

乳糖-N-新四糖的生理功能、生物合成及其衍生化研究进展

孟佳炜¹, 朱莺莺¹, 罗国聪¹, 万李¹, 张文立¹, 沐万孟^{1,2*}

(¹ 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏无锡 214122

² 江南大学食品安全国际联合实验室 江苏无锡 214122)

摘要 母乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)因具有益生元功能、免疫调节功能、抗病病原体及毒素以及肠道细胞增殖分化的调节功能等多种生理功能,近年来备受关注。其中乳糖-N-新四糖(LNnT)作为营养强化剂被广泛添加到婴儿配方奶粉中。HMOs可分为中性寡糖,岩藻糖基化寡糖及唾液酸化寡糖,LNnT作为HMOs重要的核心结构之一,可通过唾液酸化及岩藻糖基化得到多种衍生物。目前不断有研究证实这些衍生物对人体具有独特的作用,其中LNnT及其衍生物在食品及制药行业的商业价值及应用潜力巨大,对其合成方法的探索成为一大研究热点。化学方法因各种副反应问题而使合成进程受阻;酶法合成和代谢工程合成的生物策略凭借酶反应的特异性而被认为是最具前景的合成方法,发展迅猛。本文简述LNnT及其衍生物的生理功能及生物合成进程,指出生物合成手段的优势与不足,展望其未来的发展方向。

关键词 母乳寡糖;乳糖-N-新四糖;生理功能;生物合成;衍生化

文章编号 1009-7848(2022)03-0320-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.035

母乳以配方奶粉和牛乳不可替代的营养价值而被视为婴幼儿的最佳食物。母乳与其它乳制品最重要的差别就在于所含寡糖的种类和含量不同,在母乳中所含有的母乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)在非人类乳汁中的含量及复杂性均大大下降。研究表明,HMOs不仅能提供婴幼儿生长所需的基本营养,而且具有维持肠道菌群的生态平衡的益生性^[1]、调节免疫系统^[2]、抵抗病原体侵染^[3]以及促进新生儿大脑早期发育^[4]的功能。其中,2'-岩藻糖乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL)和乳糖-N-新四糖(lacto-N-neotetraose, LNnT)均被美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲食品安全局(EFSA)批准作为营养强化剂添加到婴幼儿食品中^[4]。

HMOs的核心结构约有20种,由核心结构经过岩藻糖基化和唾液酸化,构成丰富多样的HMOs^[5]。其中,LNnT是HMOs重要的核心结构,也是最简单的type 2型糖,由半乳糖(Gal)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和葡萄糖(Glc)组成,结构为Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc(见图1)。

此外,LNnT还可以通过岩藻糖基化和唾液酸化产生多种衍生物(见图1),包括乳糖-N-岩藻糖五糖(lacto-N-fucopentaose, LNFP)、乳糖-N-新岩藻糖五糖(lacto-N-neofucopentaose, LNnFP)、乳糖-N-新二岩藻糖六糖(lacto-N-neodifucosylhexaose, LNnDFH)和唾液酸乳糖-N-四糖(ialyl-lacto-N-tetraose, LST)。

LNnT的合成方法主要有化学合成和生物合成。常规化学合成方法步骤冗杂,副产物多,产物收率低,而生物合成因底物可再生性、反应特异性和环境友好性的优势而被视为体外合成LNnT及其它HMOs的最具前景的方法。

1 生理功能

1.1 益生元功能

HMOs在口腔及小肠中难以消化,由此得以进入肠道中被其中的有益菌群所利用,从而具有益生元功能^[4]。在37℃厌氧条件下补充含有LNnT的混合低聚糖培养婴儿肠道中的双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*),结果表明其确实能够促进双歧杆菌的生长和代谢活动^[6]。随后对无菌小鼠的饲喂试验发现,与不添加LNnT的对照组相比,添加LNnT的试验组的肠道菌群中的双歧杆菌无论是数量还是种群丰度都有了显著提升,证实了LNnT对促进肠道内的双歧杆菌的生长具有独特

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31922073); 婴配乳品核心配料规模化制备技术创新示范项目

作者简介: 孟佳炜(1999—),女,本科生

通信作者: 沐万孟 E-mail: wmmu@jiangnan.edu.cn

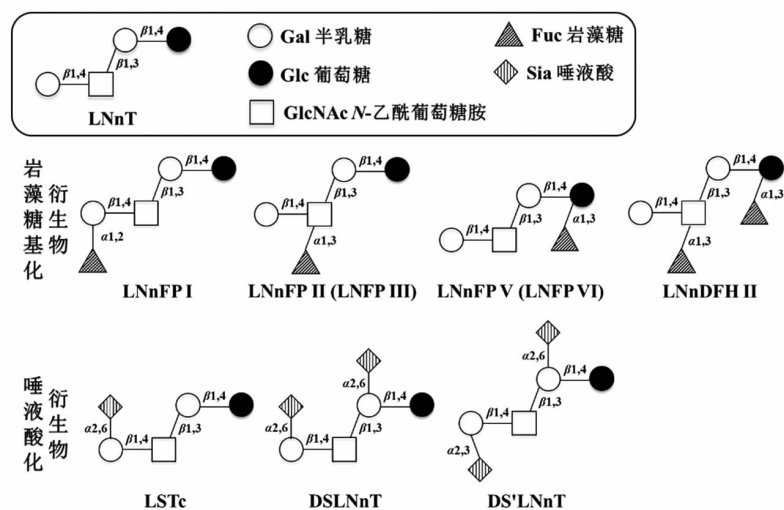


图 1 乳糖-N-新四糖及其主要衍生物结构

Fig.1 Structures of LNT and its main derivatives

的优势^[7]。而后通过给 6 个婴儿补充含有 LNT 的 HMOs 混合物,发现他们在 3 个月大时,益生菌的定殖率增加,而病原菌定殖率下降,由此证实 LNT 在婴儿体内确实具有益生效应^[1]。

1.2 免疫调节功能

目前已有大量研究报道 LNT 及其衍生物可通过增加 Gr1⁺ 细胞和抗原提呈细胞 (antigenic presenting cells, APC) 的数量来激发 2 型免疫。Terrazas 等^[8]揭示了 LNT-葡聚糖能有效地促进小鼠的抑制性细胞及未成熟的骨髓细胞的增殖,从而诱导 T 细胞增殖分化产生 IL-13、IL-4 和 IL-10 及限制 INF- 的产生,最终激发 2 型免疫。以树突状细胞为代表的 APCs,因具有多种糖类抗原受体也能够激活 Th2 免疫。LNFP III 被发现可通过与曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 虫卵抗原的特异性结合诱发 Th2 免疫^[9],也可激活小鼠骨髓来源的树突状细胞而诱发 Th2 免疫^[2]。

1.3 抗病原体及毒素功能

由于 HMOs 与靶细胞表面的受体具有相似的糖链结构,因此既可与受体直接结合,又可以伪装成受体直接与病原体及毒素结合,从而阻遏其与靶细胞的结合^[10]。体外实验证实了 LNT 及其唾液酸化衍生物能够阻断肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 与肠上皮细胞的黏附从而抑制肺炎链球菌性肺炎的发生。动物模型试验发现 LNT 和 LSTc 能减少在肺炎链球菌肺部的定植并持续抑

制其黏附^[11],且在补充 LNT 后的 30 min 内,肺炎链球菌的黏附率就会降低^[12]。

1.4 调节肠道细胞增殖分化

2008 年来, Kuntz 等^[13-14]发现了从母乳中分离出的寡糖可以调节肠道细胞的增殖和分化。Holscher 等^[15]通过对 LNT、2'-FL 和 6'-唾液酸乳糖 (6'-sialylactose, 6'-SL) 的体外研究发现这 3 种主要的 HMOs 均可抑制细胞增殖,但抑制增殖所需的阈值剂量随着 HMOs 的种类和细胞类型的不同而改变。

2 生物合成

化学法合成 LNT 需要引入保护基团^[16],步骤繁冗,且存在保护不到位、后续脱除不彻底及发生其它副反应的问题,而且常需要使用有毒有害试剂。相比之下,生物法合成由于酶与底物的特异性高、合成步骤简化和副产物少,更适合大规模的工业化生产,成为了 LNT 及其它 HMOs 的极具前景的绿色合成方式。

2.1 酶法合成

乳糖-N-三糖 II (lacto-N-triose II, LNT II) 是合成 LNT 的常见前体。可先合成 LNT II,再通过将半乳糖以 β -1,4 键连接至受体底物上,实现由 LNT II 到 LNT 的转化 (见图 2)。

2.1.1 酶法合成 LNT II 哺乳动物来源的 β -1,3-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 (β -1,3-GnT) (EC 2.4.

1.149) 能够催化来源于尿苷-5'-二磷酸-GlcNAc (UDP-GlcNAc) 的 *N*-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 转移至 *N*-乙酰乳糖胺衍生物末端的 3'-OH 位置形成 *N*-乙酰乳糖胺聚糖链^[17]。当以乳糖为受体, UDP-GlcNAc 的 GlcNAc 为供体时, 即可合成 LNT II。1983 年 Yates 等^[18]首次报道了使用人血清中的 β -1,3-GnT 作为催化剂, 合成了微摩尔规模的 LNT II。Murata 等^[19]使用牛血清提取的 β -1,3-GnT 和商业化的 UDP-GlcNAc 进一步优化了合成步骤, 合成了毫摩尔规模的 LNT II。

脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 来源的 β -1,3-*N*-乙酰葡萄糖胺转移酶 (LgtA) 具有广泛的受体谱, 而且以乳糖为受体时比活力是哺乳动物来源的 β -1,3-GnT 的 75 倍以上^[20]。在添加 LgtA 的化学酶法^[21]和一锅多酶 (OPME)^[5]系统中合成了 LNT II。其中 OPME 系统以 GlcNAc 和乳糖为底物, 得到了 1.5 g 的 LNT II^[5]。而利用来源于幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的 LgtA 催化 GlcNAc 和乳糖生成了高达 88% 产率的 LNT II^[22]。

在酶的挖掘过程中发现, 在 β -*N*-乙酰己糖胺酶的 13 个候选物中, 11 种具有转糖基化活性, 其中来源于两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 的 β -*N*-乙酰己糖胺酶 (BbhI) (EC 3.2.1.52) 的催化活性最高。后续试验还进一步发现了以硝基苯 *N*-乙酰基- β -*D*-葡萄糖胺 (*p*NP- β -GlcNAc 或

*p*NP-NAG) 为供体, 乳糖为受体时 LNT II 的合成效率最高, 达到了 44.9%^[23]。Schmölzer 等^[24]还成功构建了 BbhI 的突变体 D746E, 其转糖基化的选择性相对于产物水解的选择性高出了 13 倍, 选择另一种有效供体 *N*-乙酰基-*D*-氨基葡萄糖 1,2-恶唑啉 (*N*-acetyl-*D*-glucosamine 1,2-oxazoline, NAG-oxa) 与乳糖反应仅 1 h 就得达到了约为 90% 的产率, 表明该突变体具有的应用潜力。将该糖合酶固定于琼脂糖珠填充的固定床中形成了 LNT II 的连续合成方法, LNT II 的生产率为 80~100 mmol/(L·min⁻¹)^[25]。还有其它细菌来源的 β -*N*-乙酰基己糖胺酶在 LNT II 的生产中也具有应用潜力, 如从土壤样品中筛选出的两种酶分别以 GlcNAc2 和乳糖为底物时产率分别为 2% 和 8%^[26], 以及从 *Tyzzereella nexilis* 中鉴定出的一种新型酶以 *p*NP- β -GlcNAc 和乳糖为底物时产率为 57.2%^[27]。

2.1.2 酶法转化 LNT II 生成 LNnT 一些 β -半乳糖苷酶可以催化半乳糖基从乳糖转移至 LNT II 从而合成 LNnT。来源于圆环芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*) 的 β -半乳糖苷酶就可以催化得到基于 LNT II 为 19% 的产率^[19]。来源于圆环芽孢杆菌 ATCC 31382 的 BgaD-D, 来源于嗜热栖热菌 HB27 (*Thermus thermophilus*) 的 Tt β -gly 和来源于激烈热球菌 DSM 3638 (*Pyrococcus furiosus*) 的

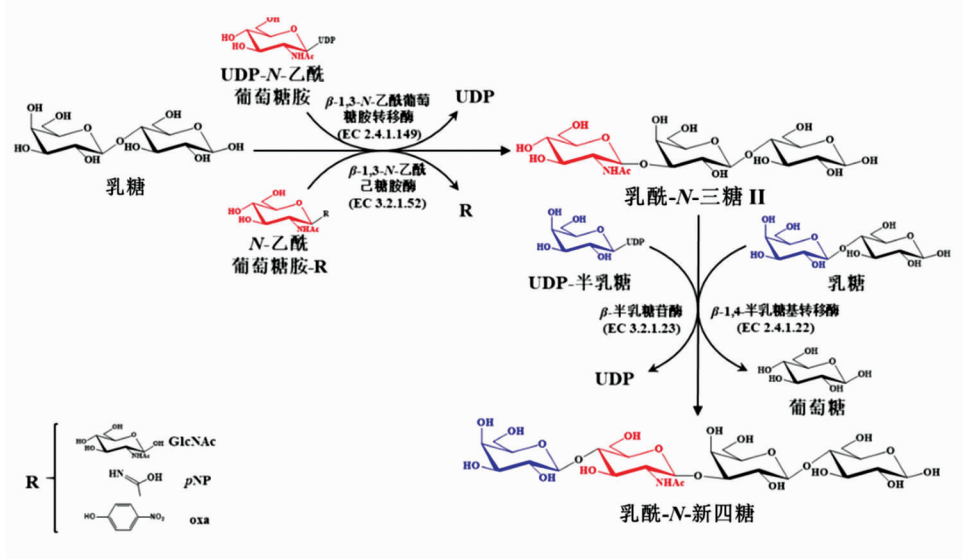


图2 酶法合成乳酰-*N*-三糖 II 及向乳酰-*N*-新四糖的酶法转化

Fig.2 Enzymatic synthesis of LNT II and its further conversion to LNnT

CelB 合成 L_{Nn}T 的产率基于乳糖分别为 7.1%、5.2%和 1.0%，基于 LNT II 分别为 1.4%、1.0%和 0.2%^[28]，而且提高底物浓度可使 BgaD-D 的催化活性进一步提高，基于乳糖的产率为 17.3%^[27]。

商业化的 β -1,4-半乳糖基转移酶(EC 2.4.1.22)^[21]和来源于脑膜炎奈瑟氏球菌的 β -1,4-半乳糖基转移酶(LgtB)^[22]已成功用于以 UDP-半乳糖和 LNT II 为底物合成 L_{Nn}T，其中纯化后的 LgtB 催化产率高达 93%。

2.2 代谢工程合成

与酶法合成相似，L_{Nn}T 的代谢工程合成也需要先合成 LNT II，而 LgtA 作为代谢通路中的关键酶，负责催化外源添加的乳糖和内源合成的 UDP-GlcNAc 反应生成 LNT II。基于 LNT II 生物合成途径的构建，将 LgtB 引入到工程菌株中，催化 LNT II 的半乳糖基化，产生 L_{Nn}T(见图 3)。

乳糖转运酶(LacY)能够将乳糖转运到细胞中， β -半乳糖苷酶(LacZ)的缺失抑制了乳糖水解，大肠杆菌 JM109 是 LacZ 缺失且含有 LacY (lacY⁺ lacZ⁻)的菌株，当将脑膜炎奈瑟氏球菌的 *lgtA* 基因以质粒为载体导入其中时，通过分批补料可高效生产 LNT II，产量为 6 g/L。当来源于脑膜炎奈瑟

氏球菌的 LgtB 与 LgtA 共表达时，LNT II 进一步转化为 L_{Nn}T 和副产物乳糖新六糖(lacto-neo-hexaose, L_{Nn}H)，得到高达 5 g/L 的总产量^[29]。

Baumgärtner 等^[30]通过对脑膜炎奈瑟氏球菌来源的 *lgtA* 进行染色体整合，构建了无质粒的工程化 lacY⁺ lacZ⁻ 大肠杆菌菌株来合成 LNT II。之后以葡萄糖为主要碳源合成了 1.906 g/L 的 LNT II，以甘油为主要碳源合成了 2.465 g/L 的 LNT II，结果表明甘油作为碳源优于葡萄糖。之后进一步试验发现以半乳糖作为唯一碳源的分批补料培养得到了 12.72 g/L 的 LNT II^[31]。

目前已在枯草芽孢杆菌中构建了 UDP-半乳糖和 UDP-GlcNAc 的两个前体供应的代谢通路，实现了合成 L_{Nn}T 的关键前体的供应平衡。在枯草芽孢杆菌中共表达 LacY、LgtA 和 LgtB 高效地合成了 L_{Nn}T，通过分批补料培养得到了 4.52 g/L 的 L_{Nn}T 和 2.64 g/L 的 LNT II^[32]。又利用成簇的规律间隔成簇短回文重复序列干扰(CRISPRi)的策略下调了涉及竞争途径的基因，微调了 LNT II 和 L_{Nn}T 的代谢通路，最终分批补料培养得到了 5.41 g/L 的 L_{Nn}T 和 2.98 g/L 的 LNT II^[33]。

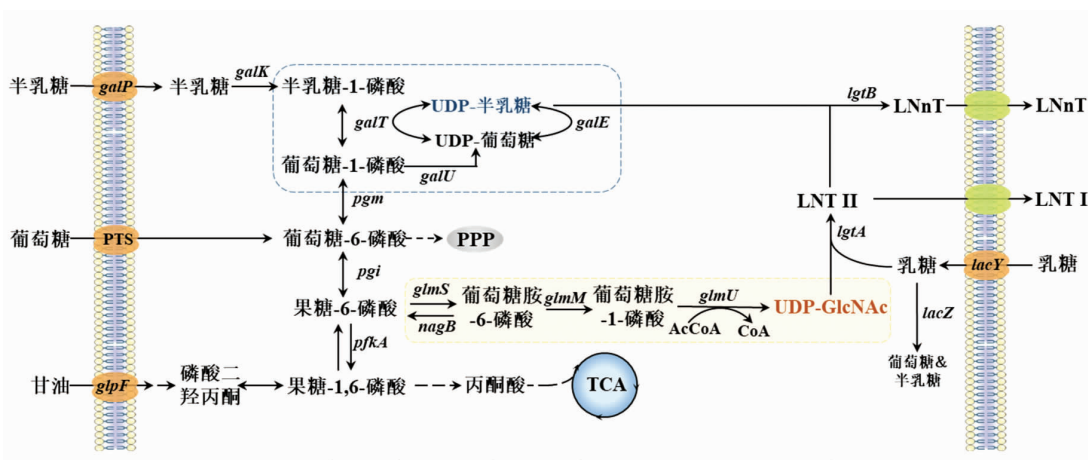


图 3 乳糖-N-三糖 II 及乳糖-N-新四糖在大肠杆菌内的生物合成途径

Fig.3 Biosynthesis pathway of LNT II and LNnT in *E. coli*

3 衍生化

HMOs 被划分为非岩藻糖基化的中性 HMOs、岩藻糖基化 HMOs 及唾液酸化 HMOs。其中岩藻糖基化 HMOs 约占所有 HMOs 的 35%~50%，唾液酸化约占总量的 12%~14%，且其各种 HMOs 的生

理活性得到了广泛的研究验证。L_{Nn}T 利用 α -L-岩藻糖苷酶(EC3.2.1.-)或 α -岩藻糖基转移酶(EC 2.4.1.-)催化岩藻糖残基以 α 1,2 和 α 1,3 键连接到半乳糖、葡萄糖或 GlcNAc 残基上得到岩藻糖基化的衍生物，主要有 L_{Nn}FP I, L_{Nn}FP II(LNFP III)，

LNNFP V(LNFP VI)和LNDFH II。LNNT利用唾液酸糖苷酶(EC 3.2.1.18)和唾液酸转移酶(SiaT, EC 2.4.99-)催化唾液酸残基以 α 2,3和 α 2,6键连接到半乳糖残基上构成唾液酸化的寡糖,主要有LSTa和 α -2,6-二唾液酸-N-新四糖(DSLNNT)。

3.1 岩藻糖基化

α -L-岩藻糖苷酶(EC3.2.1.-)主要作用是催化 α -L-岩藻糖苷的水解,但同时也显示出了催化岩藻糖基转移到低聚糖的糖合酶活性。来源于*B. bifidum*的L-1,3/4-L-岩藻糖苷酶(EC 3.2.1.111)(BbAfcB)能够以LNNT为受体合成LNFP III,来源于产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)的酶(CpAfc2)具有相同的催化能力且合成的LNFP III产率更高^[34]。来源于婴儿长双歧杆菌亚种(*Bifidobacterium longum subsp. infantis*)的 α -L-岩藻糖苷酶(BiAfcB)也被改造为 α -1,3/4-L-转岩藻糖苷酶用于LNFP III合成^[35]。一项专利报道了BiAfcB的高效突变体,以LNNT和3-FL为底物,催化合成LNFP III的活性提高了7300倍^[36]。

岩藻糖基转移酶(EC 2.4.1-)可以催化L-岩藻糖基从鸟苷二磷酸(GDP)-岩藻糖转移至受体。来自幽门螺杆菌的 α -1,3-岩藻糖基转移酶(Hp3FT)在以GDP-岩藻糖为供体,LNNT为受体时能够生成LNFP III并进一步岩藻糖基化为LNDFH II^[22,37]。来源于幽门螺杆菌UA948的 α -1,3/4-岩藻糖基转移酶(HP3/4FT)能从岩藻糖和其它受体出发产生LNFP III、LNDFH II和LNDFH II^[38]。幽门螺杆菌DSM6709来源的FucT III对LNNT表现出高效特异性,在合成LNFP VI后可进一步岩藻糖基化为LNDFH II^[39]。脆弱类杆菌(*Bacteroides fragilis*)来源的Bf13FT能够催化GDP-岩藻糖将岩藻糖基转移到乳糖和N-乙酰乳糖胺(LacNAc)上,生成LNFP II(LNFP III)、LNFP V和LNDFH II^[40]。

在构建了LNNT生物合成代谢工程菌的基础上,进一步引入编码特定岩藻糖基转移酶的基因可在体内实现LNNT的岩藻糖基化。通过向已构建GDP-岩藻糖从头合成代谢途径的工程菌中引入fucT、futA和futB这3个*H. pylori* 26695来源的 α -1,3-岩藻糖基转移酶基因,合成了多种岩藻

糖基化的LNNT衍生物^[41-42]。结果发现,futT的导入得到了3 g/L的LNFP V,同时产生了少量的LNDFH II^[41]。futA的导入得到了1.7 g/L LNFP V,futB的导入得到了LNFP V、LNFP II和LNDFH II^[42]。通过增加GDP-岩藻糖途径并表达FutC同样实现了LNNT的工程菌体内的岩藻糖基化,提纯后得到了3 g低聚糖,其中LNFP I的含量为57%^[43]。

3.2 唾液酸化

唾液酸糖苷酶主要作用是催化去除末端唾液酸基残基的反应,部分唾液酸糖苷酶对特定的供体和受体底物也表现出一定的转唾液酸的活性^[44],例如在转唾液酸糖苷酶的催化作用下,成功地以LNNT和N-乙酰神经氨酸(NeuAc)为底物合成了衍生物LSTd^[45]。

唾液酸转移酶(SiaTs)催化唾液酸从供体胞苷-5'-单磷酸(CMP)-N-乙酰神经氨酸(NeuAc)转移至各种受体上。McArthur等^[46]通过诱变筛选得到具有 α -2,6-SiaT催化活性的P34H/M144L突变体,可以同时产生LSTc β ProN3和DSLNT β ProN3。有专利报道构建了莱氏发光菌(*Photobacterium leiognathi*) α -2,6-SiaT的多位点变异体,提高了其生产LSTc的转移酶活性、区域选择性和热稳定性,用该高效突变体催化LNNT合成LSTc的最大转化率可达55%左右^[36]。某些SiaTs还能催化合成LNNT双唾液酸化衍生物,如淡色光细菌(*Photobacterium damsela*)来源的 α -2,6-唾液酸转移酶Pd2,6ST可以催化NeuAc和LNNT合成达到了克规模的DSLNT^[47-48]。

4 结语

食品工业的任务随着社会的发展而变化,如今人们对食品的需求已转变为高品质的营养健康,为了更好地模拟母乳,完善婴幼儿配方奶粉的功能供给,母乳寡糖的相关研究目前处于火热阶段。由于一锅多酶体系和代谢工程的发展,LNNT及其它HMOs的生物合成虽然已取得了重大进展,但依然处于低产率、低效价及低生产率的阶段,远不足以支撑规模化的工业生产。

UDP-半乳糖、UDP-GlcNAc、GDP-岩藻糖和CMP-NeuAc等核苷酸糖的合成被认为是代谢途

径中的限速步骤,需要进一步地研究以提高这些核苷酸糖的再生。此外,寡糖合成过程的部分中间产物对细胞生长具有影响,可以通过对代谢途径的动态调节等手段来平衡细胞生长 HMOs 生产。目前酶法合成 LNnT 及其衍生物的研究较多,尤其是包含关键糖基转移酶和前体生成酶的一锅多酶反应,该方法在实现 HMOs 的高产中具有巨大潜力,但关键酶在工程菌内的可溶性表达和催化效率问题亟待解决,还需挖掘新的糖基转移酶和糖苷酶。定向挖掘得到的酶可通过理性设计、半理性设计或定向进化策略提高其转糖基化效率和热稳定性,以实现 HMOs 的高效生产。

综上所述,两种生物合成方法都具有其独特的优势,酶法合成复杂的 HMOs 可能更具潜力,但简单 HMOs 的合成代谢工程优势更显著。而随着近年来对 LNnT 及其衍生物的生理功能的揭示,HMOs 的需求量将会迅速增长。

参 考 文 献

- [1] PUCCIO G, ALLIET P, CAJOZZO C, et al. Effects of infant formula with human milk oligosaccharides on growth and morbidity: A randomized multicenter trial [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017, 64(4): 624-631.
- [2] THOMAS P G, CARTER M R, ATOCHINA O, et al. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2003, 171(11): 5837-5841.
- [3] EL-HAWIET A, KITOVA E N, KLASSEN J S. Recognition of human milk oligosaccharides by bacterial exotoxins[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(8): 845-854.
- [4] PEREZ-ESCALANTE E, ALATORRE-SANTAMARIA S, CASTANEDA-OVANDO A, et al. Human milk oligosaccharides as bioactive compounds in infant formula: Recent advances and trends in synthetic methods[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(1): 181-214.
- [5] MCARTHUR J B, YU H, CHEN X. A bacterial β 1-3-galactosyltransferase enables multigram-scale synthesis of human milk lacto-N-tetraose (LNT) and its fucosides[J]. *Acs Catal*, 2019, 9(12): 10721-10726.
- [6] PRIETO P. *In vitro* and clinical experiences with a human milk oligosaccharide, lacto-N-neotetraose, and fructooligosaccharides[J]. *Foods Food Ingredients J Jpn*, 2005, 210(11): 1018.
- [7] MARCOBAL A, BARBOZA M, SONNENBURG E D, et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways [J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(5): 507-514.
- [8] TERRAZAS L I, WALSH K L, PISKORSKA D, et al. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1 (+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4 (+) cells: A potential mechanism for immune polarization in helminth infections[J]. *J Immunol*, 2001, 167(9): 5294-5303.
- [9] OKANO M, SATOSKAR A R, NISHIZAKI K, et al. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response[J]. *J Immunol*, 2001, 167(1): 442-450.
- [10] NEWBURG D S, RUIZ-PALACIOS G M, MORROW A L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens[J]. *Annu Rev Nutr*, 2005, DOI: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092553.
- [11] IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ I, SIMON P M, ZOPF D, et al. Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental *Pneumococcal pneumonia*[J]. *J Infect Dis*, 1997, 176(3): 704-712.
- [12] TONG H H, MCIVER M A, FISHER L M, et al. Effect of lacto-N-neotetraose, asialoganglioside-GM1 and neuraminidase on adherence of otitis media-associated serotypes of *Streptococcus pneumoniae* to chinchilla tracheal epithelium [J]. *Microb Pathog*, 1999, 26(2): 111-119.
- [13] KUNTZ S, KUNZ C, RUDLOFF S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells[J]. *Br J Nutr*, 2009, 101(9): 1306-1315.
- [14] KUNTZ S, RUDLOFF S, KUNZ C. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed

- intestinal cells[J]. *Br J Nutr*, 2008, 99(3): 462–471.
- [15] HOLSCHER H D, DAVIS S R, TAPPENDEN K A. Human milk oligosaccharides influence maturation of human intestinal Caco-2Bbe and HT-29 cell lines [J]. *J Nutr*, 2014, 144(5): 586–591.
- [16] BANDARA M D, STINE K J, DEMCHENKO A V. The chemical synthesis of human milk oligosaccharides: Lacto-*N*-tetraose (Gal β 1 \rightarrow 3 GlcNAc β 1 \rightarrow 3 Gal β 1 \rightarrow 4 Glc)[J]. *Carbohydr Res*, 2019, DOI: 10.1016/j.carres.2019.107824.
- [17] VAN DEN EIJNDEN D H, KOENDERMAN A H, SCHIPHORST W E. Biosynthesis of blood group i-active polylectosaminoglycans. Partial purification and properties of an UDP-GlcNAc: *N*-acetylglucosaminide β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase from *Novikoff tumor* cell ascites fluid[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(25): 12461–12471.
- [18] YATES A D, WATKINS W M. Enzymes involved in the biosynthesis of glycoconjugates[J]. A UDP-2-acetamido-2-deoxy-d-glucose: β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-saccharide (1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-deoxy- β -d-glucopyranosyltransferase in human serum[J]. *Carbohydr Res*, 1983, 120: 251–268.
- [19] MURATA T, INUKAI T, SUZUKI M, et al. Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neotetraose[J]. *Glycoconjugate Journal*, 1999, 16(3): 189–195.
- [20] BLIXT O, VAN DIE I, NORBERG T, et al. High-level expression of the *Neisseria meningitidis* lgtA gene in *Escherichia coli* and characterization of the encoded *N*-acetylglucosaminyltransferase as a useful catalyst in the synthesis of GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal and GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal linkages[J]. *Glycobiology*, 1999, 9(10): 1061–1071.
- [21] RENAUDIE L, DANIELLOU R, AUGE C, et al. Enzymatic supported synthesis of lacto-*N*-neotetraose using dendrimeric polyethylene glycol[J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(3): 693–698.
- [22] CHEN C C, ZHANG Y, XUE M Y, et al. Sequential one-pot multienzyme (OPME) synthesis of lacto-*N*-neotetraose and its sialyl and fucosyl derivatives[J]. *Chem Commun*, 2015, 51(36): 7689–7692.
- [23] CHEN X, XU L, JIN L, et al. Efficient and regioselective synthesis of β -GalNAc/GlcNAc-lactose by a bifunctional transglycosylating β -*N*-acetylhexosaminidase from *Bifidobacterium bifidum*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(18): 5642–5652.
- [24] SCHMÖLZER K, WEINGARTEN M, BALDENIUS K, et al. Glycosynthase principle transformed into biocatalytic process technology: Lacto-*N*-triose II production with engineered exo-hexosaminidase [J]. *ACS Catal*, 2019, 9(6): 5503–5514.
- [25] RUZIC L, BOLIVAR J M, NIDETZKY B. Glycosynthase reaction meets the flow: Continuous synthesis of lacto-*N*-triose II by engineered β -hexosaminidase immobilized on solid support[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(5): 1597–1602.
- [26] NYFFENEGGER C, NORDVANG R T, ZEUNER B, et al. Backbone structures in human milk oligosaccharides: trans-glycosylation by metagenomic β -*N*-acetylhexosaminidases[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(19): 7997–8009.
- [27] LIU Y H, WANG L, HUANG P, et al. Efficient sequential synthesis of lacto-*N*-triose II and lacto-*N*-neotetraose by a novel β -*N*-acetylhexosaminidase from *Tyzzarella nexilis*[J]. *Food Chem*, 2020, DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127438.
- [28] ZEUNER B, NYFFENEGGER C, MIKKELSEN J D, et al. Thermostable β -galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides[J]. *N Biotechnol*, 2016, 33(3): 355–360.
- [29] PRIEM B, GILBERT M, WAKARCHUK W W, et al. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(4): 235–240.
- [30] BAUMGARTNER F, CONRAD J, SPRENGER G A, et al. Synthesis of the human milk oligosaccharide lacto-*N*-tetraose in metabolically engineered, plasmid-free *E. coli*[J]. *Chembiochem*, 2014, 15(13): 1896–1900.
- [31] BAUMGARTNER F, SPRENGER G A, ALBERMANN C. Galactose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for the production of lacto-*N*-tetraose[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2015, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.04.009.
- [32] DONG X, LI N, LIU Z, et al. Modular pathway engineering of key precursor supply pathways for lacto-*N*-neotetraose production in *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, DOI: 10.1186/s13068-

- 019-1551-3.
- [33] DONG X M, LI N, LIU Z M, et al. CRISPRi-guided multiplexed fine-tuning of metabolic flux for enhanced lacto-N-neotetraose production in *Bacillus subtilis*[J]. *J Agr Food Chem*, 2020, 68(8): 2477-2484.
- [34] ZEUNER B, MUSCHIOL J, HOLCK J, et al. Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29 α -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides[J]. *N Biotechnol*, 2018, DOI: 10.1016/j.nbt.2017.12.002.
- [35] SAUMONNEAU A, CHAMPION E, PELTIER-PAIN P, et al. Design of an α -L-transfucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs [J]. *Glycobiology*, 2016, 26(3): 261-269.
- [36] CHAMPION E, MCCONNELL B, DEKANY G, et al. Ternary mixtures of 6'-SL, LNnT and LST c: United States, 10695359[P]. 2016-06-09.
- [37] BAI J, WU Z, SUGIARTO G, et al. Biochemical characterization of *Helicobacter pylori* α 1-3-fucosyltransferase and its application in the synthesis of fucosylated human milk oligosaccharides[J]. *Carbohydr Res*, 2019, DOI: 10.1016/j.carres.2019.05.007.
- [38] YU H, LI Y, WU Z, et al. *H. pylori* α 1-3/4-fucosyltransferase (Hp3/4FT)-catalyzed one-pot multienzyme (OPME) synthesis of Lewis antigens and human milk fucosides[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(80): 11012-11015.
- [39] TSAI T W, FANG J L, LIANG C Y, et al. Exploring the synthetic application of *Helicobacter pylori* α 1,3/4-fucosyltransferase FucT III toward the syntheses of fucosylated human milk glycans and Lewis antigens[J]. *ACS Catal*, 2019, 9(12): 10712-10720.
- [40] HUANG H H, FANG J L, WANG H K, et al. Substrate characterization of *Bacteroides fragilis* α 1,3/4-fucosyltransferase enabling access to programmable one-pot enzymatic synthesis of KH-1 antigen[J]. *ACS Catal*, 2019, 9(12): 11794-11800.
- [41] DUMON C, PRIEM B, MARTIN S L, et al. *In vivo* fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* α -1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*[J]. *Glycoconjugate J*, 2001, 18(6): 465-474.
- [42] DUMON C, SAMAIN E, PRIEM B. Assessment of the two *Helicobacter pylori* α -1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of Lewis x human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnol Prog*, 2004, 20(2): 412-419.
- [43] DUMON C, BOSSO C, UTILLE J P, et al. Production of Lewis x tetrasaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Chembiochem*, 2006, 7(2): 359-365.
- [44] ZHANG X, LIU Y, LIU L, et al. Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: Advances and perspectives [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(5): 787-800.
- [45] JOHNSON K F. Synthesis of oligosaccharides by bacterial enzymes [J]. *Glycoconjugate J*, 1999, 16(2): 141-146.
- [46] MCARTHUR J B, YU H, ZENG J, et al. Converting *Pasteurella multocida* α 2-3-sialyltransferase 1 (PmST1) to a regioselective α 2-6-sialyltransferase by saturation mutagenesis and regioselective screening[J]. *Org Biomol Chem*, 2017, 15(7): 1700-1709.
- [47] YU H, LAU K, THON V, et al. Synthetic disialyl hexasaccharides protect neonatal rats from necrotizing enterocolitis[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(26): 6687-6691.
- [48] YU H, YAN X, AUTRAN C A, et al. Enzymatic and chemoenzymatic syntheses of disialyl glycans and their necrotizing enterocolitis preventing effects [J]. *J Org Chem*, 2017, 82(24): 13152-13160.

Recent Advances on Physiological Function, Biosynthesis, and Derivatization of Lacto-N-neotetraose

Meng Jiawei¹, Zhu Yingying¹, Luo Guocong¹, Wan Li¹, Zhang Wenli¹, Mu Wanmeng^{1,2*}

(¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu)

Abstract Human milk oligosaccharides (HMOs), among which lacto-*N*-neotetraose (LNnT) has been widely used as a nutritional fortifier in infant formula, are attractive in recent years because of their prebiotic function, immune modulators, antiadhesive antimicrobials, as well as modulators of intestinal cell responses. HMOs are divided into non-fucosylated neutral, fucosylated, and sialylated oligosaccharides. As one of the most important core structures of HMOs, LNnT can be modified with fucose residue or sialic acid residue to obtain a variety of derivatives. On account of the widely confirmation of their promising physiological effects, they are credited with significant commercial value and potential in the food and pharmaceutical industry. Therefore, it is nothing strange that the exploration of its synthetic method has become a hotspot of research. Among them, the research process of conventional chemical approaches encounters bottlenecks due to a variety of side reaction problems, while biosynthesis takes advantages of the specificity of enzyme reactions and is developing rapidly. In this paper, the physiological functions and biosynthesis process of LNnT and its derivatives were briefly reviewed, and the advantages and disadvantages of biosynthesis methods were pointed out, then the development of LNnT and its derivatives was prospected.

Keywords human milk oligosaccharides; lacto-*N*-neotetraose; physiological effects; biosynthesis; derivatization