Neu5Ac合酶(例如来自空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*))、唾液酸合酶(例如来自空肠弯曲杆菌)、UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向异构酶(例如来自空肠弯曲杆菌)、UDP-N-乙酰葡萄糖胺-二磷酸化酶(例如来自大肠杆菌)和CMP-N-乙酰神经氨酸盐- $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,3-唾液酸转移酶(例如来自脑膜炎奈瑟氏菌MC58)的异源核酸。

[0069] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码酶的异源核酸,该酶可催化UDP-N-乙酰基- $\alpha$ -D-葡萄糖胺转化为N-乙酰基-甘露糖胺和UDP,例如UDP-N-乙酰基葡萄糖胺-2-差向异构酶。在一些实施例中,UDP-N-乙酰基葡萄糖胺2-差向异构酶来自空肠弯曲杆菌。其他合适的UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向异构酶来源包括例如但不限于,智人、褐家鼠、小家鼠、盘基网柄菌、类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)、枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168,脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus kaustophilus*) HTA426,聚球藻CC9311,阿拉斯加鞘膜脓肿RB2256,聚球藻(*Synechococcus* sp.) RS9916,热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*) ATCC 39073,嗜冷杆菌(*Psychrobacter* sp) 1501 (2011),深海王祖农菌(*Zunonwangia profunda*) SM-A87,泉生硫微螺菌(*Thiomicrospira crunogena*) XCL-2,极地杆菌(*Polaribacter* sp.) MED152,坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*) ATCC BAA-1116,砷氧硫单胞菌(*Thiomonas arsenitoxydans*)、维氏硝酸菌(*Nitrobacter winogradskyi*) Nb-255、布鲁克尖头藻(*Raphidiopsis brookii*) D9、嗜热厌氧斜杆菌(*Thermoanaerobacter italicus*) Ab9、海滨玫瑰杆菌(*Roseobacter litoralis*) Och 149、那不勒斯硫杆菌(*Halothiobacillus neapolitanus*) c2、那不勒斯硫杆菌c2、普通类杆菌(*Bacteroides vulgatus*) ATCC 8482、祖深海王祖农菌SM-A87、热醋穆尔氏菌ATCC 39073、多粘芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) E681、裂解烯烃脱硫杆菌(*Desulfatibacillum alkenivorans*) AK-01、磁性磁螺菌(*Magnetospirillum magneticum*) AMB-1、嗜热厌氧斜杆菌 Ab9、多粘菌拟杆菌E681、海洋原绿球藻株MIT 9211、变种罕见小球菌(*Subdoligranulum variabile*) DSM 15176、杀藻科迪亚菌(*Kordia algicida*) OT-1、阿根廷比齐奥氏菌(*Bizionia Agentensis*) JUB59、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*) 92A2、砷氧硫单胞菌、聚球藻BL107、大肠杆菌、坎氏弧菌ATCC BAA-1116,沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) HaA2,海滨玫瑰杆菌Och 149,聚球藻CC9311,变种罕见小球菌(*Subdoligranulum variabile*) DSM 15176,阿根廷比齐奥氏菌JUB59,硒单胞菌(*Selenomonas* sp.) 口腔分类群149菌株67H29BP,普通拟杆菌ATCC 8482,杀藻科迪亚菌OT-1,裂解烯烃脱硫棒菌(*Desulfatibacillum alkenivorans*) AK-01,黄石热脱硫弧菌(*Thermodesulfovibrio yellowstonii*) DSM 11347、七叶脱硫弧菌(*Desulfovibrio aespoensis*) Aspo-2、聚球藻BL107和七叶脱硫弧菌Aspo-2。

[0070] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化N-乙酰基-甘露糖胺和磷酸烯醇式丙酮酸转化为N-乙酰基神经氨糖酸的酶,例如,唾液酸合酶的异源核酸。在一些实施例中,唾液酸合酶来自空肠弯曲杆菌。其他合适的唾液酸合酶来源包括,例如但不限于,智人、地下水元基因组、海洋原绿球藻 (*Prochlorococcus marinus*) 株MIT 9211、世纪红螺菌 (*Rhodospirillum centenum*) SW、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*) SB 1003、少食氨基单胞菌 (*Aminomonas paucivorans*) DSM 12260、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、南极八碳杆菌 (*Octadecabacter antarcticus*) 307、北极八碳杆菌 (*Octadecabacter arcticus*) 238、瘤胃丁酸弧菌 (*Butyrivibrio proteolacticus*) B316、脑膜炎奈瑟菌血清群B和热液海源菌 (*Idiomarina loihiensis*)。

[0071] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化N-乙酰基神经氨糖酸和CTP转化为CMP-N-乙酰基神经氨糖酸的酶,例如,CMP-Neu5Ac合酶的异源核酸。在一些实施例中,CMP-Neu5Ac合酶来自空肠弯曲杆菌。其他合适的CMP-Neu5Ac合酶来源包括(例如)但不限于脑膜炎奈瑟菌、无乳链球菌NEM316、智人、小家鼠、多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、婆罗洲猩猩、斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、家牛、黑腹果蝇和猪链球菌 (*Streptococcus suis*) BM407。

[0072] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化CMP-N-乙酰基神经氨糖酸和乳糖转化成3'-唾液乳糖和CMP的酶,例如,CMP-N-乙酰基神经氨糖酸- $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,3-唾液酸基转移酶的异源核酸。在一些实施例中,CMP-N-乙酰基神经氨糖酸- $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,3-唾液酸基转移酶来自脑膜炎奈瑟氏菌MC58。其它合适的CMP-N-乙酰基神经氨糖酸- $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,3-唾液酸基转移酶包括例如但不限于智人、脑膜炎奈瑟氏菌 $\alpha$ 14,多杀性巴斯德氏菌多杀亚种 (*Pasteurella multocida* subsp. *Multocida*) 菌株Pm70,多杀性巴斯德氏菌、褐家鼠、口腔巴氏杆菌 (*Pasteurella oralis*)、猪放线杆菌 (*Actinobacillus suis*) 和肺蝙蝠粪菌 (*Vespertiliibacter pulmonis*)。

[0073] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生6'-唾液乳糖。除了编码一种或多种前述酶的异源核酸外,酵母还可包括编码CMP-Neu5Ac合酶(例如来自空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*))、唾液酸合酶(例如来自空肠弯曲杆菌)、UDP-N-乙酰葡萄糖胺2-差向异构酶(例如来自空肠弯曲杆菌)、UDP-N-乙酰葡萄糖胺-二磷酸化酶(例如来自大肠杆菌)和 $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶(例如来自发光菌 (*Photobacterium* sp.) JT-ISH-224)中的一种或多种的一种或多种异源核酸。

[0074] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括编码可催化CMP-N-乙酰基神经氨糖酸和乳糖转化成3'-唾液乳糖和CMP的酶,例如, $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,6-唾液酸基转移酶的异源核酸。在一些实施例中, $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶来自发光菌 (*Photobacterium* sp.) JT-ISH-224。其它合适的 $\beta$ -半乳糖酰胺- $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶来源包括例如但不限于智人、美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*)、鳀发光杆菌 (*Photobacterium leiognathi*)、明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) ANT-2200和哈利法克斯施万菌 (*Shewanella halifaxensis*)。

[0075] 在一些实施方式中,遗传修饰的酵母细胞是酿酒酵母。适用于遗传修饰和培养以产生本文所公开的人乳寡糖的酿酒酵母菌株包括但不限于面包酵母、CBS 7959、CBS 7960、CBS 7961、CBS 7962、CBS 7963、CBS 7964、IZ-1904、TA、BG-1、CR-1、SA-1、M-26、Y-904、PE-

2、PE-5、VR-1、BR-1、BR-2、ME-2、VR-2、MA-3、MA-4、CAT-1、CB-1、NR-1、BT-1、CEN.PK、CEN.PK2和AL-1。在一些实施例中,宿主细胞是从PE-2、CAT-1、VR-1、BG-1、CR-1和SA-1组成的组中选择的酿酒酵母菌株。在某些方面,酿酒酵母的菌株是PE-2。在某些方面,酿酒酵母的菌株是CAT-1。在某些方面,酿酒酵母的菌株是BG-1。

[0076] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞是酿酒酵母,并且除了编码一种或多种前述酶的异源核酸之外,酵母还可以包括编码乳糖转运体的异源核酸。在一些实施例中,乳糖转运体是乳糖通透酶,例如,来自如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)的LAC12。其它合适的乳糖通透酶来源包括例如但不限于树干毕赤酵母(*Scheffersomyces stipitis*)、延缓曲霉(*Aspergillus lentulus*)、小巢状麹菌(*Emericella nidulans*)、长子假花耳(*Dacryopinax primogenitus*)、小麦兜铃(*Microdochium bolleyi*)、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)、罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)、深海来源真菌(*Phialocephala*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria parva*)、可可链疫孢荚腐病菌(*Moniliophthora roreri*)、玫烟色虫草(*Cordyceps fumosorosea*)、色二孢(*Diplodia seriata*)、红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)、粗壮脉纹孢菌(*Neurospora crassa*)和马克斯克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces marxianus*)。

[0077] 在一些实施方式中,遗传修饰的酵母细胞是马克斯克鲁维酵母菌。马克斯克鲁维酵母菌具有耐高温、耐酸、天然摄取乳糖、生长速度快等优点。有益的是,这种酵母在遗传上与酿酒酵母非常相似,因此可以在这两种酵母中使用相似或相同的启动子和密码子优化基因。此外,由于马克斯克鲁维酵母具有天然乳糖通透酶,因此不必引入异源核酸来引入该功能。在一些实施例中,在遗传修饰的酵母中,至少一部分的乳糖代谢所需的 $\beta$ -半乳糖苷酶基因(LAC4)是缺失的。因此,修饰的马克斯克鲁维酵母菌株能够在不消耗乳糖的情况下导入乳糖。在一些实施例中,与野生型马克斯克鲁维酵母中的表达相比,遗传修饰的酵母中 $\beta$ -半乳糖苷酶基因表达量降低。因此,修饰的马克斯克鲁维酵母菌株减少了引入的乳糖的消耗。

[0078] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞包括调控一种或多种异源核酸中至少一种的表达和/或稳定性的启动子。在某些方面,所述启动子负调控所述至少一种异源核酸的表达和/或稳定性。该启动子可对可存在于用于经修饰的酵母发酵的培养基中的小分子产生响应。在一些实施例中,小分子为麦芽糖或其类似物或衍生物。在一些实施例中,小分子为赖氨酸或其类似物或衍生物。麦芽糖和赖氨酸可以作为小分子的有吸引力的选择,因为它们相对便宜、无毒和稳定。

[0079] 本文公开的酵母细胞可经基因工程改造以包含一种或多种上述修饰,例如,一种或多种编码生物合成途径酶的异源核酸,例如,用于生产一种或多种人乳寡糖。异源性酶在宿主细胞中的表达可通过在允许在宿主细胞中表达的调控元件的控制下将包含编码该酶的核苷酸序列的核酸引入宿主细胞来实现。在一些实施方式中,核酸分子是染色体外质粒。在其它实施例中,核酸是可将核苷酸序列整合到宿主细胞染色体中的染色体整合载体。

[0080] 在一些实施例中,通过使用缺口修复分子生物学技术将一种或多种异源核酸引入到遗传修饰的酵母细胞中。在这些方法中,如果酵母具有非同源末端连接(NHEJ)活性,如马克斯克鲁维酵母的情形,则可以通过多种方式中的任何一种首先破坏酵母中的NHEJ活性。与通过缺口修复对酵母细胞进行遗传修饰相关的进一步细节可在美国专利号9,476,065中找到,出于所有目的,通过引用将其全部公开并入本文。

[0081] 在一些实施例中,通过使用能够在所选核酸靶位点内的指定区域引起断裂的一种或多种位点特异性核酸酶将所述一种或多种异源核酸引入所述遗传修饰的酵母细胞。此类核酸酶的例子包括但不限于核酸内切酶、位点特异性重组酶、转座酶、拓扑异构酶、锌指核酸酶、TAL效应物DNA结合域-核酸酶融合蛋白(TALEN)、CRISPR/Cas相关的RNA向导核酸内切酶和大范围核酸酶。与通过位点特异性核酸酶活性对酵母细胞进行遗传修饰相关的进一步细节可在美国专利号9,476,065中找到,出于所有目的,通过引用将其全部公开并入本文。

[0082] 本文所描述的是在本发明的方法、组合物和生物体中有用的特定基因和蛋白质;然而,人们将认识到,这种基因的绝对相同性是不必要的。例如,可在包含编码多肽或酶的序列的特定基因或多核苷酸中进行改变并筛选活性。典型的这种改变包括保守突变和沉默突变。可以使用本领域已知的方法筛选这种修饰或突变的多核苷酸和多肽用于表达功能酶。由于遗传密码的固有简并性,编码基本相同或功能等效的多肽的其他多核苷酸也可用于克隆和表达编码这种酶的多核苷酸。

[0083] 如本领域技术人员将理解的,修饰编码序列以增强其在特定宿主中的表达是有利的。遗传密码有64个可能的密码子,但大多数生物通常使用这些密码子的一个子集。在一物种中最常使用的密码子被称为最优密码子,而那些不常使用的密码子被归类为稀有或低使用密码子。密码子可以被取代以反映宿主的优选密码子使用,这一过程有时被称为“密码子优化”或“控制物种密码子偏向”。

[0084] 例如,可制备含有特定原核或真核宿主优选密码子的优化编码序列(Murray等人,1989,Nucl Acids Res.17:477-508),与非优化序列产生的转录物相比提高翻译速率或产生具有期望特性(例如更长半衰期)的重组RNA转录物。也可以修饰翻译终止密码子以反映宿主偏好。例如,酿酒酵母和哺乳动物的典型终止密码子分别是UAA和UGA。单子叶植物的典型终止密码子是UGA,而昆虫和大肠杆菌通常使用UAA作为终止密码子(Dalphin等人,1996,Nucl Acids Res.24:216-8)。

[0085] 本领域技术人员将认识到,由于遗传密码的简并性,在其核苷酸序列中不同的各种DNA分子可用于编码本发明中特定的酶。编码上述生物合成酶的天然DNA序列在本文中作为参考,仅为了说明本发明的实施例,并且本公开包括编码本发明方法中所使用酶的多肽和蛋白质的氨基酸序列的任何序列的DNA分子。以类似的方式,多肽通常可以耐受其氨基酸序列中的一个或多个氨基酸取代、缺失和插入而不丢失或显著丢失所需活性。本发明包括具有不同于本文所述特定蛋白质的氨基酸序列的这种多肽,只要修饰的或变异的多肽具有参考多肽的酶促合成代谢或分解代谢活性。此外,由本文所示的DNA序列编码的氨基酸序列仅说明本发明的实施例。

[0086] 此外,用于本文所提供的组合物和方法的酶的同源物包含在本发明中。在一些实施例中,当氨基酸序列具有至少约30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性时,两种蛋白质(或蛋白质的区域)基本上是同源的。为了确定两条氨基酸序列或两条核酸序列的百分比相同性,可以为了最佳比较目的而对序列进行比对,例如,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两条中引入缺口以达到最佳对齐,并且出于比较目的可以不考虑非同源序列。在一个实施例中,为比较目的对齐的参考序列的长度为参考序列长度的至少30%、通常至少40%、更典型至少50%、甚至更典型至少60%、甚至更典型至少70%、80%、90%、100%。然

后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的(如本文所用,氨基酸或核酸的“相同性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。考虑到用于两个序列的最佳比对而需要引入的缺口数和每个缺口的长度,两条序列之间的百分比相同性与序列共有相同位置的数目相关。

[0087] 当“同源”用于蛋白质或肽时,认识到不相同的残基位置通常因保守的氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被另一个具有类似化学性质(例如电荷或疏水性)的侧链(R基团)的氨基酸残基取代。一般来说,保守氨基酸取代不会实质性地改变蛋白质的功能特性。在两条或两条以上氨基酸序列通过保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列的同一性百分数或同源程度,以纠正取代的保守性质。进行该调整的方法为本领域技术人员所熟知(参见,例如Pearson W.R.,1994,Methods in Mol.Biol.25:365-89)。

[0088] 以下六组每组含有相互保守取代的氨基酸:1) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V),和6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0089] 多肽的序列同源性,也称为序列同源性百分比,通常使用序列分析软件进行测量。将一种分子序列与一个包含大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较的典型算法是计算机程序BLAST。在搜索包含来自大量不同生物体的序列的数据库时,通常会比较氨基酸序列。

[0090] 此外,编码上述酶的任何基因(或本文提及的任何其它基因(或控制或调节其表达的任何调控元件))可通过本领域普通技术人员已知的遗传/蛋白质工程改造技术(例如定向进化或合理突变)来优化。这种作用允许本领域普通技术人员针对酵母中表达和活性优化酶。

[0091] 此外,编码这些酶的基因可以从其他真菌和细菌物种中鉴定出来,并且可以表达以调节这一途径。多种生物体可以作为这些酶的来源,包括但不限于酵母(*Saccharomyces* spp.),包括酿酒酵母和葡萄汁酵母(*S.uvarum*),克鲁维酵母(*Kluyveromyces* spp.),包括耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*),乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)和马克斯克鲁维酵母,毕赤酵母(*Pichia* spp.),汉逊酵母(*Hansenula* spp.),包括多形汉逊酵母(*H.polymorpha*),假丝酵母(*Candida* spp.),毛孢子菌(*Trichosporon* spp.),接合糖酵母(*Yamadazyma* spp.),包括具柄接合糖酵母(*Y.spp.Stipitis*),比勒陀利亚有孢酵母(*Torulaspora pretoriensis*),东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*),裂殖酵母(*Schizosaccharomyces* spp.),包括粟酒裂殖酵母(*S.pombe*),隐球菌(*Cryptococcus* spp.),曲霉(*Aspergillus* spp.),脉孢菌(*Neurospora* spp.)或黑粉菌(*Ustilago* spp.)。厌氧真菌的基因来源包括但不限于:梨囊鞭菌(*Piromyces* spp.)、根囊鞭菌(*Orpinomyces* spp.)或新美鞭菌(*Neocalimastix* spp.)。有用的原核酶的来源包括但不限于大肠杆菌、运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌、梭菌、棒杆菌(*Corynebacterium* spp.)、假单胞菌、乳球菌、肠杆菌、沙门氏菌或红发夫酵母(*Xdendrorhous*)。

[0092] 本领域技术人员已知的技术可适于识别额外的同源基因和同源酶。一般来说,可

以通过功能分析来鉴定类似的基因和/或类似的酶,并且具有功能上的相似性。本领域技术人员已知的技术可适于识别类似的基因和类似的酶。技术包括但不限于,通过使用基于感兴趣的基因/酶的公开序列的引物进行PCR来克隆基因,或通过使用设计用于扩增感兴趣的基因之间的保守区域的简并引物的简并PCR来克隆基因。此外,本领域技术人员可以使用技术来鉴定具有功能同源性或相似性的同源或类似基因、蛋白质或酶。技术包括通过对所述活性进行体外酶测定来检查细胞或细胞培养物中酶的催化活性,例如,如本文或Kiritani, K., 支链氨基酸方法,酶学 (Branched-Chain Amino Acids Methods Enzymology), 1970中所述;然后通过纯化分离出具有上述活性的酶;通过Edman降解等技术测定酶的蛋白质序列;对可能的核酸序列设计PCR引物;通过PCR扩增所述DNA序列;以及克隆所述核酸序列。为了识别同源或相似基因和/或同源或相似酶,合适的技术还包括将有关候选基因或酶的数据与诸如BRENDA、KEGG或MetaCYC等数据库进行比较。根据本文的教导,可在上述数据库中识别候选基因或酶。

#### IV. 生产人乳寡糖的方法

[0093] 本文还提供了制备一种或多种人乳寡糖的方法。该方法包括提供能够产生一种或多种人乳寡糖的遗传修饰的酵母细胞群体。群体的每个酵母细胞包括一种或多种编码人乳寡糖生物合成途径的酶的异源核酸。在一些实施例中,群体包括如本文所公开的和上文所讨论的任何酵母细胞。该方法还包括提供培养基,并在适合酵母细胞的条件下在培养基中培养酵母细胞以产生一种或多种乳寡糖。

[0094] 培养可以在合适容器,包括但不限于细胞培养板、培养瓶或发酵罐中合适的培养基中进行。可使用任何合适的发酵罐,包括但不限于搅拌罐发酵罐、气升式发酵罐、气泡发酵罐或其任何组合。在利用酿酒酵母作为宿主细胞的特定实施例中,菌株可在发酵罐中生长,如Kosaric等人在《Ullmann工业化学大全》(Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry), 第六版,第12卷398-473页, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 德国因海姆中详细描述的那样。此外,所述方法可以本领域已知的任何规模的发酵来执行,以支持微生物产品的工业生产。用于细胞培养物维持或生长的材料和方法为微生物学或发酵学领域的技术人员所熟知(参见,例如, Bailey等,《生物化学工程基础》(Biochemical Engineering Fundamentals), 第二版, McGraw Hill出版社, 纽约, 1986)。取决于宿主细胞、发酵和工艺的具体要求,必须要考虑合适的培养基, pH, 温度以及对有氧、微氧或厌氧条件的需求。

[0095] 在一些实施方式中,培养进行足以使转化的群体经历多次加倍的一段时间,直到达到所需的细胞密度。在一些实施方式中,培养进行一段时间,所述一段时间足以使宿主细胞群在进行培养的发酵罐或容器中达到0.01至400之间的细胞密度( $OD_{600}$ )。可进行培养直到细胞密度例如在0.1与14之间、0.22与33之间、0.53与76之间、1.2与170之间或2.8与400之间。在上限方面,可以进行培养直到细胞密度不超过400,例如不超过170、不超过76、不超过33、不超过14、不超过6.3、不超过2.8、不超过1.2、不超过0.53或不超过0.23。就下限而言,可进行培养直到细胞密度大于0.1,例如大于0.23、大于0.53、大于1.2、大于2.8、大于6.3、大于14、大于33、大于76或大于170。也考虑更高的细胞密度(例如,大于400)和更低的细胞密度(例如,小于0.1)。

[0096] 在其他实施例中,培养进行一段时间,例如,在12小时至92小时之间,例如12小时至60小时、20小时至68小时、28小时至76小时、36小时至84小时之间、或44小时至92小时之

间。在一些实施例中,培养进行一段时间,例如,在5天和20天之间,例如,在5天和14天之间,在6.5天和15.5天之间,在8天和17天之间,在9.5天和18.5天之间,或在11天和20天之间。就上限而言,培养时间可少于20天,如少于18.5天、少于17天、少于15.5天、少于14天、少于12.5天、少于11天、少于9.5天、少于8天、少于6.5天、少于5天、少于92小时、少于84小时、少于76小时,少于68小时、少于60小时、少于52小时、少于44小时、少于36小时、少于28小时或少于20小时。就下限而言,培养时间可以大于12小时,如大于20小时、大于28小时、大于36小时、大于44小时、大于52小时、大于60小时、大于68小时、大于76小时、大于84小时、大于92小时、大于5天,大于6.5天、大于8天、大于9.5天、大于11天、大于12.5天、大于14天、大于15.5天、大于17天或大于18.5天。也考虑更长的培养时间(例如大于20天)和更短的培养时间(例如小于5小时)。

[0097] 在某些实施例中,通过诱导化合物可诱导遗传修饰的酵母群体产生一种或多种人乳寡糖。在没有诱导化合物的情况下,可很容易地操纵这种酵母。然后添加诱导化合物以诱导酵母产生人乳寡糖。在其它实施例中,通过改变培养条件(例如,生长温度、培养基成分等)可诱导酵母产生一种或多种人乳寡糖。

[0098] 在某些实施例中,在生产阶段添加诱导剂以激活启动子或减少生物合成途径相关的转录调节物的抑制以促进人乳寡糖生产。在某些实施例中,在构建阶段添加诱导剂,以抑制启动子或激活与生物合成途径相关联的转录调节剂,以抑制人乳寡糖的产生,并且在生产阶段移除诱导剂,以激活启动子以减轻转录调节剂的抑制,以促进人乳寡糖的产生。术语“遗传开关”在本文中用于指使用启动子或其他遗传元件来控制一种或多种人乳寡糖的生物合成途径的激活或去激活。有用的诱导剂或遗传开关的示例在例如PCT申请公开号W02015/020649、W02016/210343和W020160210350中进行了说明,这些公开通过引用完整地并入本文。

[0099] 如上所述,在一些实施例中,提供的遗传修饰的酵母细胞包括调控一种或多种异源核酸中至少一种的表达和/或稳定性的启动子。因此,在某些实施例中,启动子可用于控制基因表达的时间和/或蛋白质的稳定性,例如,用于在发酵期间在遗传修饰的酵母细胞中产生人乳寡糖的生物合成途径的酶。

[0100] 在一些实施例中,当在小分子(例如,至少约0.1%麦芽糖或赖氨酸)存在下进行遗传修饰的酵母细胞的发酵时,人乳寡糖的生产显著减少或被关闭。当发酵培养基中的小分子量减少或消除时,人乳寡糖生产就会打开或增加。这种系统能够利用发酵培养基中所选择的小分子的存在或浓度作为产生非分解代谢(例如人乳寡糖)化合物的开关。控制非分解代谢化合物生产的时机,使其仅在需要生产时发生,从而将非生产阶段的碳通量重新定向为细胞维持和生物质。这种碳的更高效利用可以大大减轻宿主细胞的代谢负担,改善细胞生长,增加异源基因的稳定性,减少菌株退化,和/或有助于改善细胞的整体健康和生存能力。

[0101] 在一些实施例中,发酵方法包括两步过程,其利用小分子作为开关来实现“关”和“开”阶段。在第一步,即“构建”阶段,即不需要生产化合物的步骤(a),在包含小分子的生长或“构建”培养基中培养遗传修饰的酵母,小分子的量足以在响应性启动子的控制下诱导基因的表达,诱导的基因产物对非分解代谢化合物的产生起到负调控作用。在麦芽糖响应性启动子或赖氨酸响应性启动子控制下对融合DNA构建体进行转录后,对融合蛋白的稳定性

进行翻译后控制。在第二步骤,即“生产”阶段的步骤(b)中,在包含碳源的培养基中进行发酵,其中小分子不存在或以足够低的量存在,使得响应性启动子的活性降低或失活并且融合蛋白去稳定。结果,宿主细胞的异源非分解代谢化合物生产被开启或增加。

[0102] 在其它实施例中,响应性启动子可操作地连接到编码人乳寡糖途径的一种或多种酶的一种或多种异源核酸。培养基中活化量小分子的存在增加生物合成途径中一种或多种酶的表达。在这些实施例中,培养基中存在足量的麦芽糖或赖氨酸将增加生物合成途径的一种或多种酶的表达,并且融合酶在小分子存在下稳定。

[0103] 在一些实施例中,培养基是任何培养基,其中能够产生人乳寡糖的遗传修饰的酵母能够适应,即维持生长和活力。在一些实施方式中,培养基是包含可同化的碳、氮和磷酸盐/酯源的水性培养基。这类培养基还可以包括适当的盐,矿物质,金属和其他营养物。在一些实施例中,碳源和每种必需细胞营养素以递增或连续方式添加到发酵培养基中,并且每种必需营养素基本上保持在生长细胞有效同化所需的最低水平,例如,根据基于将碳源转化为生物质的细胞的代谢或呼吸功能的预定细胞生长曲线。

[0104] 在另一实施例中,生产人乳寡糖的方法包括在单独的构建和生产培养基中培养宿主细胞。例如,所述方法可包括在构建阶段培养所述遗传修饰的宿主细胞,其中所述细胞在非生产条件(例如,非诱导条件)下培养以产生接种物,然后将接种物在适合诱导人乳寡糖产生的条件(例如诱导条件)下转移到第二发酵培养基中,并在第二发酵阶段保持稳定状态以产生含有人乳寡糖的细胞培养物。

[0105] 在一些实施例中,培养基包含蔗糖和乳糖。在一些实施例中,培养基中的碳源基本上由蔗糖和乳糖组成。在一些实施例中,培养基中的碳源由蔗糖和乳糖组成。在一些实施例中,选择蔗糖与乳糖的质量比以影响、调节或控制由酵母细胞产生的人乳寡糖的相对生产速率。以这种方式控制所生产的人乳寡糖的组成可有利地允许增加所需产物、减少不需要的产物、靶向所需产物比率,以及简化下游产物的分离过程。

[0106] 培养基中蔗糖与乳糖的质量比可为,例如,4与40之间,例如,4与25.6之间,7.6与29.2之间,11.2与32.8之间,14.8与36.4之间,或18.4与40之间。就上限而言,蔗糖与乳糖的质量比可以小于40,如小于36.4、小于32.8、小于29.2、小于25.6、小于22、小于18.4、小于14.8、小于11.2或小于7.6。就下限而言,蔗糖与乳糖的质量比可大于4,例如,大于7.6、大于11.2、大于14.8、大于18.4、大于22、大于25.6、大于29.2、大于32.8或大于36.4。也考虑更高的比例(例如,大于40)和更低的比例(例如,小于4)。

[0107] 可在适当培养基中使用的可同化氮源包括但不限于简单氮源、有机氮源和复合氮源。这些氮源包括无水氨、铵盐和动物、植物和/或微生物来源的物质。合适的氮源包括但不限于蛋白质水解物、微生物物质水解物、蛋白胨、酵母提取物、硫酸铵、尿素和氨基酸。通常,培养基中氮源的浓度大于约0.1g/L,优选大于约0.25g/L,且更优选大于约1.0g/L。在一些实施例中,向培养基中添加超过一定浓度的氮源对酵母的生长不利。结果,培养基中氮源的浓度可小于约20g/L,例如,小于约10g/L或小于约5g/L。此外,在某些情况下,可能需要允许培养基在培养期间耗尽氮源。

[0108] 有效培养基可含有无机盐、维生素、痕量金属或生长促进剂等其他化合物。此类其它化合物也可存在于有效培养基中的碳、氮或矿物质源中,或可特别添加到培养基中。

[0109] 培养基也可以含有合适的磷酸盐源。此类磷酸盐源包括无机磷酸盐源和有机磷酸

盐源。优选磷酸盐来源包括但不限于磷酸盐,例如磷酸氢二钠和钾、磷酸二氢钠和钾、磷酸铵及其混合物。通常,培养基中的磷酸盐浓度大于约1.0g/L,例如大于约2.0g/L或大于约5.0g/L。在一些实施例中,向培养基中添加超过一定浓度的磷酸盐对酵母的生长不利。因此,培养基中的磷酸盐浓度可小于约20g/L,例如小于约15g/L或小于约10g/L。

[0110] 合适的培养基还可以包括镁源,优选地以生理上可接受的盐的形式,例如七水硫酸镁,尽管可以使用具有类似量镁的浓度的其他镁源。通常,培养基中的镁浓度大于约0.5g/L,例如大于约1.0g/L或大于约2.0g/L。在一些实施例中,向培养基中添加超过一定浓度的镁对酵母的生长不利。因此,培养基中的镁浓度可小于约10g/L,例如,小于约5g/L或小于约3g/L。此外,在某些情况下,可能需要允许培养基在培养期间耗尽镁源。

[0111] 在一些实施例中,培养基还可包括生物上可接受的螯合剂,例如柠檬酸三钠的二水合物。在此实例中,培养基中螯合剂的浓度可大于约0.2g/L,例如大于约0.5g/L或大于约1g/L。在一些实施例中,向培养基中添加超过一定浓度的螯合剂对酵母的生长不利。因此,培养基中螯合剂的浓度可小于约10g/L,例如小于约5g/L或小于约2g/L。

[0112] 培养基也可最初包括生物上可接受的酸或碱以维持培养基的所需pH。生物上可接受的酸包括但不限于盐酸、硫酸、硝酸、磷酸及其混合物。生物上可接受的碱包括但不限于氢氧化铵、氢氧化钠、氢氧化钾及其混合物。在一些实施方式中,所用的碱是氢氧化铵。

[0113] 培养基还可以包括生物学上可接受的钙源,包括但不限于氯化钙。通常,培养基中的钙源,如氯化钙二水合物的浓度在约5mg/L至约2000mg/L之间,例如,在约20mg/L至约1000mg/L的范围内,或在约50mg/L至约500mg/L的范围内。

[0114] 培养基还可包括氯化钠。通常,培养基中的氯化钠的浓度在约0.1g/L至约5g/L之间,例如,在约1g/L至约4g/L的范围内,或在约2g/L至约4g/L的范围内。

[0115] 在一些实施例中,培养基还可包括痕量金属。这种痕量金属可以作为储液添加到培养基中,为方便起见,储液可以与培养基的其余部分分开制备。通常,添加到培养基中的这种痕量金属溶液的量大于约1ml/L,例如,大于约5ml/L,更优选大于约10ml/L。在一些实施例中,向培养基中添加超过一定浓度的痕量金属对酵母的生长不利。因此,添加到培养基中的这种痕量金属溶液的量可小于约100ml/L,例如,小于约50ml/L或小于约30ml/L。应当注意的是,除了在储液中添加痕量金属之外,还可以单独添加各种组分,每种组分都在与上述痕量金属溶液范围所规定的组分量相独立对应的范围内。

[0116] 培养基可包括其他维生素,例如泛酸盐、生物素、钙、肌醇、盐酸吡哆醇、盐酸硫胺及其组合。此类维生素可作为储液添加到培养基中,为方便起见,该储液可与培养基的其余部分分开制备。在一些实施例中,向培养基中添加超过一定浓度的维生素对酵母的生长不利。

[0117] 本文所述的发酵方法可以在传统培养模式下进行,包括但不限于分批、分批补料、细胞循环、连续和半连续。在一些实施方式中,发酵以分批补料模式进行。在这种情况下,培养基的一些组分在培养期间耗尽,例如在发酵的生产阶段。在一些实施例中,培养物可在例如生产阶段的开始时用相对高浓度的此类组分补充,以便在需要添加之前在一段时间内支持生长和/或人乳寡糖生产。当培养物耗尽时,可以通过添加来保持这些组分的优选范围。培养基中组分的水平可通过例如定期对培养基采样和浓度测定来监测。或者,一旦制定了标准培养程序,就可以在整个培养以一定时间间隔内按照已特定时间的已知水平进行添

加。如本领域普通技术人员将认识到的,在培养期间,随着培养基的细胞密度的增加,营养素的消耗率增加。此外,为了避免将外来微生物引入培养基中,可以使用本领域已知的无菌添加方法进行添加。另外,培养过程中可加入少量消泡剂。

[0118] 培养基的温度可以是适合于遗传修饰的酵母群生长和/或一种或多种人乳寡糖生产的任何温度。例如,在用接种物接种培养基之前,可使培养基达到并保持在20℃至约45℃左右的温度范围内,例如,至温度范围约为25℃至约40℃或约28℃至约32℃。

[0119] 可通过向培养基中添加酸或碱来控制培养基的pH值。在这种情况下,当使用氨来控制pH值时,其也方便地用作培养基中的氮源。在一些实施例中,pH值保持在约3.0到约8.0之间,例如,从约3.5到约7.0或从约4.0到约6.5。

[0120] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生2'-岩藻糖基乳糖。培养基中产生的2'-岩藻糖基乳糖的浓度可在例如5g/l与40g/l之间,例如5g/l与26g/l之间,8.5g/l与29.5g/l之间,12g/l与33g/l之间,15.5g/l与36.5g/l之间,或19g/l与40g/l之间。就上限而言,2'-岩藻糖基乳糖浓度可大于5g/l,例如,大于8.5g/l、大于12g/l、大于15.5g/l、大于19g/l、大于22.5g/l、大于26g/l、大于29.5g/l、大于33g/l或大于36.5g/l。也可考虑更高的浓度,例如,大于40g/l。

[0121] 培养基中产生的相对于蔗糖的2'-岩藻糖基乳糖的产量可在例如0.01g/g与0.1g/g之间,例如0.01g/g与0.064g/g之间,0.019g/g与0.073g/g之间,0.028g/g与0.082g/g之间,0.037g/g与0.091g/g之间,或0.046g/g与0.1g/g之间。就下限而言,相对于蔗糖的2'-岩藻糖基乳糖的产率可大于0.01g/g,例如大于0.019g/g、大于0.028g/g、大于0.037g/g、大于0.046g/g、大于0.055g/g、大于0.064g/g、大于0.073g/g、大于0.082g/g或大于0.091g/g。还设想了更高的产率,例如大于0.1g/g。

[0122] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生二岩藻糖基乳糖。培养基中产生的二岩藻糖基乳糖的浓度可在例如5g/l与40g/l之间,例如5g/l与26g/l之间,8.5g/l与29.5g/l之间,12g/l与33g/l之间,15.5g/l与36.5g/l之间,或19g/l与40g/l之间。就上限而言,2'-岩藻糖基乳糖浓度可大于5g/l,例如,大于8.5g/l、大于12g/l、大于15.5g/l、大于19g/l、大于22.5g/l、大于26g/l、大于29.5g/l、大于33g/l或大于36.5g/l。也可考虑更高的浓度,例如,大于40g/l。

[0123] 在一些实施例中,希望将遗传修饰的酵母细胞产生的二岩藻糖基乳糖的量相对于产生的2'-岩藻糖基乳糖的量最小化。酵母细胞产生的二岩藻糖基乳糖的质量/克酵母细胞产生的2'-岩藻糖基乳糖可在例如0.2克和4.2克之间,例如0.2克和2.6克之间,0.6克和3克之间,1克和3.4克之间,1.4克和3.8克之间,或1.8克和4.2克之间。就上限而言,产生的二岩藻糖基乳糖的质量/克2'-岩藻糖基乳糖可小于4.2克,例如,小于3.8克、小于3.4克、小于3克、小于2.6克、小于2.2克、小于1.8克、小于1.4克、小于1克、小于0.6克或小于0.2克。就下限而言,产生的二岩藻糖基乳糖的质量/克2'-岩藻糖基乳糖可大于0.2克,例如,大于0.6克、大于1克、大于1.4克、大于1.8克、大于2.2克、大于2.6克、大于3克、大于3.4克或大于3.8克。也可考虑更高的质量比(例如,大于4.2g/g)和更低的质量比(例如,小于0.2g/g)。

[0124] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞能够产生乳-N-四糖。培养基中所产生的乳-N-四糖的浓度例如可在0.5g/l与8g/l之间,例如在0.5g/l与2.6g/l之间,在0.7g/l与3.5g/l之间,在0.9g/l与4.6g/l之间,在1.1g/l与6.1g/l之间,或在1.5g/l与8g/l之间。就

上限而言,乳-N-四糖浓度可大于0.5g/l,例如,大于0.7g/l、大于0.9g/l、大于1.1g/l、大于1.5g/l、大于2g/l、大于2.6g/l、大于3.5g/l、大于4.6g/l或大于6g/l。也可考虑更高的浓度,例如大于8g/l。

[0125] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞能够产生乳-N-新四糖。培养基中所产生的乳-N-新四糖的浓度例如可在0.5g/l与30g/l之间,例如在0.5g/l与5.8g/l之间,在0.8g/l与8.8g/l之间,在1.1g/l与13g/l之间,在1.7g/l与20g/l之间,或在2.6g/l与30g/l之间。就上限而言,乳-N-新四糖浓度可大于0.5g/l,例如,大于0.8g/l、大于1.1g/l、大于1.7g/l、大于2.6g/l、大于3.9g/l、大于5.8g/l、大于8.8g/l、大于13g/l或大于20g/l。也可考虑更高的浓度,例如,大于30g/l。

[0126] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生3-岩藻糖基乳糖。培养基中产生的3-岩藻糖基乳糖的浓度可在例如0.05g/l与0.8g/l之间,例如0.05g/l与0.26g/l之间,0.07g/l与0.35g/l之间,0.09g/l与0.46g/l之间,0.11g/l与0.61g/l之间,或0.15g/l与0.8g/l之间。就上限而言,3-岩藻糖基乳糖浓度可大于0.05g/l,例如大于0.07g/l、大于0.09g/l、大于0.11g/l、大于0.15g/l、大于0.2g/l、大于0.26g/l、大于0.35g/l、大于0.46g/l或大于0.6g/l。还可考虑更高的浓度,例如大于0.8g/l。

[0127] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母细胞能够产生3'-唾液乳糖。培养基中产生的3'-唾液乳糖的浓度可在例如0.1g/l和1.6g/l之间,例如0.1g/l和0.53g/l之间,0.13g/l和0.7g/l之间,0.17g/l和0.92g/l之间,0.23g/l和1.2g/l之间,或0.3g/l和1.6g/l之间。就上限而言,3'-唾液乳糖浓度可大于0.1g/l,例如大于0.13g/l、大于0.17g/l、大于0.23g/l、大于0.3g/l、大于0.4g/l、大于0.53g/l、大于0.7g/l、大于0.92g/l或大于1.2g/l。也可考虑更高的浓度,例如,大于1.6g/l。

[0128] 在一些实施例中,遗传修饰的酵母能够产生6'-唾液乳糖。培养基中产生的6'-唾液乳糖的浓度可在例如0.25g/l和4g/l之间,例如0.25g/l和1.3g/l之间,0.33g/l和1.7g/l之间,0.44g/l和2.3g/l之间,0.57g/l和3.1g/l之间,或0.76g/l和4g/l之间。就上限而言,3'-唾液乳糖浓度可大于0.25g/l,例如大于0.33g/l、大于0.44g/l、大于0.57g/l、大于0.76g/l、大于1g/l、大于1.3g/l、大于1.7g/l、大于2.3g/l或大于3g/l。也可考虑更高的浓度,例如,大于4g/l。

#### V. 发酵浓度

[0129] 还提供了包括遗传修饰的酵母细胞群的发酵组合物。酵母细胞可包括本文所公开和上文所讨论的任何酵母细胞。在一些实施例中,发酵组合物进一步包括从酵母细胞产生的至少一种人乳寡糖。发酵组合物中的至少一种人乳寡糖可包括例如2'-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖、乳-N-新四糖、3'-唾液乳糖或6'-唾液乳糖。在一些实施例中,发酵组合物包括至少两种人乳寡糖。发酵组合物中的至少两种人乳寡糖可包括例如2'-岩藻糖基乳糖和二岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和3-岩藻糖基乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和乳-N-四糖、2'-岩藻糖基乳糖和乳-N-新四糖、2'-岩藻糖基乳糖和3'-唾液乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和6'-唾液乳糖、二岩藻糖基乳糖和3-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖和乳-N-四糖、二岩藻糖基乳糖和乳-N-新四糖、二岩藻糖基乳糖和3'-唾液乳糖、二岩藻糖基乳糖和6'-唾液乳糖、3-岩藻糖基乳糖和乳糖-N-四糖、3-岩藻糖基乳糖和乳-N-新四糖,3-岩藻糖基乳糖和3'-唾液乳糖,3-岩藻糖基乳糖和6'-唾液乳糖,乳-N-四糖和乳-N-新四

糖,乳-N-四糖和3'-唾液乳糖,乳-N-四糖和6'-唾液乳糖,乳-N-新四糖和3'-唾液乳糖,乳-N-新四糖和6'-唾液乳糖,或3'-唾液乳糖和6'-唾液乳糖。

[0130] 在一些实施例中,发酵组合物进一步包括从酵母细胞产生的至少三种人乳寡糖。发酵组合物中的至少三种人乳寡糖可包括例如2'-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖和3-岩藻糖基乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖和乳-N-四糖;2'-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖和乳-N-新四糖;2'-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖和3'-唾液乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、二岩藻糖基乳糖和6'-唾液乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和乳-N-四糖;2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和乳-N-新四糖;2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和3'-唾液乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和6'-唾液乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和乳-N-新四糖;2'-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和3'-唾液乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和6'-唾液乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、乳-N-新四糖和3'-唾液乳糖;2'-岩藻糖基乳糖、乳-N-新四糖和6'-唾液乳糖;二岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和乳-N-四糖;二岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和乳-N-新四糖;二岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和3'-唾液乳糖;二岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和6'-唾液乳糖;二岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和乳-N-新四糖;二岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和3'-唾液乳糖;二岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和6'-唾液乳糖;二岩藻糖基乳糖、乳-N-新四糖和3'-唾液乳糖;二岩藻糖基乳糖、乳-N-新四糖和6'-唾液乳糖;3-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和乳-N-新四糖;3-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和3'-唾液乳糖;3-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖和6'-唾液乳糖;3-岩藻糖基乳糖、乳-N-新四糖和3'-唾液乳糖;3-岩藻糖基乳糖、乳-N-新四糖和6'-唾液乳糖;3-岩藻糖基乳糖、3'-唾液乳糖和6'-唾液乳糖;乳-N-四糖、乳-N-新四糖和3'-唾液乳糖;乳-N-四糖、乳-N-新四糖和6'-唾液乳糖;或乳-N-新四糖、3'-唾液乳糖和6'-唾液乳糖。在一些实施例中,发酵组合物进一步包括从酵母细胞产生的至少四种人乳寡糖。在一些实施例中,发酵组合物进一步包括从酵母细胞产生的至少五种人乳寡糖。在一些实施例中,发酵组合物进一步包括从酵母细胞产生的至少六种人乳寡糖。在一些实施例中,发酵组合物进一步包括从酵母细胞产生的至少七种人乳寡糖。

[0131] 一种或多种生产的人乳寡糖中二岩藻糖基乳糖的质量分数可为,例如,0%与50%之间,例如,0%与30%之间,5%与35%之间,10%与40%之间,15%与45%之间,或20%与40%之间。就上限而言,人乳寡糖中二岩藻糖基乳糖的质量分数可小于50%,例如小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%或小于5%。

## VI. 回收人乳寡糖的方法

[0132] 还提供了从发酵组合物中回收一种或多种人乳寡糖的方法。在一些实施例中,发酵组合物是本文公开的和上述的任何发酵组合物。该方法包括从培养基中分离至少一部分酵母细胞群。在一些实施方式中,分离包括离心。在一些实施方式中,分离包括过滤。

[0133] 虽然在酵母细胞与培养基分离期间,可以预期由细胞在发酵期间产生的一种或多种人乳寡糖的一些部分与培养基分离,但是可以预期一些人乳寡糖与酵母细胞保持结合。捕获这种细胞结合产物并提高总回收率的一种方法是用洗涤液漂洗分离的细胞,然后收集。现在已经发现,通过在使用前加热洗涤液,可以显著提高这种漂洗的效果。

[0134] 因此,所提供的回收方法还包括将分离的酵母细胞与加热的洗涤液接触。在一些

实施例中,加热的洗涤液是加热的含水洗涤液。在一些实施例中,加热的洗涤液由水组成。在一些实施例中,加热的洗涤液包括一种或多种其他液体或溶解的固体成分。

[0135] 加热的含水洗涤液的温度可以是,例如,在30℃和90℃之间,例如,30℃和66℃之间、36℃和72℃之间、42℃和78℃之间、48℃和84℃之间、或者在54℃和90℃之间。就上限而言,洗涤温度可小于90℃,例如,小于84℃、小于78℃、小于72℃、小于66℃、小于60℃、小于54℃、小于48℃、小于42℃、或小于36℃。就下限而言,洗涤温度可大于30℃,例如,大于36℃、大于42℃、大于48℃、大于54℃、大于60℃、大于66℃、大于72℃、大于78℃、或大于84℃。也考虑更高的温度,例如大于90℃,以及更低的温度,例如小于30℃。

[0136] 该方法还包括,在分离的酵母细胞与加热的洗涤液接触之后,从酵母细胞中移除洗涤液。在一些实施例中,移除的洗涤液与分离培养基结合,并进一步处理以分离所产生的一种或多种人乳寡糖。在一些实施例中,彼此独立地进一步处理移除的洗涤液和分离的培养基。在一些实施例中,从酵母细胞中移除洗涤液包括离心。在一些实施例中,从酵母细胞中移除洗涤液包括过滤。

[0137] 回收率可以是例如,对于从酵母细胞产生的一种或多种人乳寡糖中的至少一种,从组合的培养基和洗涤液中回收的所产生的至少一种人乳寡糖的质量分数是例如在70%和100%之间,例如在70%和88%之间,在73%和91%之间,在76%至94%之间,在79%至97%之间,或在82%至100%之间。就下限而言,一种或多种人乳寡糖中至少一种的回收率可大于70%,例如,大于73%、大于76%、大于79%、大于82%、大于85%、大于88%、大于91%、大于94%或大于97%。回收率可以是例如,对于从酵母细胞产生的一种或多种人乳寡糖中的至少一种,从组合的培养基和洗涤液中回收的质量分数是例如在70%和100%之间,例如在70%和88%之间,在73%和91%之间,在76%至94%之间,在79%至97%之间,或在82%至100%之间。就下限而言,一种或多种人乳寡糖中至少一种的回收率可大于70%,例如,大于73%、大于76%、大于79%、大于82%、大于85%、大于88%、大于91%、大于94%或大于97%。

[0138] 虽然已经针对有限数量的实施例描述了本文提供的组合物和方法,本文描述的任何实施例或图中的一个或多个特征可以与图中描述的任何其他实施例的一个或多个特征组合,而不脱离本发明的范围。没有一个实施例能代表方法和组合物的所有方面。在特定实施方式中,方法可以包括本文未提及的许多步骤。在特定实施方式中,方法不包括本文未列举的任何步骤。所描述的实施例存在变体和修改。

[0139] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请通过引用纳入本文,就好像将各篇单独的出版物或专利申请专门和单独地通过引用纳入本文那样。虽然出于阐明目的已经通过说明和举例的方式详细描述了本发明,但本领域普通技术人员根据本发明的教导不难了解,可以在不背离所附权利要求书的构思或范围的情况下作出某些改变和修改。

## VII. 处理发酵组合物的方法

[0140] 还提供了处理发酵组合物的方法。处理方法对于在包括二岩藻糖基乳糖的发酵组合物中增加2'-岩藻糖基乳糖的产量特别有用。在一些实施例中,发酵组合物是本文公开的和上述的任何发酵组合物。该方法包括提供包含二岩藻糖基乳糖的发酵组合物。发酵组合物中二岩藻糖基乳糖的浓度可如上所述。该方法还包括将发酵物与能够将二岩藻糖基乳糖转化为2'-岩藻糖基乳糖的酶接触,例如 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶。 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶可由基因工

程改造入发酵菌株中的基因编码,使得 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶在发酵过程中表达。 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶可作为下游加工方案的一部分外源添加到发酵组合物中。合适的 $\alpha$ 1-3,4-岩藻糖苷酶来源包括例如但不限于多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、双歧双歧杆菌、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)、产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、解硫胺素芽孢杆菌 (*Paenibacillus thiaminolyticus*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、拟南芥和褐家鼠。

[0141] 使发酵组合物与 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶在适于将至少一部分二岩藻糖基乳糖转化为2'-岩藻糖基乳糖的条件下接触。 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶转化的初始二岩藻糖基乳糖百分数可以在20%和100%之间,例如,在20%和68%之间,在28%和76%之间,在36%和84%之间,在44%和92%之间,或者在52%和100%之间。就下限而言,二岩藻糖基乳糖的转化率可大于20%,例如大于28%、大于36%、大于44%、大于52%、大于60%、大于68%、大于76%、大于84%或大于92%。在一些实施例中,发酵组合物还包括3-岩藻糖基乳糖,以及发酵组合物与 $\alpha$ 1-3,4岩藻糖苷酶的接触还包括降低发酵组合物中3-岩藻糖基乳糖的水平,进一步提高组合物中2'-岩藻糖基乳糖的纯度。

#### VIII. 实施例

[0142] 根据以下非限制性实施例,将更好地理解本公开。提供以下实施例仅用于说明目的,并非旨在以任何方式限制本发明的范围。

##### 实施例1. 蔗糖和乳糖培养基相对浓度对人乳寡糖产量的影响

[0143] 研究了蔗糖与乳糖比例对产2'-岩藻糖基乳糖的遗传修饰的酵母发酵罐培养中人乳寡糖生产的影响。这些分批补料发酵中进料物中蔗糖与乳糖的质量比范围为4 (即4:1) 到40 (即40:1)。结果如图4所示。从数据中可以看出,提高进料中乳糖的比例对2'-岩藻糖基乳糖的总产量有显著影响。改进的生产菌株尤其受益于额外的乳糖,2'-岩藻糖基乳糖产物浓度从小于1.3g/L增加到高达10g/L。

[0144] 此外,还观察到乳糖进料相对于蔗糖进料的增加通过减少二岩藻糖基乳糖的产生而改变了微发酵器中酵母细胞的人乳寡糖产物概貌。从图5图表中的数据可以看出,在最高浓度的乳糖进料情况下,所有三种菌株的二岩藻糖基乳糖产物浓度均最低。此外,图6图表中的数据表明,随着乳糖作为进料的一部分增加,二岩藻糖基乳糖与总岩藻糖基乳糖 (即二岩藻糖基乳糖与2'-岩藻糖基乳糖) 的摩尔比降低。这些发现提示,可改变蔗糖与乳糖的比例,以改变岩藻糖基转移酶的特异性。重要的是,研究结果还表明,可以改变由本文公开的遗传修饰的酵母细胞产生的人乳寡糖的产物概貌,而无需进一步改变其遗传组成。如上所述,这种额外的控制策略对于增加所需产物滴度,减少不期望的副产物形成和简化下游回收过程具有重要意义。

##### 实施例2. 从发酵组合物中回收人乳寡糖

[0145] 另外,研究了不同产物分离方法对所提供的酵母细胞和发酵方法产生的人乳寡糖回收的影响。对包括遗传修饰的酵母细胞和从细胞产生的2'-岩藻糖基乳糖的发酵培养物的样品进行离心,并测定离心上清液中2'-岩藻糖基乳糖的量。如图7所示,将含水发酵肉汤与酵母生物质分离的该标准离心,导致回收原发酵培养样品中产生的2'-岩藻糖基乳糖的

大约一半。换句话说,大约一半的2'-岩藻糖基乳糖与酵母生物质结合,无论是细胞外还是细胞内。发现用室温 (RT) 水洗涤酵母在最小程度上提高回收率。但是,用70℃水洗涤大大提高了回收率,几乎达到100%。这一发现证明了所提供的通过将所述组合物的酵母细胞与加热的含水洗涤液接触来从发酵组合物中回收人乳寡糖的方法的优点。

|                   | 乳糖 | 半乳糖 | 岩藻糖 | 唾液酸 | N-乙酰葡萄糖胺 |
|-------------------|----|-----|-----|-----|----------|
|                   |    |     |     |     |          |
| 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL) |    |     |     |     |          |
| 6'-唾液乳糖 (6'-SL)   |    |     |     |     |          |
| 乳-N-四糖 (LNT)      |    |     |     |     |          |

图1

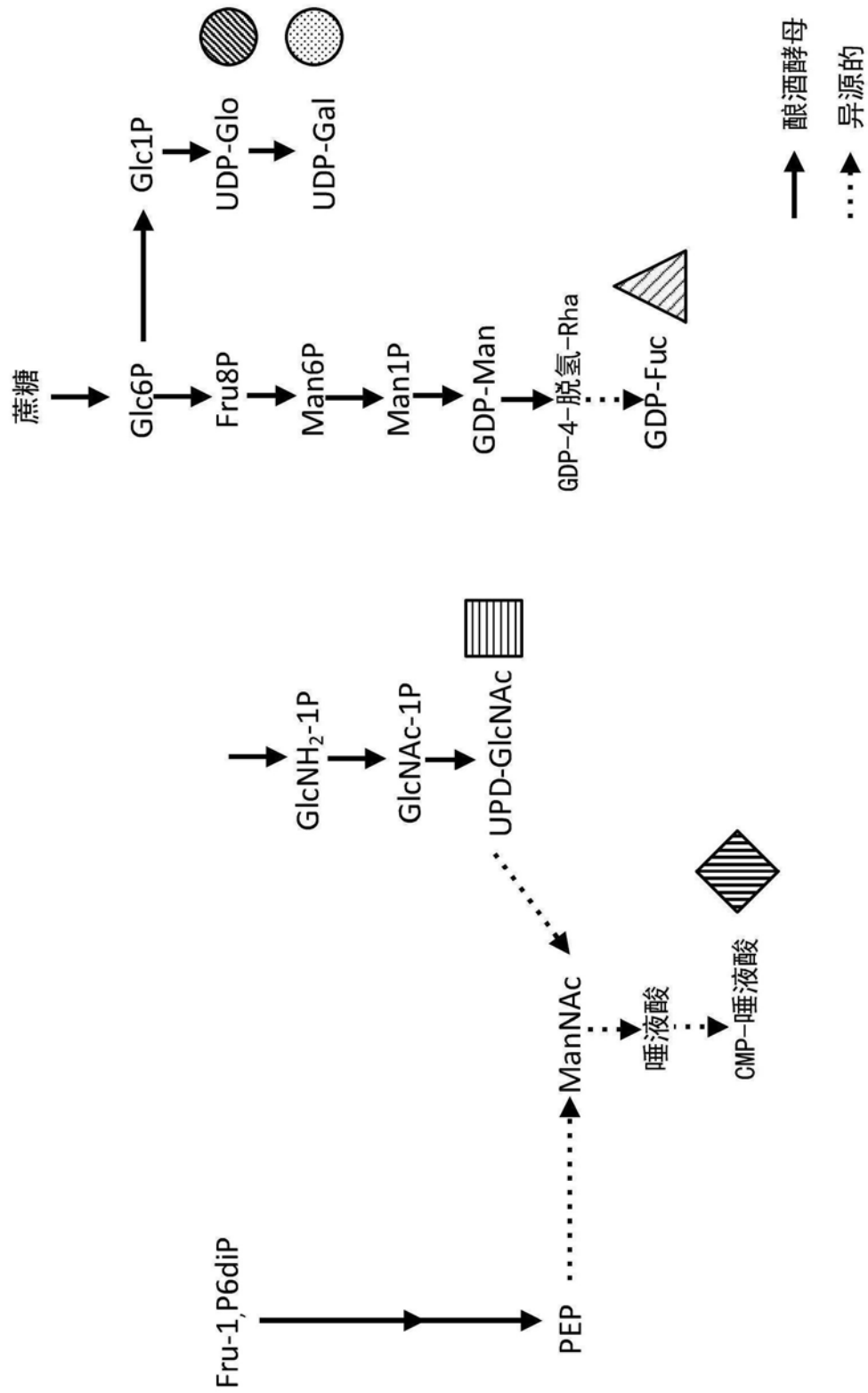
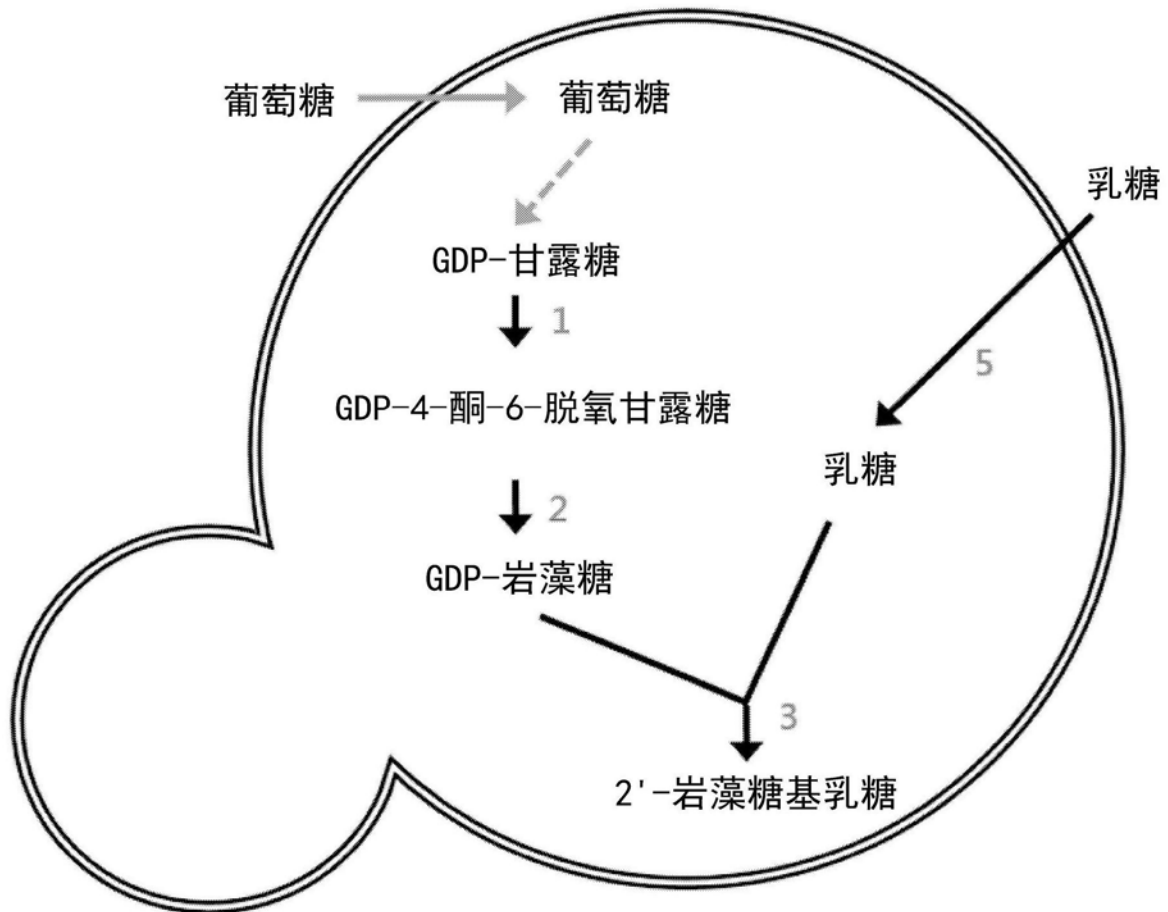


图2



1. GDP-甘露糖 4, 6-脱水酶 大肠杆菌
2. GDP-L-岩藻糖合酶 拟南芥
3.  $\alpha$ -1, 2-岩藻糖基转移酶, 幽门螺旋杆菌、大肠杆菌或家牛
4. 乳糖转运体, 乳酸克鲁维酵母

图3

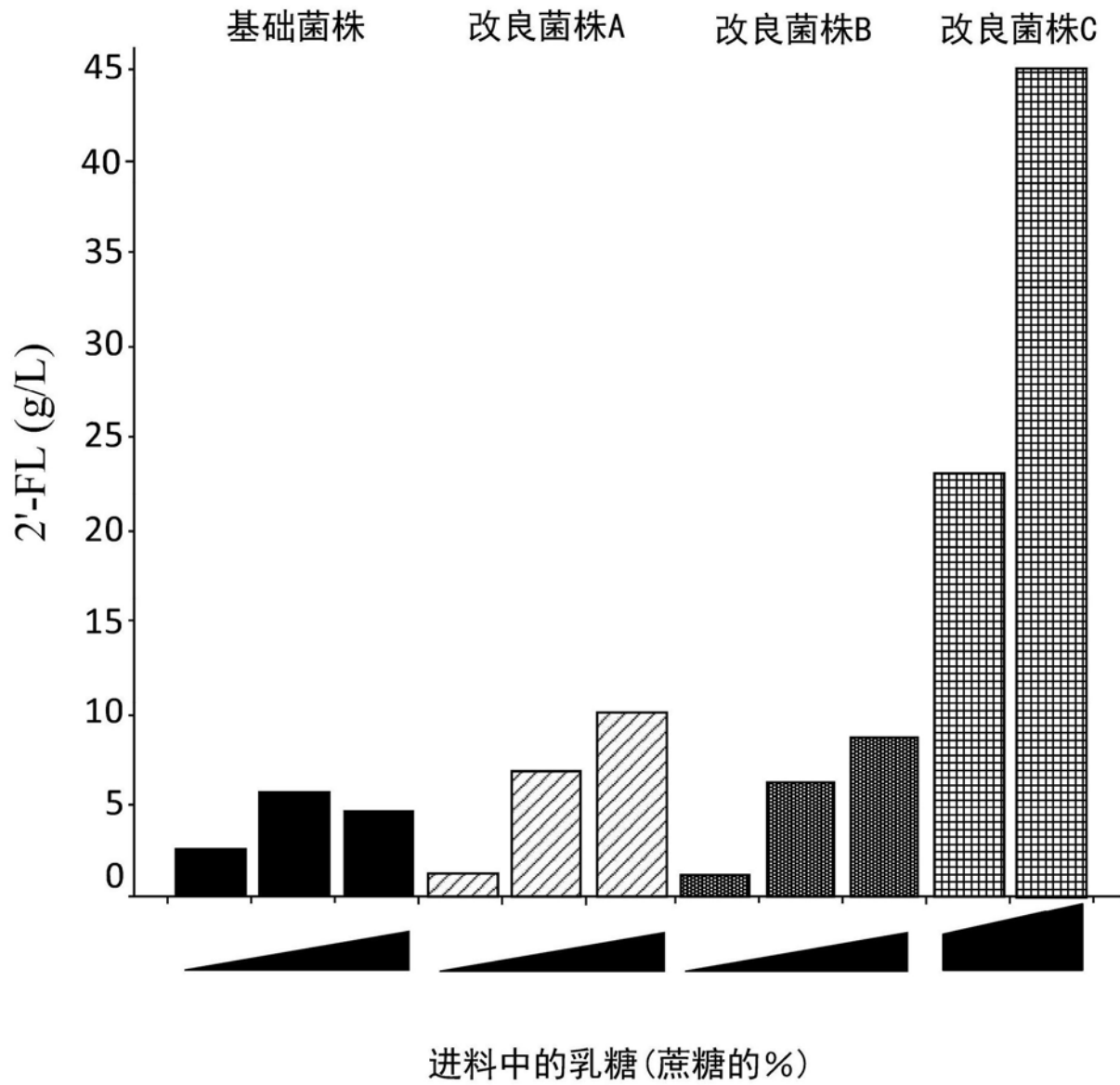


图4

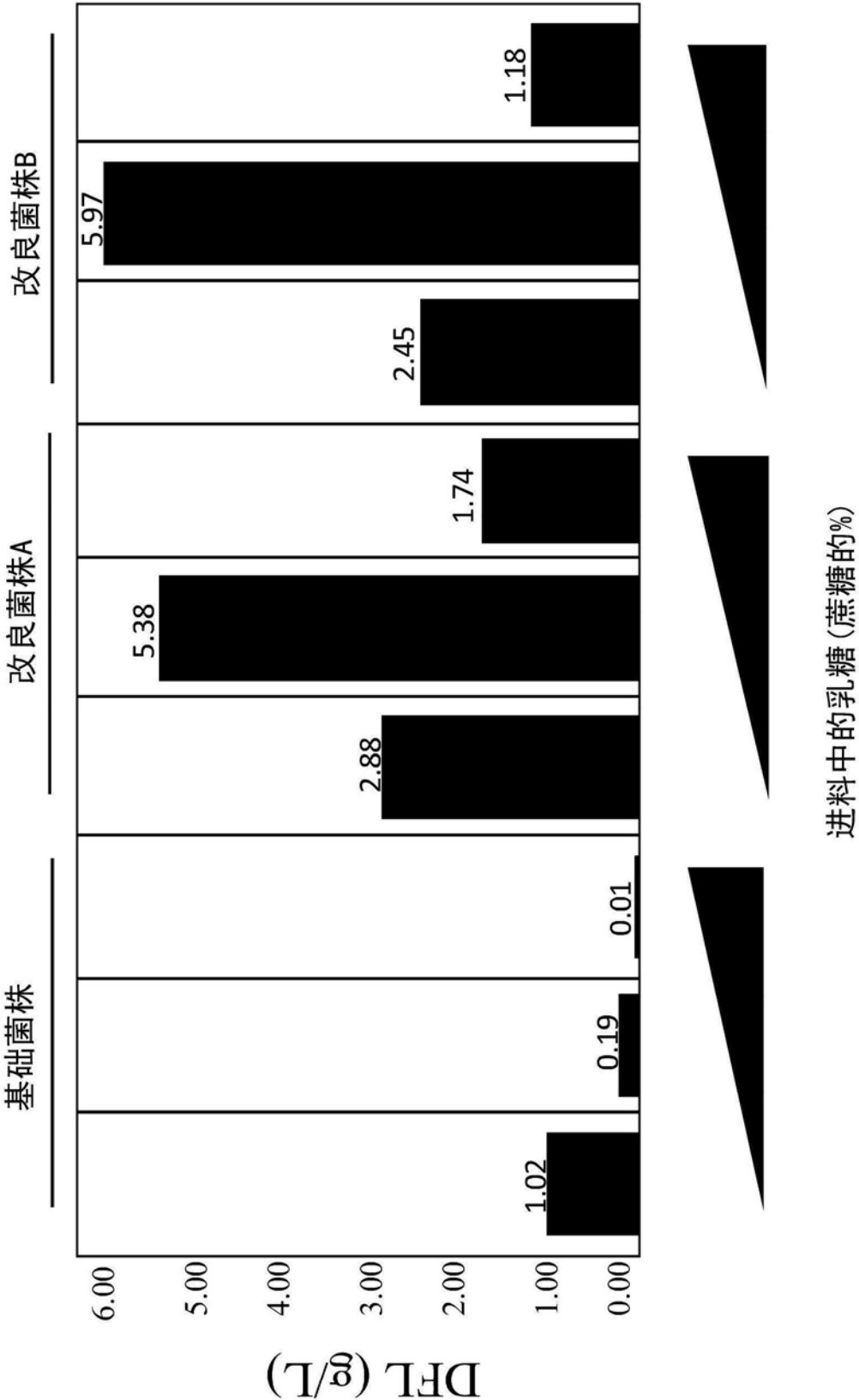


图5

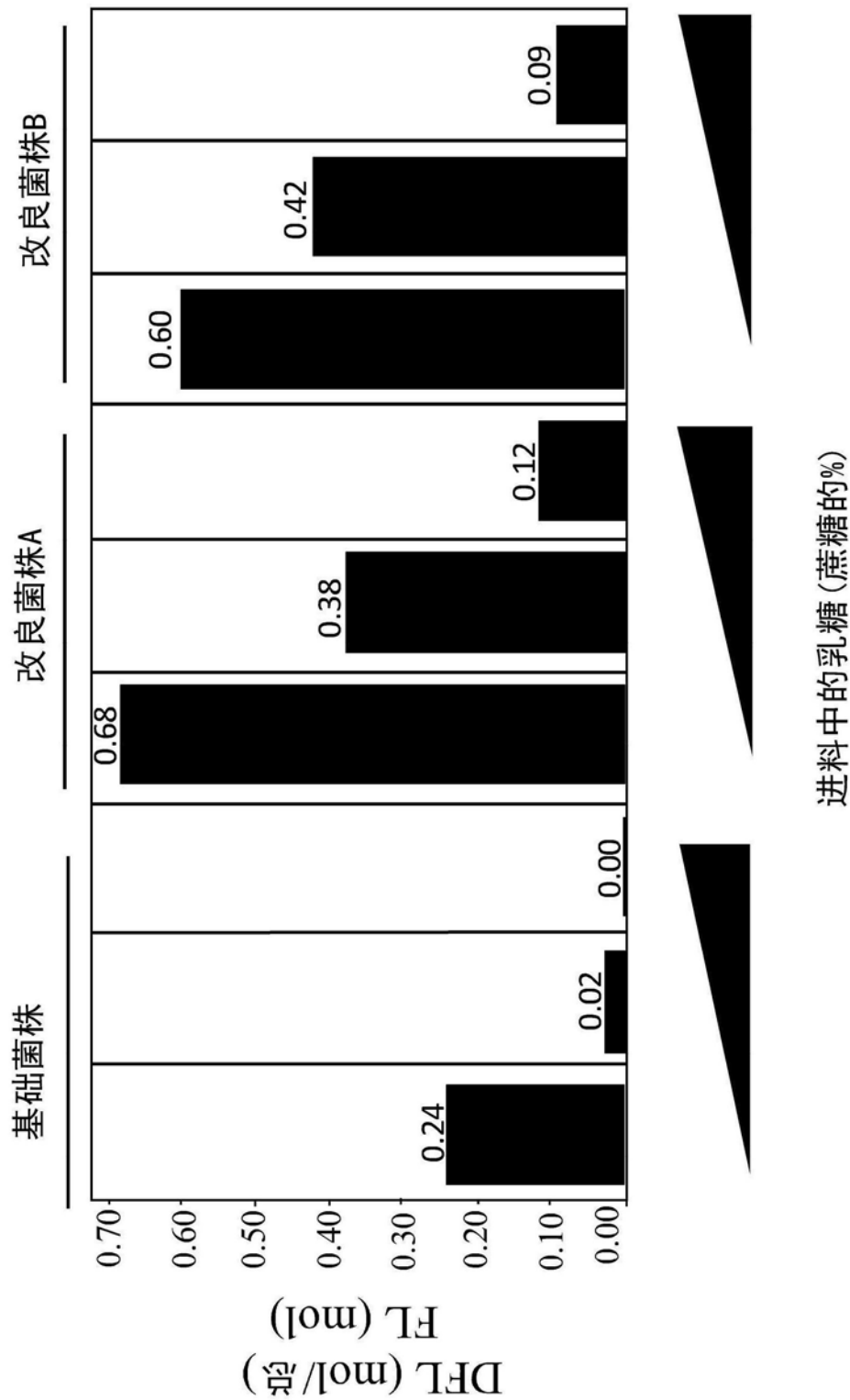


图6

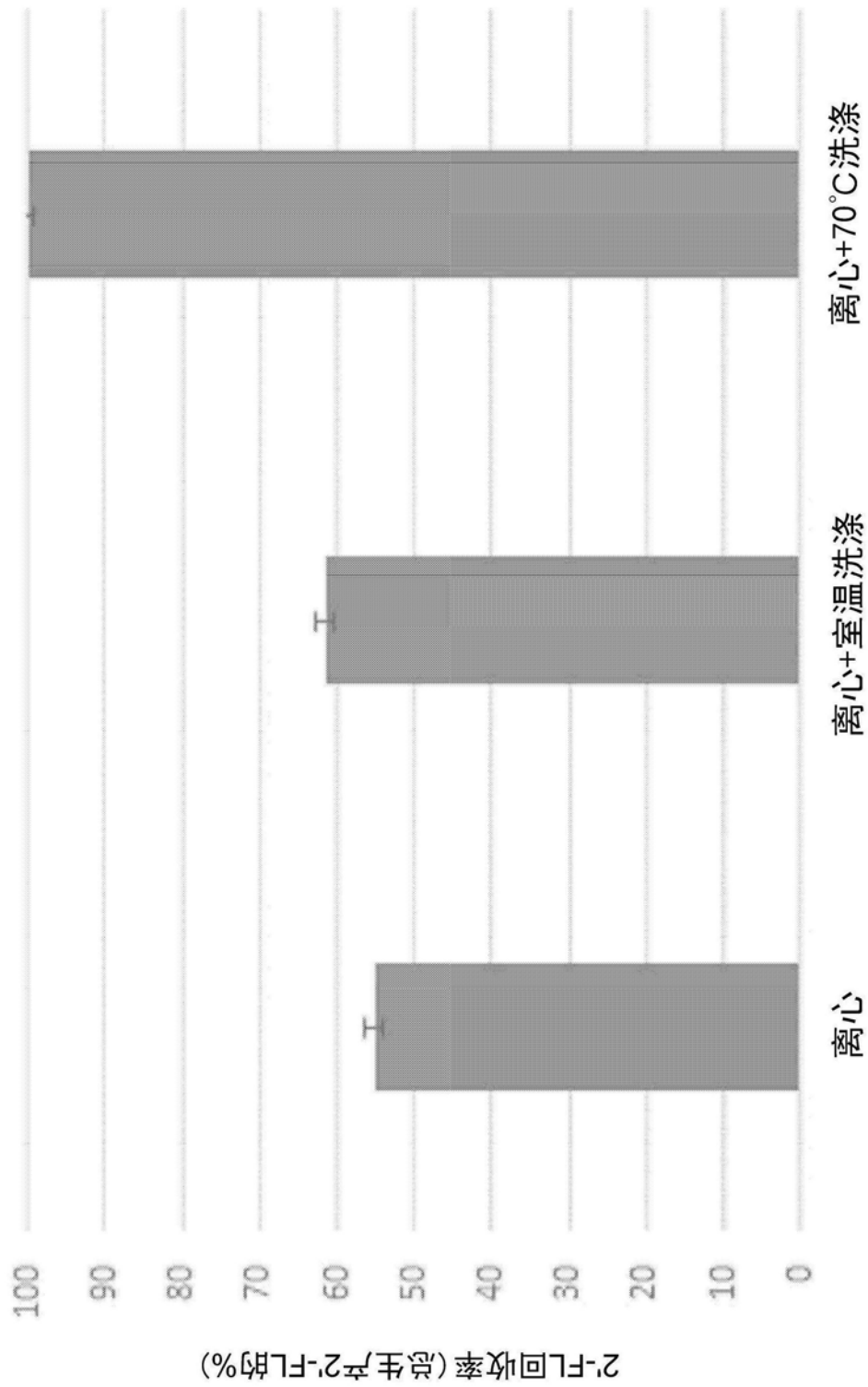


图7

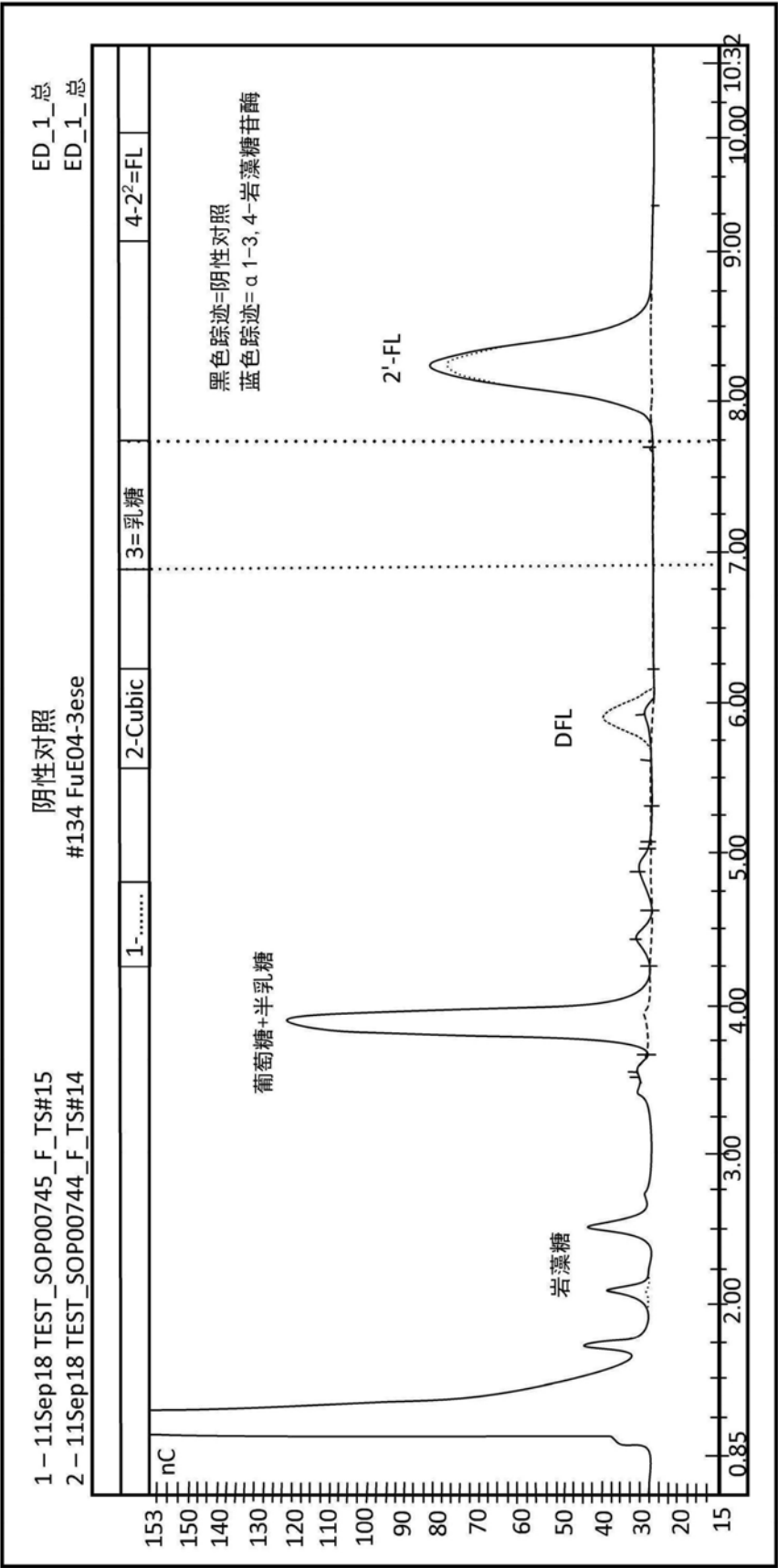


图8

示范性小试规模的罐滴度 (g/L)

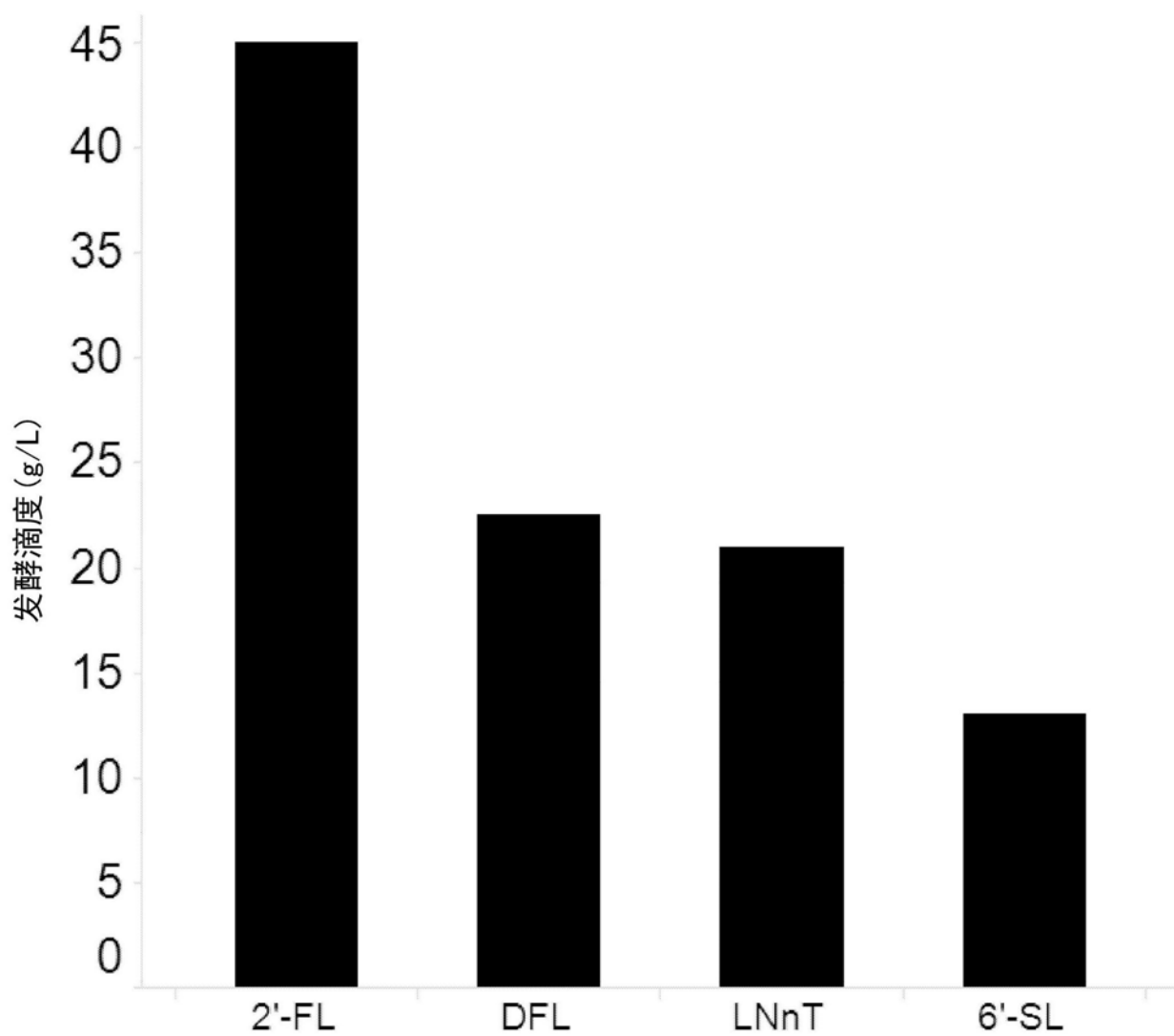


图9