



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110628842 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201910957609.0

C12P 19/14(2006.01)

(22)申请日 2014.07.04

C12P 19/26(2006.01)

(30)优先权数据

13183670.2 2013.09.10 EP

(62)分案原申请数据

201480061563.X 2014.07.04

(71)申请人 詹尼温生物技术有限责任公司

地址 德国莱茵布赖特巴赫

(72)发明人 斯特凡·延内魏因

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 李小爽

(51)Int.Cl.

C12P 19/00(2006.01)

C12P 19/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

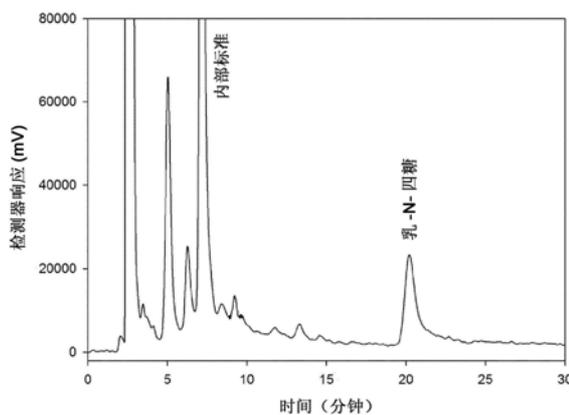
序列表3页 附图10页

(54)发明名称

寡糖的生产

(57)摘要

本发明涉及寡糖的生产。具体而言,本发明涉及一种或多种糖苷酶在用于所产生的期望的寡糖的生产和/或纯化的过程中的用途。所述过程优选是利用宿主微生物的微生物发酵过程,所述宿主微生物也可以包含表达适用于糖类的降解的糖分解代谢途径蛋白的核酸,否则阻碍期望的寡糖的纯化。



1. 一种使用宿主微生物用于生产寡糖的方法,其中所述寡糖并不天然存在于所述宿主细胞中,所述方法包括以下步骤:

a) 在容许生产所述寡糖的条件和培养基中培养适用于生产期望的寡糖的宿主微生物,由此产生所述寡糖以及,在适用情况下产生生物合成的糖中间体和/或副产物;

b) 使用培养所述宿主微生物的所述培养基中的糖苷酶,以降解生物合成糖中间体和/或糖副产物和/或未使用的糖底物,其中所述糖苷酶是由另外加入所述培养基并表达所述糖苷酶的第二微生物生产的;以及

c) 回收所述期望的寡糖。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法是间歇或连续方法。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述寡糖回收自培养的所述宿主微生物的上清液,所述上清液通过离心培养的所述宿主微生物以获得上清液和宿主微生物沉淀而获得。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述期望的寡糖选自2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、2'3-二岩藻糖基乳糖、3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖、3-岩藻糖基-3'-唾液酸乳糖、乳-N-四糖、乳-N-新四糖、乳-N-岩藻糖五糖I、乳-N-岩藻糖五糖II、乳-N-岩藻糖五糖III、乳-N-岩藻糖五糖V、乳-N-二岩藻糖六糖I、乳-N-二岩藻糖六糖II、乳-N-唾液酸五糖LSTa、LSTb、LSTc以及尤其来自图11的表1中所示的寡糖或它们的衍生物的一种。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述糖苷酶选自由以下各项组成的组的一种或多种:半乳糖苷酶、甘露糖苷酶、岩藻糖苷酶、唾液酸酶(神经氨酸酶)、葡糖苷酶、N-乙酰基葡糖酰胺酶和N-乙酰基己糖酰胺酶。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述糖苷酶选自由以下各项组成的组的一种或多种: β -半乳糖苷酶、 α -半乳糖苷酶、 β -N-乙酰基葡糖酰胺酶、 β -N-乙酰基己糖酰胺酶、 β -甘露糖苷酶、 α -甘露糖苷酶、 α -岩藻糖苷酶、 β -岩藻糖苷酶、 β -葡糖苷酶、 α -葡糖苷酶、神经氨酸酶。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述宿主微生物选自细菌和酵母菌,以及优选地是大肠杆菌菌株、乳杆菌种或谷氨酸棒杆菌菌株或酵母属菌种菌株。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,采用的所述宿主微生物表达用于糖分解代谢途径且不存在于所述微生物中的蛋白,所述蛋白选自以下各项的至少一种:当使用半乳糖苷酶时,半乳糖分解代谢途径蛋白;当使用岩藻糖苷酶时,岩藻糖分解代谢途径蛋白;当使用 β -N-乙酰基己糖胺酶时,N-乙酰基葡糖胺分解代谢途径蛋白。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,在采用的所述宿主微生物中,用于在降解过程中释放的单糖的补救途径被过表达,以转化所述单糖。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,采用的所述宿主微生物是表达用于糖分解代谢途径的蛋白的野生型,所述蛋白选自以下各项中的至少一种:当使用半乳糖苷酶时,半乳糖分解代谢途径蛋白;当使用岩藻糖苷酶时,岩藻糖分解代谢途径蛋白;当使用 β -N-乙酰基己糖胺酶时,N-乙酰基葡糖胺分解代谢途径蛋白,其中在所述方法期间,在所述宿主微生物中诱导这类蛋白的过表达。

寡糖的生产

[0001] 本申请是申请日为2014年7月4日的题为“寡糖的生产”的中国专利申请No.201480061563.X的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明总体涉及用于寡糖或多糖的生产的方法,如,例如,经由微生物发酵的寡糖或多糖的生产,以及尤其涉及水解酶在这类方法中的应用。

背景技术

[0003] 寡糖的商业化生产,连同新颖的生物制造技术开发一起在过去的多年来已变得越来令人感兴趣。如今,使用寡糖,例如作为功能性食品组分、营养添加剂或作为营养品(营养保健品,nutraceuticals)。传统上,寡糖被定义为2个或更多(通常多达10个)单糖的聚合物,然而,此外多达20至25个单糖的聚合物经常与它们同化(混用,assimilate)。尤其是,前生物寡糖(前生命寡糖,prebiotic oligosaccharide)是高度令人感兴趣的,因为它们表示非龋齿性的(noncariogenic)和不易消化的化合物,其刺激人体胃肠道微生物区系(微生物群落,microflora)的生长和发育。

[0004] 目前,寡糖通过化学糖基化和使用糖基转移酶从头合成进行合成,或者它们可以衍生自多糖的化学降解、物理降解或生物降解。

[0005] 今天,合成或分离自植物多糖的低聚果糖(果寡糖,果聚糖,fructooligosaccharide)和低聚半乳糖(半乳糖寡糖,galactooligosaccharide)代表最丰富生产的寡糖。然而,由于优越的健康益处,对人乳寡糖(HMO)作为营养品的兴趣在过去的多年来已强烈地增加。公认的是,HMO有助于人体针对人病原体的防御机制,特定的肠道菌群(微生物群系,microbiome)的确立,以及免疫系统的出生后刺激。虽然HMO是由婴儿食用,但已被人们接受的是,在出生后期间中观察到的这些寡糖的有益效果在以后的生活中也可以发现。

[0006] 已经长期已知的是人母乳,除乳糖之外,还包含称作人乳寡糖(HMO)的寡糖的复杂混合物,其表示相对于成分和数量而言的独特的寡糖复杂混合物。今天,多于80种HMO化合物已在结构上进行表征,并且除了少数例外,它们是通过在还原端处的乳糖部分来表征并且经常在非还原端含有岩藻糖和/或唾液酸。通常,由其衍生HMO的单糖是D-葡萄糖、D-半乳糖、N-乙酰基葡萄糖胺、L-岩藻糖和唾液酸。

[0007] 最著名的寡糖是2'-岩藻糖基乳糖和3'-岩藻糖基乳糖,它们一起可以贡献多达总的HMO部分的1/3。在人乳中存在的另外的著名的HMO是乳-N-四糖、乳-N-新四糖(neotetraose)和乳-N-岩藻糖五糖(fucopentaose)。除这些中性寡糖之外,在人乳中还可以发现酸性HMO,如,例如3'-唾液酸乳糖(唾液乳糖,sialyllactose)、6'-唾液酸乳糖和3-岩藻糖基-3'-唾液酸乳糖、二唾液酸-乳-N-四糖等。这些结构与上皮细胞表面糖复合物的表位,路易斯(Lewis)组织血型抗原,如路易斯x (LeX) 密切相关,并且HMO与上皮表位的结构同源性导致针对抗细菌病原体的保护特性。

[0008] 除提到的在肠道中的局部效应之外,HMO还表现出通过进入全身循环(体循环, systemic circulation)在婴儿中引发全身效应。此外,HMO对蛋白-碳水化合物相互作用的影响,例如,选择素-白细胞结合,可以调节免疫反应并且降低炎症反应。

[0009] 由于前生物寡糖(尤其是HMO)的充分研究的有益的特性,连同它们的有限的可获得性,有效的商业生产,即大规模生产是非常需要的。

[0010] 然而,如今的主要缺点,在大多数情况下是缺乏有效的寡糖生产。如上所述,借助于利用酶工程或化学工程的合成,或多糖解聚作用(利用物理、化学或酶方法),寡糖可以产生自低聚物工程。

[0011] 由于具有类似的化学反应性的若干羟基的存在,寡糖的化学合成已被证明是具有挑战性的。因此,在寡糖的化学合成中,糖结构单元必须首先加以选择性地保护以控制化学类似基团的反应性,然后偶联,并且最后脱保护(去保护,de-protect),以获得期望的寡糖。即使期望的寡糖的小规模合成是可能的,但开发合成途径通常是费时的、技术上具有挑战性并且经常是极其昂贵的。酶促合成或化学和酶促合成的组合提供相对于纯化学合成途径的显著的优点。通过酶促合成,已获得若干人乳寡糖,如2'-岩藻糖基乳糖、乳-N-四糖、乳-N-新四糖或3'-唾液酸乳糖。除酶促合成之外,通向寡糖的发酵途径也证明是成功的,并且已经可以做到通过发酵方式,以相当的产量提供寡糖(包括HMO)。

[0012] 另外,如前面提到的,借助于寡糖结构的化学或生化合成,这比例如合成其它生物聚合物,如肽和核酸更加困难,经常产生寡糖混合物,该寡糖混合物含有非期望的寡糖,这些非期望的寡糖需要从期望的寡糖中分离或除去。这也同样适用于经由微生物发酵产生的寡糖,因为在那些过程中,在反应混合物/细胞培养基(含有待发酵的微生物)中将发现高含量的副产物、中间产物或甚至起始底物。

[0013] 针对该背景,非常需要用于生产期望的寡糖,尤其是HMO的有效的方法和过程,其中上述有效的生产具有较高的医疗相关性以及商业影响。

发明内容

[0014] 通过本发明,经由在从混合物中纯化所产生的期望的寡糖中使用一种或多种糖苷酶,用于降解非期望的寡糖或代谢产物或未使用的底物,此目的和其它的目的已经解决,该混合物含有产生的期望的寡糖以及,在适用情况下,非期望的寡糖或代谢糖类产物(在所述期望的寡糖的生产中所产生),和/或在所述寡糖的生产中使用的未使用的糖底物。

[0015] 通过利用宿主微生物生产寡糖的方法来进一步解决上述目的,其中该寡糖并不天然存在于所述宿主细胞中,上述方法包括以下步骤:a)在容许生产所述寡糖的条件下和培养基中,培养适用于生产期望的寡糖的宿主微生物,借此生产寡糖以及,在适用情况下,生产生物合成中间体和/或副产物;b)使用培养宿主微生物的培养基中的糖苷酶,以降解生物合成糖中间体和/或糖副产物和/或未使用的糖底物;以及c)回收期望的寡糖。

[0016] 根据本发明,在用于生产寡糖的过程中使用糖苷酶,其中糖苷酶用于降解和/或阻碍在期望的寡糖的生产中所产生的不期望的副产物、未使用的起始底物和中间产物;因此,根据本发明,糖苷酶用于从含有期望的寡糖和其它不需要的碳水化合物部分的混合物中纯化期望的寡糖。

[0017] 根据本发明,糖苷酶可以用于生产期望的寡糖的发酵过程以及用于纯化或分离通

过体外寡糖合成反应或通过化学合成或它们的组合所获得的寡糖混合物。

[0018] 借助于糖苷酶,可以实现的是,例如除期望的寡糖之外的其它(寡)糖可以进行代谢,上述其它(寡)糖是在期望的寡糖的合成过程中在微生物中所产生的,并且上述其它寡糖干扰期望的寡糖的纯化步骤。

[0019] 到目前为止尚未描述糖苷酶在用于生产期望的寡糖的过程中的用途。与此相反,在目前应用的方法(即用于HMO的发酵)中,通过添加乳糖作为用于合成的底物。为了防止添加的乳糖的降解,在发酵菌株中强烈避免 β -半乳糖苷酶以及其它糖苷酶的反应。因此,在发酵中使用 β -半乳糖苷酶缺陷型菌株(参见,例如Dumon et al., (2004) Biotechnol. Prog. 20, 412-419)或菌株的 β -半乳糖苷酶基因已经特异性钝化(沉默, inactivate) (Dumon et al., (2006) ChemBioChem. 7, 359-365)。一般地,任何糖苷酶活性的存在被视为反作用(反生产, contra productive)于寡糖的发酵。

[0020] 根据本发明,“寡糖”应理解为是单糖的短的聚合物,其包含至少2个糖亚基,如在开始时已经提到的。寡糖可以是支链或形成亚基的直链。此外,寡糖的糖亚基可以具有许多化学修饰。因此,根据本发明的寡糖可以包含一个或多个非糖部分。

[0021] 此外,目前和一般地,在相关领域中,“糖苷酶”,还被称为“糖苷水解酶”或“糖基水解酶”,催化糖苷键的水解以释放较小糖。它们可以分类为催化O-糖苷或S-糖苷水解的酶,以及它们通常以它们所作用的底物加以命名。因此,葡糖苷酶催化糖苷的水解以及木聚糖酶催化木聚糖的裂解。因此,根据本发明的糖苷酶催化糖苷键的水解以释放具有比天然简单的碳水化合物底物以及复杂的碳水化合物底物更低分子量的单糖和寡糖。

[0022] 根据本发明,在本文中公开的应用和方法中,糖苷酶用来降解和/或阻碍在期望的寡糖的生产中所产生的不期望的副产物、未使用的起始底物和中间产物,相比于在不期望的副产物、未使用的起始底物和中间产物的降解过程中通过糖苷酶的作用所释放的单糖和寡糖或二糖,上述不期望的副产物、未使用的起始底物和中间产物通常具有更高的分子量。

[0023] 因此,目前,“释放的单糖”应理解为在糖苷酶介导的碳水化合物底物的糖苷键的水解中已产生的单糖,其中形成具有比水解的碳水化合物底物更低分子量的单糖和寡糖。

[0024] 根据本发明,至少一种糖苷酶,或两种或更多种的组合可以用于根据本发明的应用和方法。

[0025] 根据本发明的一个方面,糖苷酶用于微生物发酵过程,该过程用于生产期望的寡糖并使用宿主微生物,其中,相对于所述宿主细胞,所述寡糖和/或所述糖苷酶并不天然存在于微生物中。

[0026] 在相关领域中目前和通常所理解的,“微生物发酵”应理解为(一般大规模)工业代谢方法,其中在微生物,如细菌、真菌和霉菌的培养期间,发生营养物,特别是碳水化合物的酶分解和利用,以及化合物转化成其它化合物。因此,工业的或大规模的微生物发酵是控制微生物,即细菌、酵母菌和霉菌以改善食品,生产期望的产品的过程。

[0027] 根据本发明的另一方面,糖苷酶用于分解通过体外寡糖合成反应或通过化学合成或通过它们的组合所获得的寡糖混合物。

[0028] 在相关领域中目前以及通常地,“微生物”目前指定并包括任何微观有机体,该微观有机体包括单细胞、细胞群或多细胞的相对复杂的有机体,并且特别地,包括细菌和酵母菌,该微观有机体适合在根据本发明的方法中使用。如根据本发明采用的微生物可以在液

体培养基加以培养,并且一般需要培养基中的碳源以进行生长和复制。

[0029] 目前,并且在整个本发明中,“重组体”是指通过将基因从一个物种移植或剪接至不同物种的宿主微生物的细胞所制备的基因工程DNA。这样的DNA变成宿主的基因组成的一部分并被复制。

[0030] 因此,“宿主微生物”用来指任何微生物,其含有对于如此重组的宿主微生物外源的(foreign)/非天然存在于如此重组的宿主微生物中的核酸序列或表达的蛋白,并且其中,上述外源的/非天然存在于所述微生物中的核酸序列被整合于宿主微生物细胞的基因组中。从而,“非天然存在的”是指核酸序列/蛋白(如,例如酶)是对于所述宿主微生物细胞是外源的,即,相对于微生物宿主细胞而言,核酸序列/蛋白是异源的。异源序列可以,例如通过转染、转化或转导稳定地引入至宿主微生物细胞的基因组,其中可以应用技术,这取决于序列待引入的宿主细胞。各种技术是本领域技术人员已知的并且,例如披露于 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)。因此,其中已引入异源序列的宿主微生物将产生根据本发明的核酸序列所编码的异源蛋白。

[0031] 对于重组体生产,宿主细胞可以基因工程化以结合表达系统或其部分以及本发明的核酸序列。可以通过在许多标准实验室手册中描述的方法将核酸序列引入至宿主微生物细胞,如 Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986), 以及 Sambrook et al., 1989, 如上文。

[0032] 因此,根据本发明的核酸序列可以,例如包含在载体中,其将被稳定转化/转染或以其它方式引入至宿主微生物细胞。

[0033] 各种各样的表达系统可以用来生产本发明的多肽。这样的载体包括(除了别的以外)染色体载体、附加型载体(游离型载体, episomal vector)和病毒源性载体,例如,源自细菌质粒的载体、源自噬菌体的载体、源自转座子的载体、源自酵母游离体的载体、源自插入元件的载体、源自酵母染色体元件的载体、源自病毒的载体以及源自它们的组合的载体,如来源于质粒和噬菌体遗传元件,如粘粒和噬菌粒那些载体。表达系统结构体可以含有调控区,其调节并引起表达。通常,适合于维护、增殖或表达多核苷酸以及适合于在宿主中合成多肽的任何系统或载体可以用于表达(在此方面)。适当的DNA序列可以通过各种知名的和常规的技术中的任何一种(如,例如,那些在上文中陈述的 Sambrook et al. 中的技术)可以将插入至表达系统。

[0034] 目前,“期望的寡糖”是指将借助于应用的方法,特别地和有目的地生产的寡糖。因此,“非期望的寡糖”表示在期望的寡糖的生产中并不打算生产或产生的寡糖或通过使用的与期望的寡糖无关的有机体所形成的寡糖。“代谢产物”或“代谢糖产物”或“糖中间体”是这样的糖,即在期望的寡糖的生产中所产生的碳水化合物产物,以及“未使用的糖底物”是指在期望的寡糖的生产中使用的/用于期望的寡糖的生产的起始分子或部分。

[0035] 如开头提到的,本发明还涉及利用宿主微生物来生产寡糖的方法,其中所述寡糖不是天然存在于所述宿主细胞中,该方法包括以下步骤:a)在容许生产该寡糖的条件下和培养基中,培养适用于生产期望的寡糖的宿主微生物,借此产生寡糖以及,在适用情况下,产生生物合成糖中间体和/或糖副产物;b)利用培养宿主微生物的培养基中的糖苷酶,以降解生物合成中间体和/或副产物和/或未使用的底物;以及c)回收期望的寡糖。

[0036] 借助于根据本发明的方法,已经提供了有效的制备方法,通过这种方法可以以一定形式生产期望的寡糖,其中基本不存在非期望的寡糖或另外的阻碍中间产物或未使用的底物。

[0037] 如本文中所使用的,术语“培养”是指在培养基中并在容许和适用于生产期望的寡糖的条件下生长微生物。对于本领域技术人员而言,在阅读本发明的公开内容以后并连同技术人员的技术和专家背景,多种适宜的宿主微生物以及用于它们的培养的培养基和条件将是容易获得的。

[0038] 如本文中所使用的,术语“回收”是指从宿主微生物培养物中分离、收获、纯化、收集或以其它方式分离通过根据本发明的宿主微生物生产的寡糖。

[0039] 根据本发明的一个方面,将糖苷酶加入至培养微生物的培养基。据此“添加”是指将酶直接加入至培养基,即,与通过用于生产的微生物内源地产生而提供糖苷酶相反。因此,酶(以其活性形式)在市场上是容易获得且可商购的,并且可以添加为降解非期望的寡糖/未使用的底物/中间体所必要的量。上述用量将取决于培养的微生物的量以及还取决于产生的期望的寡糖的量、底物和可能预期的中间体的量。

[0040] 根据本实施方式,在根据本发明的生产过程的最后,将糖苷酶外部添加至培养基/上清液,当编码糖苷酶的宿主微生物的内源性基因已失活或删除时,这是特别优选的。在这样做时,不需要的寡糖和/或单糖不能积聚并且并不干扰回收期望的寡糖。

[0041] 例如,将 β -半乳糖苷酶添加至含有期望的寡糖和非期望的寡糖,如发酵衍生的乳-N-四糖和乳糖的溶液,待采用的 β -半乳糖苷酶的量将取决于寡糖的(实际或预期的)量。例如,利用均为10mM浓度的乳-N-四糖和乳糖,50单位/ml(最终浓度)的量的 β -半乳糖苷酶(例如来自Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich Germany, 目录号G6008)可以取得良好的效果以裂解葡萄糖和半乳糖中的乳糖,用于糖的更好的层析分离(例如通过尺寸依赖性凝胶过滤层析)。在由本发明人进行的各自的实验中,可以表明,在几秒钟内,乳糖被裂解成它的单糖,半乳糖和葡萄糖,而乳-N-四糖仍然如此(还参见图1和以下的分别的描述)。这些实验证明了纯化大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的高度选择性作用,其仅选择性地水解Gal (B1-4) Glc糖苷键而不水解在乳-N-四糖的非还原端处存在的Gal (B1-3) GlcNAc糖苷键。依据本公开内容,可能需要使用多少种相应的糖苷酶将是显而易见的。

[0042] 例如,在发酵程序中,用于生产,例如岩藻糖基化的寡糖的适宜的微生物已知来自EP 2 479 263 A1或来自自EP 2 439 264或来自自W02010/142305,其内容特此明确提及并作出本发明的主题。

[0043] 根据本发明的另一方面,糖苷酶通过所述宿主微生物内源性产生,其中编码内源性产生的糖苷酶的核酸序列并不天然存在于宿主细胞中,以及其中宿主细胞已稳定转化以表达并不天然存在的糖苷酶,并且其中在宿主微生物中糖苷酶的表达是可诱导的。

[0044] 根据本实施方式,生产寡糖的微生物在外部诱导下,例如,经由温度或底物-诱导的表达(其否则被去调节),内源地(即包含在它的基因组中)表达糖苷酶,例如 β -半乳糖苷酶。这意味着,在期望的寡糖的合成期间,糖苷酶被去调节并可以,例如通过温度或添加感应体,例如四环素(在发酵过程的最后)而进行诱导。在宿主微生物的培养中已产生足够和/或基本上最大量的寡糖以后,糖苷酶的表达将被诱导。其后,表达的糖苷酶将降解不需要的糖中间体、底物等,从而使得培养基基本不含糖中间体或底物,否则这将妨碍或复杂化

期望的寡糖的纯化。在现有技术中,多种适宜的可诱导的表达工具是已知的(参见,例如 Sambrook et.al,1989,同上文),并且技术人员将能够应用于期望的寡糖的分别适合的一种。

[0045] 在本文的上下文中,关于基因的“调节的”通常被理解为这样的基因,其表达可以以受控方式进行调节,例如下调或上调,即由调节的基因编码的合成的蛋白的量(例如去调节/下调或上调)与未调节的基因不同。

[0046] 根据本发明的另一方面,通过另外加入培养基并表达糖苷酶的第二微生物来生产糖苷酶。

[0047] 在此实施方式中,由微生物表达的糖苷酶是天然存在的糖苷酶或由已被稳定整合至第二微生物的基因组的核酸序列编码的糖苷酶。此实施方式特别适用于用于生产寡糖的连续发酵过程,其中,例如提供两个单独的发酵容器,同时一个容器用于寡糖合成反应并且第二容器基本用于降解不需要的糖。

[0048] 因此,以及根据本发明的某些方面,根据本发明的方法是间歇或连续方法。

[0049] 因此,根据本发明的一个方面,即在连续方法中,在宿主微生物的培养步骤中,将糖苷酶不断地添加至培养基,例如通过提供表达糖苷酶的菌株,然而可以在空间上分开糖苷反应和分解代谢反应。

[0050] 根据另一方面,即在间歇(batch)方法或间歇进料方法中,水解分解反应限于特定的时间段。

[0051] 根据本发明的另一方面,寡糖回收自培养的宿主微生物的上清液,该上清液通过离心培养的宿主微生物以获得上清液和宿主微生物沉淀(颗粒, pellet)而获得。

[0052] 借助于新提供的方法,可以从其中培养宿主微生物的培养基重新获得产生的寡糖,因为在微生物细胞中产生的寡糖优选转运至培养基,因此,在微生物的细胞已经从培养基分离以后,使得毫不费力地能够从上清液回收寡糖。

[0053] 此外,根据本发明的另一方面,在添加糖苷酶以前,分开宿主微生物与其中培养宿主微生物的优选的液体培养基可以产生上清液,其中在上清液中包含产生的寡糖。向上清液,可以添加糖苷酶。

[0054] 根据另一方面,期望的寡糖选自2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL)、3-岩藻糖基乳糖(3-FL)、二岩藻糖基乳糖(difucosyllactose)(DF-L)、3'-唾液酸乳糖(3'-SL)、6'-唾液酸乳糖(6'-SL)、3-岩藻糖基-3'-唾液酸乳糖(F-SL)、乳-N-四糖(LNT)、乳-N-新四糖(LNneoT)、乳-N-岩藻糖五糖(fucopentaose)(LNFP-I,II,III,V)、乳-N-二岩藻糖六糖(LNDH-I和II)、乳-N-唾液酸五糖(sialylpentaose)(LSTa,b和c)、岩藻糖基-乳-N-唾液酸六糖(F-LSTa,b和c)、二唾液酸-乳-N-六糖(DS-LNT)以及尤其是选自那些表1所示的那些或它们的衍生物。在此方面,对于寡糖的生产,明确提到EP 2 479 263A1或者来自EP 2 439 264或者来自WO 2010/142305,其内容特此明确提及并且作为本发明的主题。

[0055] 表1:根据本发明可以产生的寡糖的列表(图11)

编号	名称	缩写	寡糖
1	2'-岩藻糖基乳糖	2'-FL	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Gluc
2	3-岩藻糖基乳糖	3-FL	Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-3)
3	2',3-二岩藻糖基乳糖	DF-L	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-3)
5	乳-N-三糖 II	LNT II	GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
6	乳-N-四糖	LNT	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
7	乳-N-新四糖	LNnT	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
8	乳-N-岩藻糖五糖 I	LNFP I	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
9	乳-N-新岩藻糖五糖 I	LNnFP I	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
10	乳-N-岩藻糖五糖 II	LNFP II	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-4)
11	乳-N-岩藻糖五糖 III	LNFP III	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-3)
12	乳-N-岩藻糖五糖 V	LNFP V	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-3)
13	乳-N-新岩藻糖五糖 V	LNnFP V	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-3)
14	乳-N-二岩藻糖六糖 I	LNDH I	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-2) Fuc(α1-4)
15	乳-N-二岩藻糖六糖 II	LND	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc Fuc(α1-4) Fuc(α1-3)
16	6'-半乳糖基乳糖	6'-GL	Gal(β1-6)Gal(β1-4)Gluc
17	3'-半乳糖基乳糖	3'-GL	Gal(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
18	乳-N-六糖	LNH	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Gluc Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)
19	乳-N-新六糖	LNnH	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Gluc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)
20	对-乳-N-六糖	paraLNT	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
21	对-乳-N-新六糖	paraLNnH	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
22	二岩藻糖基-乳-N-新六糖	DF-LNnH	Fuc(α1-3)

[0056]

酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、乳杆菌种 (乳酸菌种, *Lactobacillus species*) 或酵母属菌种菌株 (*Saccharomyces sp. strain*)。

[0063] 细菌大肠杆菌、乳杆菌属菌种、和谷氨酸棒杆菌以及酵母菌酵母属菌种具有以下优点:这些微生物在实验室环境下可以容易且廉价地生长,以及已深入研究上述细菌和酵母菌超过60年。

[0064] 因此,在优选的实施方式中,在根据本发明的方法中使用的以及在其中另外要求的宿主微生物选自细菌和酵母菌,并且优选是大肠杆菌菌株。

[0065] 根据本发明的另一方面,在根据本发明的方法或应用中,采用的并且优选表达糖苷酶的宿主微生物进一步表达用于糖分解代谢途径的另外并不存在于微生物中的蛋白,上述蛋白选自以下的至少一种:当使用半乳糖苷酶时,半乳糖分解代谢途径蛋白,如由半乳糖操纵子所编码的;当使用岩藻糖苷酶时,岩藻糖分解代谢途径;使用 β -N-乙酰基己糖胺酶时,N-乙酰基葡萄糖胺分解代谢途径。通过使用 β -N-乙酰基己糖胺酶用于降解含有末端N-乙酰基葡萄糖胺的寡糖,证明有益的是过表达涉及单糖N-乙酰基葡萄糖胺的分解代谢的酶。同样,如果释放的单糖是L-岩藻糖,有利的是,表达L-岩藻糖分解代谢途径。对于唾液酸等同样如此。

[0066] 此实施方式具有的优点是,借助于糖分解代谢途径的去调节,通过糖苷酶的作用所释放的单糖可以从发酵培养基中高效和有效发除去。可替换地,通过这种方式,作为前体添加的单糖也可以从发酵培养基同样地除去。因此,除糖苷酶之外,宿主微生物还表达用于糖分解代谢途径,如半乳糖分解代谢途径的蛋白,以防止降解产物半乳糖的累积。然而,糖苷酶和糖分解代谢途径不一定要由个别的生物来表达,它们还可以由两种不同的共培养的菌株来表达,或将糖苷酶加入能够进行期望的单糖分解代谢的适宜的菌株。

[0067] 根据另一实施方式,以及可替代地表达用于释放的单糖的糖分解代谢途径,可以将非期望的副产物、未使用的起始底物和中间产物的降解过程中释放的单糖,通过表达它的补救途径赋予到它的核苷酸活化形式并再用于寡糖合成。因此,例如,可以将岩藻糖赋予至GDP-岩藻糖,或将唾液酸赋予到CMP-Neu5Ac。

[0068] 例如,如果岩藻糖产生为释放的单糖,则可以使用它的补救途径(即,在宿主微生物中已生成过表达的(高度调节的)岩藻糖)以将岩藻糖赋予到GDP-岩藻糖。

[0069] 在所谓的“岩藻糖补救途径”中,首先将岩藻糖通过酶岩藻糖激酶磷酸化至岩藻糖-1-磷酸酯。然后,通过酶岩藻糖-1-P-鸟苷酰转移酶的作用,将岩藻糖-1-磷酸酯转化成GDP-岩藻糖。因此,根据一个方面,可以采用微生物,其被基因修饰以表达岩藻糖激酶和鸟苷酰转移酶。根据一种实施方式,使用细菌酶Fkp,其表示具有岩藻糖激酶和L-岩藻糖-1-P-鸟苷酰转移酶的首先确定的双功能酶。生成上述基因修饰微生物的详细描述可以见W0 2010/070104 A1,其公开内容被明确提到并且通过引用方式明确加入其内容。

[0070] 对于更复杂的寡糖的发酵,采用糖苷酶的组合,即表达在宿主微生物中的,如 β -半乳糖苷酶和 β -N-乙酰基己糖胺酶,后者将乳-N-三糖II (LNT-2) 特异性地降解成N-乙酰基葡萄糖胺和乳糖。然后,释放的N-乙酰基葡萄糖胺和半乳糖胺通过去调节或引入特异性单糖内向转运蛋白(输入蛋白, importer)和单糖特异性分解代谢途径,可以从发酵培养基同样有效地除去。

[0071] 根据本发明的方法和应用的另一实施方式,待采用的宿主微生物是野生型的,表

达用于糖分解代谢途径的蛋白,该蛋白选自以下的至少一种:当使用半乳糖苷酶时,半乳糖分解代谢途径蛋白;当使用岩藻糖苷酶时,岩藻糖分解代谢途径;使用 β -N-乙酰基己糖胺酶,N-乙酰基葡萄糖胺分解代谢途径;唾液酸,其中在上述方法或上述应用期间,在宿主微生物中,诱导上述蛋白的过表达。

[0072] 此实施方式具有的优点是,可以采用已经包含和表达用于糖分解代谢途径的所期望的蛋白的宿主微生物,其中诱导上述蛋白的过表达。可以例如通过将编码这些蛋白的核酸序列置于诱导型启动子的调控下来实现过表达,使得基因/多核苷酸的表达可以特异地设定目标,并且以该种方式过表达。

[0073] 因而,表达系统结构体含有调控区,其调节并起始表达。一般地,在此方面,适合于在宿主中保持、增殖或表达蛋白和/或适合于表达一种蛋白的任何系统或载体可以用于表达。通过各种众所周知的和常规的技术的任何一种(如,例如,那些在Sambrook et al.中陈述的技术,参见上文)可以将适当的DNA序列插入表达系统。

[0074] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语一般具有和本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。一般地,本文中使用的术语和在以上和以下描述的细胞培养、分子遗传学、有机化学和核酸化学以及杂交中的实验室程序是本领域中众所周知的和通常采用的那些术语和实验室程序。

[0075] 进一步的优点得出自实施方式和附图的描述。

[0076] 显然的是上面提到的特点和仍在下面将要解释的特点不仅可以用于分别指定的组合而且可以用于其它组合或它们本身,且没有偏离本发明的范围。

附图说明

[0077] 本发明的若干实施方式在附图中示出并在以下描述中更详细地加以解释。在图中:

[0078] 图1,该图示出利用 β -半乳糖苷酶分解乳-N-四糖和乳糖。A.示出10mM乳糖和10mM乳-N-四糖(真实标准)的叠加的HPLC层析图。B.示出在酶添加以后立即获取的含有10mM乳糖和10mM乳-N-四糖的 β -半乳糖苷酶反应的HPLC层析图。C.示出在酶添加以后3小时获取的含有10mM乳糖和10mM乳-N-四糖的 β -半乳糖苷酶反应的HPLC层析图;

[0079] 图2示出的图显示根据本发明的一种实施方式,适用于生产以下寡糖的具有第一发酵器和第二发酵器的连续发酵装置,如2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、2'3-二岩藻糖基乳糖、3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖;

[0080] 图3示出在将表达 β -半乳糖苷酶的大肠杆菌菌株加入发酵以前,无细胞培养基样品的HPLC分析。上述菌株还表达半乳糖分解代谢途径以防止半乳糖累积;

[0081] 图4示出在将第二表达 β -半乳糖苷酶的大肠杆菌菌株加入发酵以后,无细胞培养基样品的HPLC分析;

[0082] 图5示出的图显示了根据本发明的一种实施方式的可用于生产2'-岩藻糖基乳糖的连续发酵装置。第一发酵器容器用于2'-岩藻糖基-乳糖的连续合成,而第二发酵器容器,除2'岩藻糖基乳糖的合成之外,还用于除去过量底物(乳糖)和其它糖副产物;

[0083] 图6示出获取自发酵器1的产物流的HPLC分析。无细胞发酵液的分析表明乳糖和2'-岩藻糖基乳糖的存在;

[0084] 图7示出了获取自发酵器2的产物流的HPLC分析。HPLC分析显示缺乏底物乳糖,该底物乳糖由通过编码 β -半乳糖苷酶和半乳糖操纵子的大肠杆菌lacZ基因的表达的菌株代谢,该基因用于释放的半乳糖的代谢;

[0085] 图8示出在将表达 β -半乳糖苷酶和 β -N-乙酰基-己糖胺酶的大肠杆菌菌株加入至发酵之前,无细胞培养基样品的HPLC分析。上述菌株还表达半乳糖分解代谢途径以防止半乳糖累积;

[0086] 图9示出在糖苷酶和 β -N-乙酰基己糖胺酶处理以后获取的样品。HPLC层析图的比较清楚地表明在 β -半乳糖苷酶和 β -N-乙酰基己糖胺酶处理以前存在于样品中的乳糖和乳-N-三糖II的消失;

[0087] 图10示出在重组大肠杆菌菌株的构建中使用的半乳糖操纵子的序列;以及

[0088] 图11示出了根据本发明可以产生的寡糖的列表。

具体实施方式

[0089] 向含有发酵衍生的乳-N-四糖和乳糖(均为10mM浓度)的溶液添加 β -半乳糖苷酶;添加50单位/ml(最终浓度)的 β -半乳糖苷酶(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich Germany, 目录号G6008)以分解葡萄糖和半乳糖中的乳糖,用于糖的更好的层析分离(例如通过尺寸依赖性凝胶过滤层析)。可以表明,在几秒钟内,乳糖被分解成它的单糖半乳糖和葡萄糖,而乳-N-四糖依然如此(还参见图1)。这些实验证明了纯化的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的高度选择性作用,其仅选择性地水解Gal(β 1-4)Glc糖苷键而不水解存在于乳-N-四糖的非还原端处的Gal(β 1-3)GlcNAc糖苷键。因此,图1-A示出10mM乳糖和10mM乳-N-四糖(真实标准)的叠加的HPLC层析图,以及图1-B示出在添加酶以后立即获取的含有10mM乳糖和10mM乳-N-四糖的 β -半乳糖苷酶反应的HPLC层析图。图1-C示出在添加酶后3小时获取的含有10mM乳糖和10mM乳-N-四糖的 β -半乳糖苷酶反应的HPLC层析图。

[0090] 图2示出了根据本发明的一种实施方式,可用于生产如下寡糖的连续发酵装置,如2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、2',3-二岩藻糖基乳糖、3'-唾液酸乳糖或6'-唾液酸乳糖和它们的衍生物。

[0091] 第一发酵器容器("发酵器1")用于期望的寡糖的连续合成,而含有表达适宜的糖苷酶(如 β -半乳糖苷酶)的微生物菌株的第二发酵器容器("发酵器2"),用于降解过量单糖,如存在于培养基中的乳糖和其它糖,它们干扰期望的寡糖产物的随后的纯化。借助于适宜的导管,彼此连接发酵器1和发酵器2,并且用泵将发酵淤浆从发酵器1转移至发酵器2。另一个泵从发酵器2除去含有期望的寡糖产物的流。

[0092] 在2'-岩藻糖基乳糖的生产中通过糖苷酶处理来分解糖混合物

[0093] 2'-岩藻糖基乳糖进料-间歇发酵,采用重组2'-岩藻糖基乳糖合成大肠杆菌菌株(大肠杆菌BL21(DE3) Δ lacZ,其含有由wbgL基因(EP 11 1151571.4)编码的基因组整合2'-岩藻糖基转移酶,并且具有大肠杆菌lacY、manB、manC、gmd和fcl的另外的拷贝,均在强组成型四环素启动子的调控下,其含有功能性半乳糖操纵子(gal operon),包含基因galM、galK、galT和galE;见图10;正向引物P-TTACTCAGCAATAAACTGATATTCGTCAGGCTGG(SEQ ID No.2);反向引物P-TTGATAATCTCGCGCTCTCAGCAGTCAGACTTCCATATAGAGCGTAATTTCCGTTAACGTCGGTAGTGCTGACCTTGCCGAGG(SEQ ID.No.3)),生长在限定的盐培养基中(7g L⁻¹NH₄H₃PO₄、

7g L⁻¹K₂HPO₄、2g L⁻¹KOH、0.37g L⁻¹柠檬酸、1ml L⁻¹消泡剂(Struktol J673, Schill+Seilacher)、1mM CaCl₂、4mM MgSO₄、由以下组成的微量元素, 0.101g L⁻¹次氨基三乙酸pH 6.5、0.056g L⁻¹柠檬酸铁铵、0.01g L⁻¹MnCl₂x 4H₂O、0.002g L⁻¹CoCl₂x 6H₂O、0.001g L⁻¹CuCl₂x 2H₂O、0.002g L⁻¹硼酸、0.009g L⁻¹ZnSO₄x 7H₂O、0.001g L⁻¹Na₂MoO₄x 2H₂O、0.002g L⁻¹Na₂SeO₃、0.002g L⁻¹NiSO₄x 6H₂O, 其中, 2%甘油作为碳源; 甘油进料由甘油800g L⁻¹、MgSO₄ 2, 64g L⁻¹和微量元素溶液4ml L⁻¹组成。对于2'-岩藻糖基乳糖形成, 采用216g L⁻¹的乳糖进料。通过使用氨溶液(25%v/v)来控制pH, 其还充当氮源。供给乳糖作为用于2'-岩藻糖基乳糖生产的前体。在30°C下并在恒定通气和搅拌下培养进料母料90小时。在开始发酵以后的90小时, 大多数添加的乳糖转化成2'-岩藻糖基乳糖。

[0094] 为了除去仍然存在于发酵上清液中的大部分或全部乳糖, 在发酵开始后的90小时将第二细菌菌株加入至发酵容器(见图2中的装置)。添加的第二细菌菌株与第一次采用的细菌菌株基因相同, 然而, 不同仅在于基因组整合的β-半乳糖苷酶的表达以及表达功能性半乳糖操纵子(见图10)(对于D-半乳糖降解)。添加的辅助细菌菌株的孵育导致在5小时内残余乳糖的消失。每1L发酵液添加大约25ml第二β-半乳糖苷酶表达细菌菌株的初始培养物。

[0095] 对于HPLC分析, 使用无细胞无菌过滤培养基样品, 并通过使350μL样品穿过脱盐柱(Strata ABW (55μm, 70A) phenomenex, Aschaffenburg, Germany)加以脱盐。对于HPLC分析, 使用ReproSil Carbohydrate 5μm, 250x 4.6mm柱(Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany), 并具有以下条件: 洗脱液乙腈/ddH₂O (68:32), 等度条件(无梯度条件, isocratic condition)并具有1.4ml/min的流动速率(柱烘箱设定为35°C); 使用蔗糖作为用于量化的内部标准; 采用真实标准用于乳糖和2'-岩藻糖基乳糖的鉴定。为了检测, 采用折射率检测器(RID)。在发酵过程的最后, 引入糖苷酶分解步骤导致产生的发酵滤液的复杂性的显著降低。图3示出了在糖苷酶处理以前获取的无细胞发酵培养基的分析以及图4示出了在糖苷酶处理以后获取的样品。HPLC层析图的比较清楚地表明在β-半乳糖苷酶处理以前存在于样品中的乳糖的消失。该菌株还表达半乳糖分解代谢途径以防止D-半乳糖累积。

[0096] 在2'-岩藻糖基乳糖的连续生产中通过糖苷酶处理来分解糖混合物

[0097] 2'-岩藻糖基乳糖的连续合成通过使用两个发酵容器来实现, 发酵器1包含缺乏乳糖降解的2'-岩藻糖基乳糖发酵菌株(大肠杆菌BL21 (DE3) A1acZ, 其含有由wbgL基因(EP 11 1151 571.4)编码的基因组整合2'-岩藻糖基转移酶, 并且具有大肠杆菌lacY、manB、manC、gmd和fcl的另外拷贝, 均在强组成型四环素启动子的调控下, 含有功能性半乳糖操纵子(见图10), 包含基因galM、galK、galT和galE)。发酵器2含有初始培养物, 其基因上类似于发酵器1的使用的2'-岩藻糖基乳糖发酵菌株, 不同之处在于, 此菌株另外表达编码β-半乳糖苷酶的大肠杆菌lacZ基因(见图5所示的装置)。对于两个发酵器, 使用限定的盐培养基, 其含有7g L⁻¹NH₄H₃PO₄、7g L⁻¹K₂HPO₄、2g L⁻¹KOH、0.37g L⁻¹柠檬酸、1ml L⁻¹消泡剂(Struktol J673, Schill+Seilacher)、1mM CaCl₂、4mM MgSO₄、由以下组成的微量元素, 0.101g L⁻¹次氨基三乙酸pH 6.5、0.056g L⁻¹柠檬酸铁铵、0.01g L⁻¹MnCl₂x 4H₂O、0.002g L⁻¹CoCl₂x 6H₂O、0.001g L⁻¹CuCl₂x 2H₂O、0.002g L⁻¹硼酸、0.009g L⁻¹ZnSO₄x 7H₂O、0.001g L⁻¹Na₂MoO₄x 2H₂O、0.002g L⁻¹Na₂SeO₃、0.002g L⁻¹NiSO₄x 6H₂O, 并具有10mM乳糖作为底物以及2%甘油作为碳源。

[0098] 如所说明的,向发酵器1供给恒定进料的培养基($7\text{g L}^{-1}\text{NH}_4\text{H}_3\text{PO}_4$ 、 $7\text{g L}^{-1}\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $2\text{g L}^{-1}\text{KOH}$ 、 0.37g L^{-1} 柠檬酸、 1ml L^{-1} 消泡剂、 1mM CaCl_2 、 4mM MgSO_4 、痕量元素,其由以下组成, 0.101g L^{-1} 次氨基三乙酸pH 6.5、 0.056g L^{-1} 柠檬酸铁铵、 $0.01\text{g L}^{-1}\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.002\text{g L}^{-1}\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.001\text{g L}^{-1}\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 0.002g L^{-1} 硼酸、 $0.009\text{g L}^{-1}\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.001\text{g L}^{-1}\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.002\text{g L}^{-1}\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 、 $0.002\text{g L}^{-1}\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$),其含有40mM乳糖和5%甘油。使用具有工作容积为1L的New Brunswick平行发酵系统(Bio-Flow/CellGen 115),施加20ml/h进料溶液的连续流。然后三个同步工作的泵的作用导致20ml/小时的产物流的类似生产,其几乎仅包含2'-岩藻糖基乳糖作为唯一的糖产物。

[0099] 图6示出了取自发酵器1的产物流的HPLC分析。无细胞发酵液的分析表明乳糖和2'-岩藻糖基乳糖的存在。相反,图7示出获自发酵器2的产物流的HPLC分析。HPLC分析表明缺乏底物乳糖,其由通过编码 β -半乳糖苷酶的大肠杆菌lacZ基因和半乳糖操纵子的表达的菌株加以代谢,用于代谢释放的半乳糖。

[0100] 在乳-N-四糖的生产中通过糖苷酶处理来分离糖混合物

[0101] 在乳-N-四糖自乳糖的发酵中,除添加的底物之外还可以积聚乳-N-三糖II(LNT-2)。为了获得用于纯化乳-N-四糖的更经济的发酵滤液,乳糖和LNT-2的特异性降解证明是合乎需要的。

[0102] 为此目的,构建了菌株,除 β -半乳糖苷酶之外,其还表达 β -N-乙酰基己糖胺酶(由双歧杆菌属两歧双歧杆菌JCM1254bbh1基因编码),用于将LNT-2特异性地降解成N-乙酰基葡萄糖胺和乳糖。将获得的乳糖进一步分解成葡萄糖和半乳糖。鉴于获得的葡萄糖被有机体有效地代谢,采用的大肠杆菌BL21(DE3)菌株不能分解代谢半乳糖,这是由于DE3原噬菌体整合进入半乳糖操纵子。为了半乳糖的有效降解,通过Lamba Red重组蛋白(来自附加型载体系统)的同时表达,扩增来自大肠杆菌K菌株JM 109的半乳糖操纵子并转化进入大肠杆菌BL21(DE3)。通过在含有半乳糖的基础培养基琼脂平板和含有半乳糖的McConkey琼脂平板上筛选它们来分离能够半乳糖降解的大肠杆菌BL21转化体。

[0103] 在完成乳-N-四糖发酵以后(应该注意的是,可替换地,可以经由酶或化学合成反应获得寡糖混合物),将工程化糖苷酶菌株加入至间歇发酵。类似于上述2'-岩藻糖基乳糖发酵,非期望的寡糖的降解在数分钟至数小时内完成,这取决于用于分离步骤的培养物的量。

[0104] 在发酵过程的最后,引入的糖苷酶分解步骤导致产生的发酵滤液的复杂性的显著降低。图8示出在糖苷酶和 β -N-乙酰基己糖胺酶处理以前获取的无细胞发酵培养基的分析以及图9示出在糖苷酶和 β -N-乙酰基己糖胺酶处理以后获取的样品。HPLC层析图的比较清楚地表明在 β -半乳糖苷酶和 β -N-乙酰基己糖胺酶处理以前存在于样品中的乳糖和乳-N-三糖II的消失。

[0105] 如上所示,根据本发明的应用和方法对于来自微生物发酵反应的人乳寡糖(HMO)的纯化是特别有用的。几乎所有的人乳寡糖含有在还原端的Gal- β -1,4-Glc二糖亚基。可以通过完全发酵来获得乳糖部分(Gal- β -1,4-Glc)亚基或将乳糖作为底物加入微生物发酵。通常有利的是,为实现最大容积产率,将过量的乳糖加入发酵。

[0106] 根据本发明,并且为了除去乳糖或其不期望的副产物,在发酵的特定的时间点将糖苷酶如 β -半乳糖苷酶加入发酵,从而导致乳糖和副产物的特异性降解。

[0107] 如上所述,可替换地,可以在生产菌株中诱导转录-调节的(或以其它方式活性调节的)糖苷酶,或可以在特定的时间点将表达所期望活性的另外的菌株加入发酵。

[0108] 如上文还提及和表明的,本发明的方法进一步涉及糖分解代谢途径的去调节以从发酵培养基高效地和有效地除去由糖苷酶的作用所释放的单糖。可替换地,通过这种方式还可以从发酵培养基同样除去作为前体添加的单糖。

序列表

<110> 詹尼温生物技术有限责任公司

<120> 寡糖的生产

<130> 2827P108wo

<160> 3

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1

<211> 4579

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 1

```

ttactcagca ataaactgat attccgtcag gctggaatac tcttcgccag gacgcaggaa 60
gcagtccggt tgcggccatt cagggtggtt cgggctgtcc ggtagaaact cgctttccag 120
agccagccct tgccagtcgg cgtaaggttc ggttccccgc gacggtgtgc cgccgaggaa 180
gttgccggag tagaattgca gagccggagc ggtggtgtag accttcagct gcaatTTTTT 240
atctgctgac cagacatgcg ccgccacttt cttgccatcg cttttggcct gtaacaagaa 300
tgcgtgatcg taacctttca ctttgcgctg atcgtcgtcg gcaagaaact cactggcgat 360
gattttggcg ctgcggaaat caaaagacgt tccggcgaca gatttcaggc cgtcgtgcgg 420
aatgccgcct tcatcaaccg gcagatattc gtccgccaga atctgcaact tgtgattgcg 480
cacgtcagac tgctcgccgt caagattgaa atagacgtga ttagtcatat tcaccgggca 540
aggtttatca actgtggcgc gataagtaat ggagatacgg ttatcgtcgg tcagacgata 600
ttgcaccgtc gcgccgagat tacccgggaa gccctgatca ccatcatctg aactcagggc 660
aaacagcacc tgacgatcgt tctggttac aatctgccag cgacgtttgt cgaacccttc 720
cggccccgcg tgcagctggt taacgccctg acttggcgaa agcgtcacgg tttcaccgtc 780
aaaggtataa cggctattgg cgatacggtt ggcataacga ccaatagagg cccccagaaa 840
cgcgccctga tcctgatagc attccgggct ggcacagccg agcagcgcct cgcgacgct 900
gccatcgaa agcggaaatac gggcgaaag taaagtcga cccagttcca tcagcgtgac 960
taccatccct gcgttgttac gcaaagttaa cagtcggtac ggctgacat cgggtgccag 1020
tgcgggagtt tcgttcagca ctgtcctgct cttgtgatg gtttacaac gtaaaaagtc 1080
tctttaatac ctgtttttgc ttcatattgt tcagcgacag cttgctgtac ggcaggcacc 1140
agctcttccg ggatcagcgc gacgatacag ccgccaatc cgccgccggt catgcttacg 1200
ccacctttgt cgccaatcac agctttgacg atttctacca gagtgtcaat ttgcggcacg 1260
gtgatttcga aatcatcgcg catagaggca tgagactcgg ccatcaactc gcccatacgt 1320
ttcaggtcgc cttgctccag cgcgctggca gttcaacgg tgcgggcggt ttcagtcagt 1380
atatgacgca cgcgttttgc cacgatcggg tccagttcat gcgcaacagc gttgaactct 1440
tcaatggtga catcacgcag ggetggetgc tggaagaaac gcgcaccggt ttcgactgt 1500
tcacgacggg tgttgattc gctgccaacc agggtacgtt tgaagttact gttgatgatg 1560
acgacagcca cacctttggg catggaaact gctttgttcc ccagtgagcg gcaatcgatc 1620

```

agcaaggcat gatctttctt gccgagcgcg gaaattagct gatccatgat cccgcagtta 1680
cagcctacaa actggttttc tgcttcctga ccgttaagcg cgatttgtgc gccgtccagc 1740
ggcagatgat aaagctgctg caatacggtt ccgaccgcga cttccagtga agcggaaagaa 1800
cttaaccggg caccctgcgg cacattgccg ctgatcacca tgtccacgcc gccgaagctg 1860
ttgttacgca gttgcagatg tttcaccacg ccacgaacgt agttagccca ttgatagttt 1920
tcatgtgcga caatgggcgc atcgagggaa aactcgtcga gctgattttc ataatcggct 1980
gccatcacgc gaacttttac gtcatcgcgt ggtgcacaac tgatcacggt ttgataatca 2040
atcgcgcagg gcagaacgaa accgtcgttg tagtcggtgt gttcaccaat caaattcacg 2100
cggccaggcg cctgaatggt gtgagtggca gggtagccaa atgcgttggc aaacagagat 2160
tgtgtttttt ctttcagact cttttcttac actccggatt cgcgaaaatg gatatcgctg 2220
actgcgcgca aacgctctgc tgctgttct gcggtcaggc ctctcgggt ctctgccagc 2280
atctcataac caaccataaa tttacgtacg gtggcggagc gcagcagagg cggataaaag 2340
tgcgcgtgca gctgccagtg ttgattctct tcgccattaa atggcgcgcc gtgccagccc 2400
atagagtagg ggaaggagca ctggaagagg ttgtcataac gactggtcag ctttttcaac 2460
gccagcgcga gatcgtctgc ctgggcgtcg gtcaaatcgg tgatccgtaa aacgtgggct 2520
ttgggcagca gtagcgtttc gaacggccag gcagcccagt aaggcacgac ggctaaccag 2580
tgttcggttt cgacaacggt acggctaccg tctgccagct cgcgctgaac ataatccacc 2640
agcattgggtg atttctgttc ggcaaaaat tctttttgca ggcggtcttc gcgctcagct 2700
tcgttaggca ggaagctatt tgcccaaact tgaccgtgcg gatgcgggtt agagcagccc 2760
atcgcgcgc ctttgttttc aaaaacctgc acccatgggt acgttttccc cagttctgcg 2820
gtttgctcct gccagtttt gacgatttcc gtcaatgctg caacgctgag ctctggcagc 2880
gttttactgt gatccggtga aaagcagatc acccgctgg tgccgcgcgc gctctggcaa 2940
cgcatcagcg gatcgtgact ttctggcgca tctggcgtgt cagacatcaa agccgcaaag 3000
tcattagtga aaacgtaagt cccggtgtaa tcggggtttt tategcctgt caccgcaca 3060
ttacctgcgc agaggaagca atctggatcg tgcgcaggtg acacctgtt ggctggcggt 3120
tcctgcgccc cctgccaggg gcgcttagcg cggcgcggtg aaaccagaat ccattgcccg 3180
gtgagcgggt ttagcggcg atgtggatga tcaacgggat taaattgcgt catggtcgtt 3240
ccttaatcgg gatatccctg tggatggcgt gactgccagt gccaggtgtc ctgcgccatt 3300
tcatcgagtg tgcgcgttac gcgccagttc agttcacggt cggctttgct ggcgtccgcc 3360
cagtaggccg gaaggtcgcc ctgcgcagc ggtgcaaaat gataattaac cggtttgccg 3420
caggctttgc tgaaggcatt aaccacgtc agcacgtgt tgcctacgcc agcggcagg 3480
ttgtagatgt gtacgcctgg cttgttcgcc agtttttcca tcgccagc gtagccgtcc 3540
gccagatcca ttacgtggat gtaatcgcgt acgccagtac catcttcggt cggataatcg 3600
ttaccaaaaa tcgccagcga gtcgcgacgg cctacagcaa cctgggcgat gtatggcatc 3660
aggttattcg gaatgcctg cggatcttc cccatctgc ccgacggatg cgcgccaacc 3720
gggttgaagt agcgcagcag ggcaatgctc cagtccggct gggctttttg cagatcgggtg 3780
aggatctgtt ccaccatcag cttgcttttg ccgtaagggc tttgcggtgt gccggtcggg 3840
aagctttcaa cgtatggaat tttgggctga tcgccataaa cgggtggcga ggagctaaaa 3900
ataaagtttt tgacgttagc ggcgcgcatg gcgctaata ggcgcagagt gccgttgaca 3960

ttgttgcgt aatattccag cggtttttgt accgattegc ccacggcttt cagcccggcg 4020
aagtggatca cgggtgcat agcgtgatcg tgcaggatct cggtcataca cgcttcgtta 4080
cgaatatcgc cttcaacaaa cgttgatgt ttgccgcta aacgctcgat aacaggcagt 4140
acgctgcgct tactgttaca gaggttatca agaatgatga catcatgacc gttttgcagt 4200
aattgcacac aggtatgact tccaatgtaa ccgctaccac cggtaaccag aactctcata 4260
attcgctcca ttaggcttat ggtatgaaat aaccatagca taacaaagat gcgaaaagt 4320
tgacatggaa taaattagt gaatcgitta cacaagaatt tagccgtttt ttatgcgcga 4380
ttaagtgatt ataaaacaga gggtttatga atgattgcgc tttttatctg aaaaaagacg 4440
cggtttcatg cctgcatcgc tcgaaccgtt ggccggagag ggtgctaagg ccgcctccgg 4500
caaggtcagc actaccgacg ttaacggaaa ttacgctcta tatggaaagt ctgactgctg 4560
aagagcgcga gattatcaa 4579

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400> 2

ttactcagca ataaactgat attccgtcag gctgg 35

<210> 3

<211> 86

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<400> 3

ttgataatct cgcgctcttc agcagtcaga ctttccatat agagcgtaat ttccgttaac 60
gtcggtagtg ctgaccttgc cggagg 86

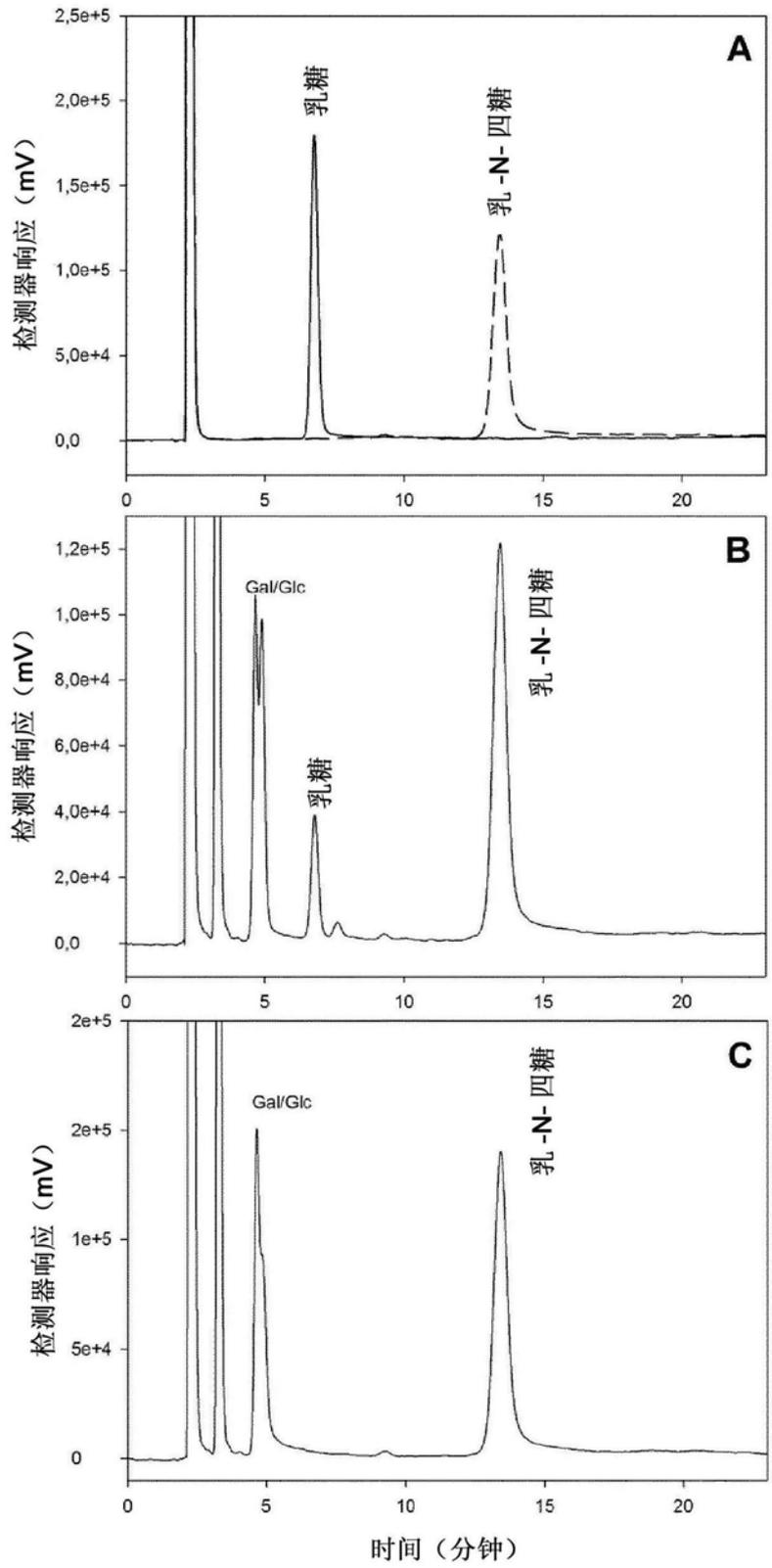


图1

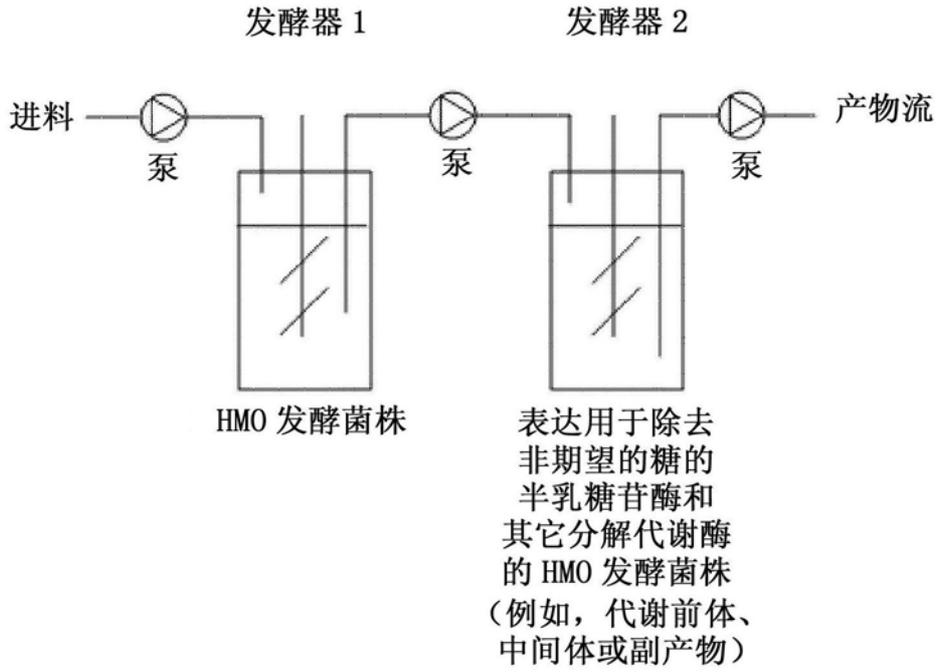


图2

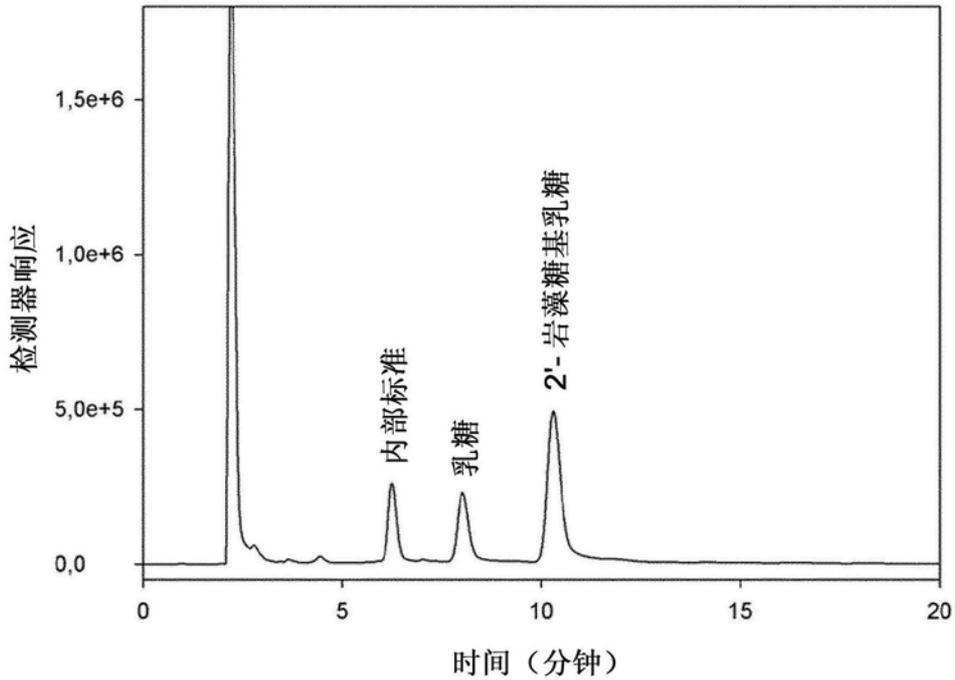


图3

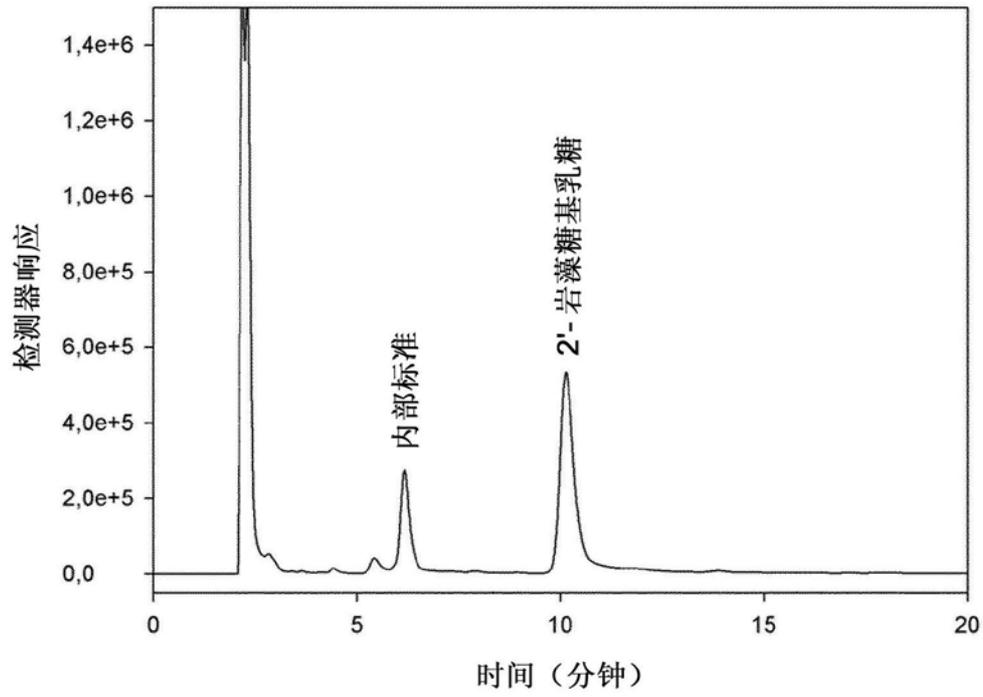


图4

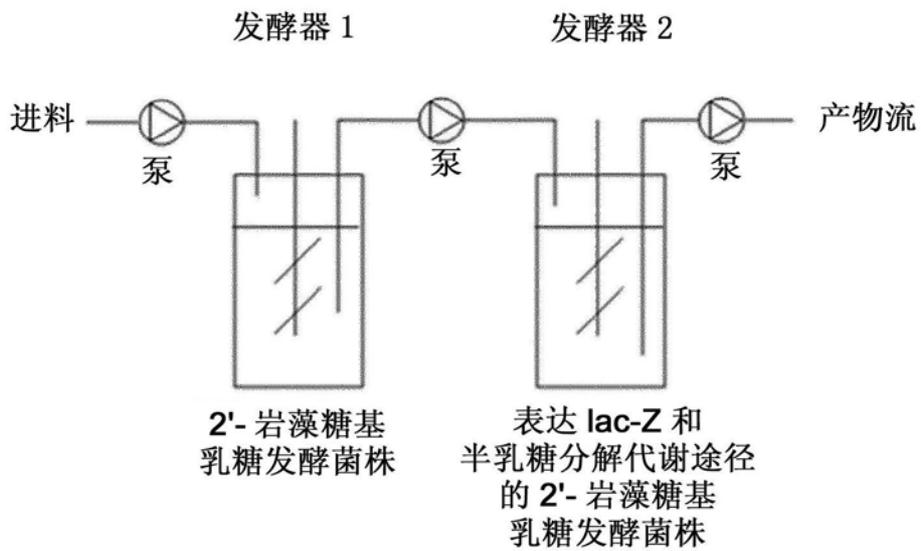


图5

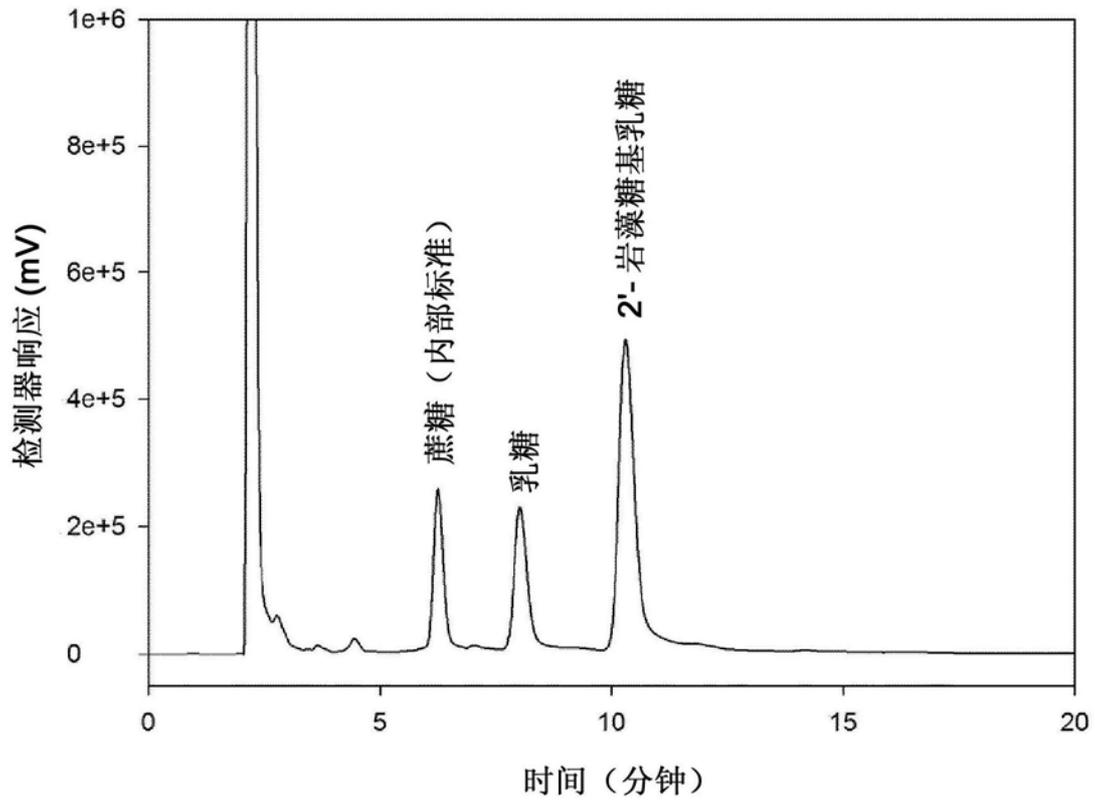


图6

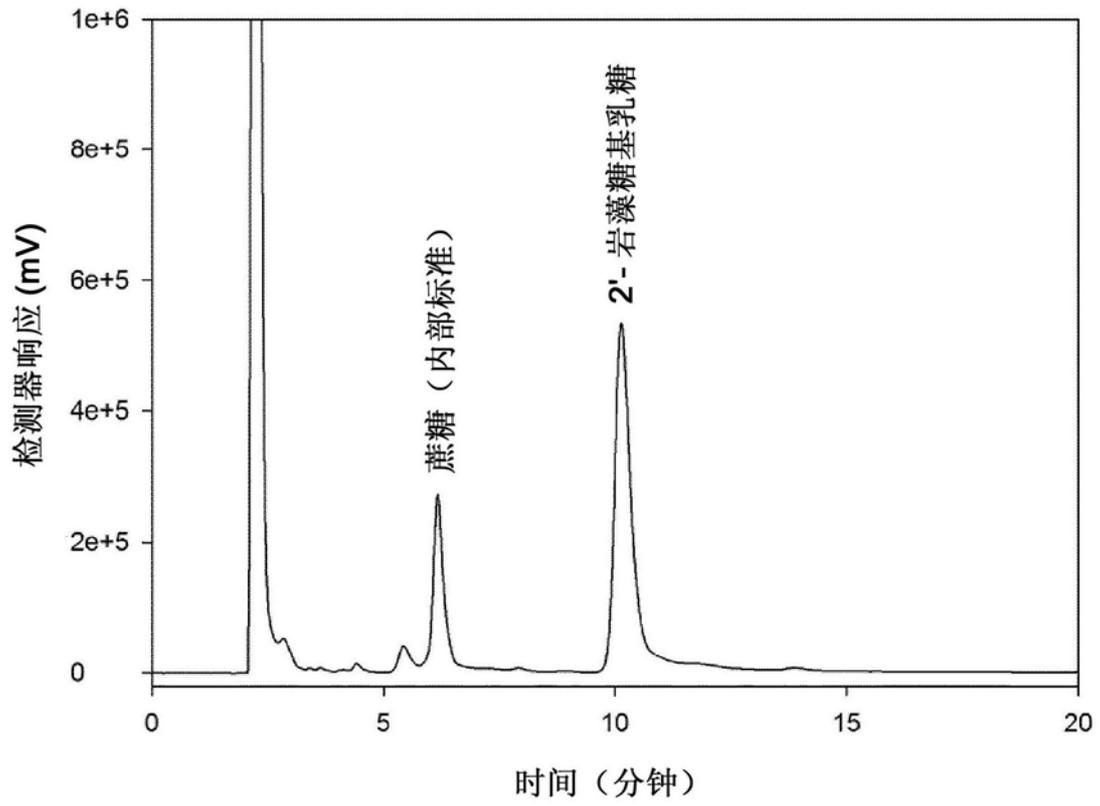


图7

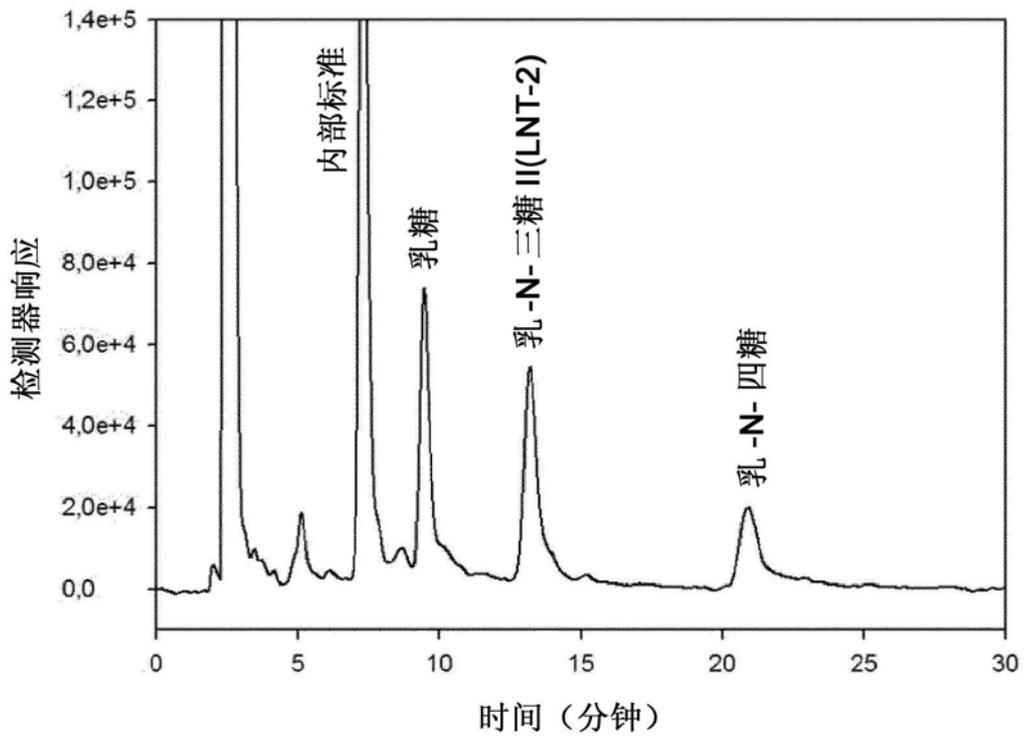


图8

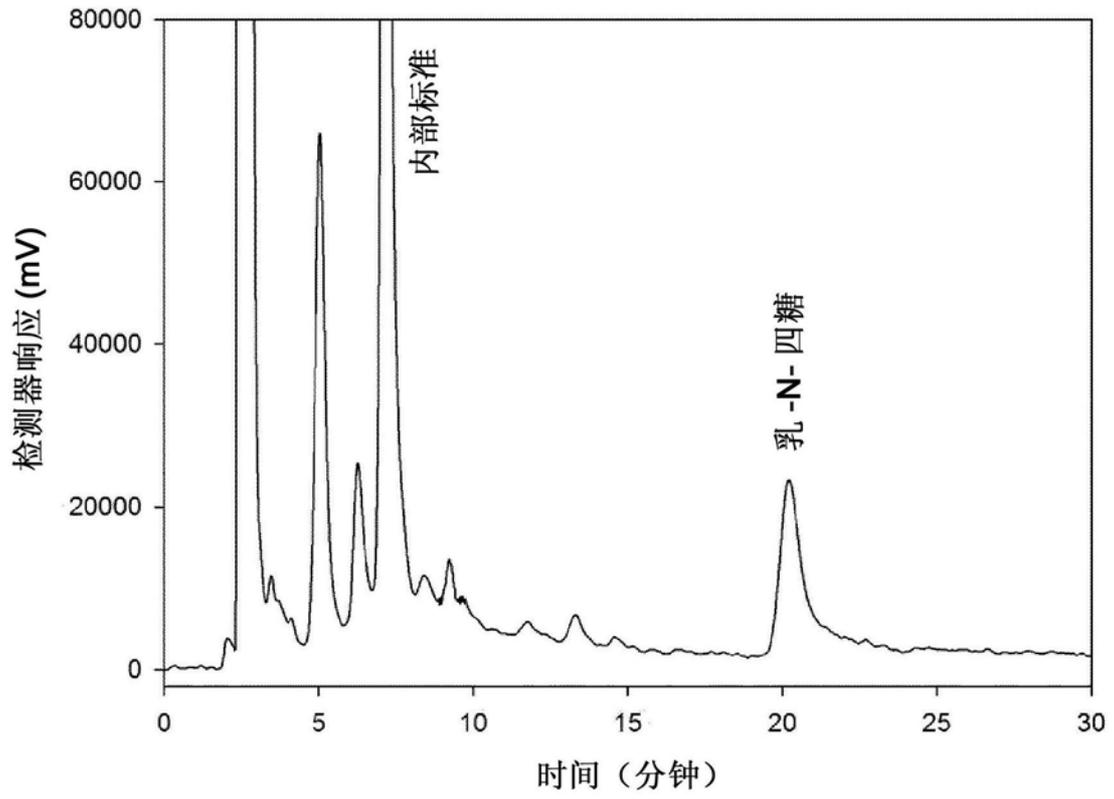


图9

半乳糖操纵子片段（获得自大肠杆菌 K 菌株 JM 109）的序列并插入至采用的大肠杆菌 BL21（DE3）菌株。

使用的半乳糖 - 操纵子片段的序列 (SEQ ID No. 1)

```
TTACTCAGCAATAAACTGATATTCCGTCAGGCTGGAATACTCTTCGCCAGGACGCAGGAAGCAGTCCGGTTGCGGCCATTC
AGGGTGGTTCCGGGCTGTCCGGTAGAACTCGCTTTCAGAGCCAGCCCTTGCCAGTCGGCGTAAGGTTCCGGTCCCGCG
ACGGTGTGCCGCCGAGGAAGTTGCCGGAGTAGAATTGCAGAGCCGGAGCGGTGGTGTAGACCTTCAGCTGCAATTTTTCA
TCTGCTGACCAGACATGCGCCGCCACTTTCTTGCCATCGCCTTTGGCCTGTAACAAGAATGCGTGATCGTAACCTTTCACTT
TGCGCTGATCGTCTGCGCAAGAACTCACTGGCGATGATTTTGGCGCTGCGGAAATCAAAGACGTTCCGGCGACAGAT
TTCAGGCCGCTGTCGCGAATGCCGCCTTCATCAACCGGCAGATATTCGTCGCCAGAATCTGCAACTTGTGATTGCGCACG
TCAGACTGCTCGCCGTCAGATTGAAATAGACGTGATTAGTCATATTCACCGGGCAAGTTTATCAACTGTGGCGCGATAA
GTAATGGAGATACGGTTATCGTCGGTCAGACGATATTGCACCGTCGCGCCGAGATTACCCGGGAAGCCCTGATCACCATC
ATCTGAACTCAGGGCAAACAGCACCTGACGATCGTTCTGGTTCACAATCTGCCAGCGACGTTTGTGCAACCTTCCGGCCC
GCCGTGACGCTGGTTAACGCCCTGACTTGGCGAAAGCGTCACGGTTTACCAGTCAAAGGTATAACGGCTATTGGCGATAC
GGTTGCATAACGACCAATAGAGGCCCCAGAAACGCGGCCTGATCCTGATAGCATTCCGGGCTGGCACAGCCGAGCAG
CGCCTCGCGACGCTGCCATCGGAAAGCGGAATACGGGCGGAAAGTAAAGTCGCACCCAGTCCATCAGCGTGACTACC
ATCCCTGCGTTGTTACGCAAAGTTAACAGTCGGTACGGCTGACCATCGGGTGCCAGTGCGGGAGTTTCGTTCAGCACTGTC
CTGCTCCTTGTGATGGTTTACAAACGTAAAAAGTCTCTTTAATACCTGTTTTGCTTCATATTGTTACAGCGACAGCTTGCTGT
ACGGCAGGACACCAGCTCTCCGGGATCAGCGCGACGATACAGCCGCCAAATCCGCCGCCGGTTCATGCGTACGCCACCTT
TGTCGCCAATCACAGCTTTGACGATTTCTACCAGAGTGTCAATTTGCGGCACGGTGATTTGAAATCATCGCGCATAGAGG
CATGAGACTCCGCCATCAACTCGCCATACGTTTTCAGGTCGCTTGTCCAGCGCGCTGGCAGCTTCAACGGTGCGGGCG
TTTTAGTCAATATGACGACGCGTTTTGCCACGATCGGGTCCAGTTCATGCGCAACAGCGTTGAACTCTTCAATGGTGA
CATCACGCAGGGCTGGCTGCTGGAAGAAACGCGCACCGGTTTTCGCACTGTTTACGACGGGTGTTGATTGCTGCCAACC
AGGGTACGTTTGAAGTACTGTTGATGATGACGACAGCCACACCTTTGGGCATGGAACTGCTTTGGTCCCCAGTGAGCGG
CAATCGATCAGCAAGGCATGATCTTTCTTGCCGAGCGCGGAAATTAGCTGATCCATGATCCCGCAGTTACAGCCTACAAAC
TGTTTTCTGCTTCTGACCGTTAAGCGCGATTTGTGCGCCGTCAGCGGCAGATGATAAAGCTGCTGCAATACGGTCCG
ACCGCGACTTCCAGTGAAGCGGAAGAAGTAAACCCGGCACCTGCGGCACATTGCCGCTGATCACCATGTCACGCGCCG
GAAGCTGTTGTTACGCGATTGCGAGATGTTTACCACGCCACGAACGTAGTTAGCCATTGATAGTTTTCATGTGCGACAATG
GGCGCATCGAGGGAAAACGTCGAGCTGATTTTATAATCGGCTGCCATCACGCGAACTTACGGTCATCGCGTGGTGCA
CAACTGATCACGTTTTGATAATCAATCGCGCAGGGCAGAACGAAACCGTCTGTTGATGCGGTGTTTACCAATCAAATTC
ACGCGGCCAGGCGCCTGAATGGTGTGAGTGGCAGGGTAGCCAAATGCGTTGGCAAACAGAGATTGTTTTTTCTTTTCTTTCAGA
CTATTTCTTACACTCCGGATTCGCGAAAATGGATATCGCTGACTGCGCGCAAACGCTCTGCTGCCTGTTCTGCGGTCAGG
TCTCGCTGGGTCTCTGCCAGCATTTCATAACCAACCATAAATTTACGTACGGTGGCGGAGCGCAGCAGAGGCGGATAAAAG
TGCGGCTGCGAGCTGCCAGTGTGATTCTCTTCGCCATTAATGGCGCGCCGTGCCAGCCCATAGAGTAGGGGAAGGAGCA
CTGGAAGAGGTTGTCATAACGACTGGTCAGCTTTTCAACGCCAGCGCCAGATCGCTGCGCTGGGCGTCCGGTCAAATCGG
TGATCCGTAACCGTGGGCTTTGGGCGAGCAGTAGCGTTTGAACGGCCAGGCGAGCCAGTAAGGCACGACGGCTAACCG
TGTTCCGGTTTTCGACAACGGTACGGCTACCGTCTGCCAGCTCGCGCTGAACATAATCCACCAGCATTGGTGATTTCTGTTCC
GCAAAATATTTCTTTTTCAGGCGGTTCTCGCGCTCAGCTTCTTAGGCAGGAAGCTATTTGCCAAATCTGACCGTGCAGG
TGCGGTTAGAGCAGCCCATCGCCGCGCCTTTGTTTTCAAAACCTGCACCCATGGGTACGTTTTTCCCAGTTCTGCGGTT
TGCTCCTGCCAGTTTTGACGATTTCCGTCAATGCTGCAACGCTGAGCTCTGGCAGCGTTTTACTGTGATCCGGTGAAAAG
CAGATACCCCGGCTGGTGCCGCGCGCTCTGGCAACGCATCAGCGGATCGTGACTTTCTGGCGCATCTGGCGTGTGAG
ACATCAAAGCCGCAAAGTCATTAGTGAAGAACGTAAGTCCCGGTGTAATCGGGTTTTATCGCCTGTACCCGCGACATTACC
```

图10

TGCGCAGAGGAAGCAATCTGGATCGTGCGCAGGTAACACCTGTTTGGCTGGCGTTTCCTGCGCCCCCTGCCAGGGGCGC
TTAGCGCGGTGCGGTGAAACCAGAATCCATTGCCCGGTGAGCGGGTTGTAGCGGCGATGTGGATGATCAACGGGATTA
TTGCGTCATGGTCGTTCCCTAATCGGGATATCCCTGTGGATGGCGTGACTGCCAGTGCCAGGTGCCTGCGCCATTCATC
GAGTGTGCGCGTTACGCGCCAGTTCAGTTCACGGTCGGCTTTGCTGGCGTCCGCCAGTAGGCCGGAAGGTCGCCCTCG
CGACGCGGTGCAAAATGATAATTAACCGGTTTGCCGCAGGCTTTGCTGAAGGCATTAACCACGTCACGACGCTGTTGCCT
ACGCCAGCGCCGAGGTTGTAGATGTGTACGCCTGGCTTGTTCGCCAGTTTTCCATCGCCACGACGTGACCGTCCGCCAG
ATCCATTACGTGGATGTAATCGCGTACGCCAGTACCATCTTCGGTCGGATAATCGTTACCAAAAATCGCCAGCGAGTCGCG
ACGGCCTACAGCAACCTGGGCGATGTATGGCATCAGGTTATTCGGAATGCCTTGCGGATCTTCGCCCATATCGCCCGACG
GATGCGCGCCAACCGGTTGAAGTAGCGCAGCAGGGCAATGCTCCAGTCCGGCTGGGCTTTTTGCAGATCGGTGAGGAT
CTGTTCCACCATCAGCTTGCTTTTGCCGTAAGGGCTTTGCGGTGTGCCGGTCGGGAAGCTTTCAACGTATGGAATTTGGG
CTGATCGCCATAAACGGTGGCGGAGGAGCTAAAAATAAAGTTTTTGACGTTAGCGGCGCGCATGGCGCTAATCAGGCGCA
GAGTGCCGTTGACATTGTTGTCGTAATATCCAGCGTTTTTGTACCGATTGCCCCACGGCTTTCAGCCCGCGAAGTGGA
TCACGGTGTGCATAGCGTGATCGTG CAGGATCTCGGTCATCAACGCTTCGTTACGAATATCGCCTTCAACAAACGTTGGAT
GTTTGC CGCTAAACGCTCGATAACAGGCAGTACGCTGCGCTTACTGTTACAGAGGTTATCAAGAATGATGACATCATGAC
CGTTTTGCAGTAATTGCACACAGGTATGACTTCCAATGTAACCGCTACCACCGGTAACCAGAACTCTCATAATTCGCTCCAT
TAGGCTTATGGTATGAAATAACCATAGCATAACAAAGATGCGAAAAGTGTGACATGGAATAAATTAGTGGAATCGTTTACAC
AAGAATTTAGCCGTTTTTTATGCGCGATTAAGTGATTATAAAACAGAGGTTTATGAATGATTGCGCTTTTTATCTGAAAAA
GACGCGTTTTATGCCTGCATGCGTCGAACCGTTGGCCGAGAGGGTGCTAAGGCCGCTCCGGCAAGGTCAGCACTAC
CGACGTTAACGAAATTACGCTCTATATGGAAGTCTGACTGCTGAAGAGCGCGAGATTATCAA

图10 (续)

表 1: 根据本发明可以生产的寡糖的列表

编号	名称	缩写	寡糖
1	2'-岩藻糖基乳糖	2'-FL	Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Gluc
2	3'-岩藻糖基乳糖	3-FL	Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-3)
3	2',3'-二岩藻糖基乳糖	DF-L	Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-3)
5	乳-N-三糖 II	LNT II	GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc
6	乳-N-四糖	LNT	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc
7	乳-N-新四糖	LNnT	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc
8	乳-N-岩藻糖五糖 I	LNFP I	Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc
9	乳-N-新岩藻糖五糖 I	LNnFP I	Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc
10	乳-N-岩藻糖五糖 II	LNFP II	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-4)
11	乳-N-岩藻糖五糖 III	LNFP III	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-3)
12	乳-N-岩藻糖五糖 V	LNFP V	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-3)
13	乳-N-新岩藻糖五糖 V	LNnFP V	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-3)
14	乳-N-二岩藻糖六糖 I	LNDH I	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-2) Fuc(α 1-4)
15	乳-N-二岩藻糖六糖 II	LND	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc Fuc(α 1-4) Fuc(α 1-3)
16	6'-半乳糖基乳糖	6'-GL	Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Gluc
17	3'-半乳糖基乳糖	3'-GL	Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Gluc
18	乳-N-六糖	LNH	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)Gal(β 1-4)Gluc Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)
19	乳-N-新六糖	LNnH	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)Gal(β 1-4)Gluc Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)

图11

20	对-乳 -N-六糖	paraLNT	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
21	对-乳 -N-新六糖	paraLNnH	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
22	二岩藻糖基-乳 -N-新六糖	DF-LNnH	$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \\ \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3) \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array}$
23	3'-唾液酸乳糖	3'-SL	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Gluc
24	6'-唾液酸乳糖	6'-SL	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Gluc
25	乳-N-唾液酸五糖 a	LST-a	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
26	乳-N-唾液酸五糖 b	LST-b	$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \\ \text{Neu5Ac}(\alpha 2-6) \end{array}$
27	乳-N-唾液酸五糖 c	LST-c	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Gluc
28	岩藻糖基 - 乳 - 唾液酸五糖 a	F-LST-a	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-4) \end{array}$
29	岩藻糖基 - 乳 -N-唾液酸五糖 b	F-LST-b	$\begin{array}{c} \text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \\ \text{Neu5Ac}(\alpha 2-6) \end{array}$
30	岩藻糖基 - 乳 -N-唾液酸五糖 c	F-LST-c	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array}$
31	二唾液酸 - 乳 -N-四糖	DS-LNT	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \\ \text{Neu5Ac}(\alpha 2-6) \end{array}$
32	二唾液酸 - 乳 -N-岩藻糖五糖	DS-LNFP V	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Neu5Ac}(\alpha 2-6) \qquad \qquad \qquad \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array}$
33	3-岩藻糖基-3'-唾液酸乳糖	3F-3'-SL	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array}$
34	3-岩藻糖基-6'-唾液酸乳糖	3F-6'-SL	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-6)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gluc} \\ \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array}$
35	乳 -N-新二岩藻糖基六糖 I	LNnDFH I	$\begin{array}{c} \text{Gal}(\beta 1-4)\text{GalNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array}$

图11 (续)