

母乳低聚糖的生物合成研究进展

刘雯娴¹, 彭晶¹, 程海娜^{1,2}, 陈祝^{1,2}, 王玉光^{1,2}, 周洪波^{1,2*}

(¹中南大学资源加工与生物工程学院 长沙 410083

²中南大学 生物冶金教育部重点实验室 长沙 410083)

摘要 母乳低聚糖是母乳中最重要的成分之一,具有支持免疫系统发育,促进大脑发育等重要功能,在婴幼儿营养和医用营养领域拥有巨大的市场价值。快速增长的市场需求,对母乳低聚糖的供应提出了新要求,母乳低聚糖的生产新方式应运而生。生物合成法重塑了母乳低聚糖的生产过程,同时也给整个行业带来全新的机遇和挑战。本文首先介绍母乳低聚糖的基本性质和市场应用,然后聚焦于母乳低聚糖生物合成的研究进展,深入讨论化学酶法和微生物细胞工厂在母乳低聚糖合成中的关键技术、优势和不足。最后,对母乳低聚糖的未来进行展望。

关键词 生物制造; 化学酶法; 细胞工厂; 母乳低聚糖

文章编号 1009-7848(2024)11-0388-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.036

近年来母乳低聚糖(Human milk oligosaccharides, HMOs)在食品医药领域备受青睐,特别是其对早期生命营养的意义更是被反复强调。随着越来越多的 HMOs 进入商业市场,它们将改变婴幼儿配方奶粉领域的面貌,并为改善人类健康创造机会。这不仅驱动婴幼儿配方奶粉产品的高端化发展,还引领成人食品、医药领域的新潮。HMOs 是当前最具应用前景的功能食品核心成分之一。

HMOs 的研究和发展至今不过半个世纪。最初的研究主要聚焦于母乳中 HMOs 的分离、结构表征和活性研究,进而开启了其化学合成的大门,最终将 HMOs 领进消费市场。然而,化学反应的复杂性、合成原料的可用性使化学合成 HMOs 的成本过于昂贵。近 10 年来,生物合成的出现打破了天然产物的传统获取方式。生物合成的产品制造具备可操控、可定制和可量化的优势,并且显著减少了对生产资源和能量的需求,是一种令人期待的新兴手段。HMOs 的生物合成已成功从最初的“概念验证”阶段进入工业化生产阶段,产量成功由毫克提升至克级水平。目前,HMOs 供应主要由欧美巨头公司垄断,均可通过生物合成途径实现 HMOs 的规模化生产,并且部分产品已通过欧美

等多个国家的食品新资源审批。我国相关科技部门、高校和科研院所和企业都在加速推进研开发工作,部分企业已具备相关生产技术。

虽然母乳低聚糖的商业化生产已经实现,但是其成本仍维持在高值区间,以至于添加 HMOs 的婴幼儿配方奶粉的价格普遍更高。就中国而言,近 10 年来乳制品进口量由 759 万 t 增至 2 387 万 t,这意味着 HMOs 的需求量将只增不减^[1]。高价格的 HMOs 产品令消费者望而却步,奶粉供应商们同样承受着压力。在相同生产条件下通过提高 HMOs 的产量或是创新优化生产方式来实现成本大幅降低,是未来 HMOs 发展的重要攻关方向。

本文首先介绍母乳低聚糖的重要功能和应用现状。其次,对母乳低聚糖的合成途径和主要限制因素进行重点讨论。最后,展望母乳低聚糖的生物合成趋势。

1 母乳低聚糖的概况

母乳是婴儿最理想的天然食品,近年世界卫生组织发布的指南中不断强调母乳喂养的重要性^[2-3]。母乳的主要成分是糖类(乳糖)、蛋白质(乳清蛋白和酪蛋白)和脂肪(可消化脂肪酸),其中母乳低聚糖(Human milk oligosaccharides, HMOs)是第 2 大类糖类成分和第 3 大营养成分^[4-7]。母乳低聚糖的含量与组成是母乳区别于其它动物乳汁的重要标识(表 1),这也是母乳被认为是婴儿营养的“黄金标准”的重要原因之一。因此配方奶粉

收稿日期: 2023-11-18

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30803);
湖南省研究生自主探索创新项目(CX20200251)

第一作者: 刘雯娴,女,博士

通信作者: 周洪波 E-mail: zhouhb@csu.edu.cn

表 1 母乳与牛、羊乳在部分营养物质组成上的差异

Table 1 Differences in the composition of some nutrients in human, bovine, and goat milk

类别	母乳	牛乳	羊乳	参考文献	
蛋白质	总乳蛋白/(g/100 g) ^a	1.17	3.30	4.06	[8]
脂类	甘油三酯/(mg/mL)	9.34	9.24	6.28	[9]
	总饱和脂肪酸/% ^b	38.10	63.49	69.07	[10]
糖类	乳糖/(g/L)	>70	~47	~42	[11]
	总低聚糖/(g/L)	5.00~20.00	0.03~0.06	0.06~0.35	[11]
	低聚糖种类(已表征)	>200(22)	37(6)	40(9)	[11]

注:a. 整个泌乳期蛋白质平均含量;b. 脂肪酸相对含量 (%总脂肪酸)。

的母乳化始终是研究热点。

目前已鉴定的 HMOs 已超过 200 种，它们的结构存在高度相似性却又保持高度异质性。HMOs 以 5 种单糖作为结构单元，即半乳糖(Galactose, Gal)、葡萄糖(Glucose, Glc)、岩藻糖(Fucose, Fuc)、N-乙酰氨基葡萄糖(N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)、N-乙酰神经氨酸(N-Acetylneuraminic acid, Neu5Ac)，通过 12 种不同的糖苷键连接不同的糖基，组成了 HMOs 的复杂文库^[12]。

其普遍的规律在于它们的还原端通常含有一个乳糖。简单的 HMOs 可看作是乳糖进行糖基化修饰(图 1)。随着糖链结构复杂化,延伸部分的糖链可以进一步发生糖基化,这是 HMO 异质性的重要原因^[3]。根据糖基化种类,HMOs 可以划分为 3 大类:岩藻糖基化的 HMOs[~61%,以 2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL)为例]、唾液酸化的 HMOs[~13%,以 6'-唾液酸乳糖(6'-SL)为例]以及非岩藻糖基化的中性 HMOs[~13%,以乳糖-N-四糖(LNT)为例]。

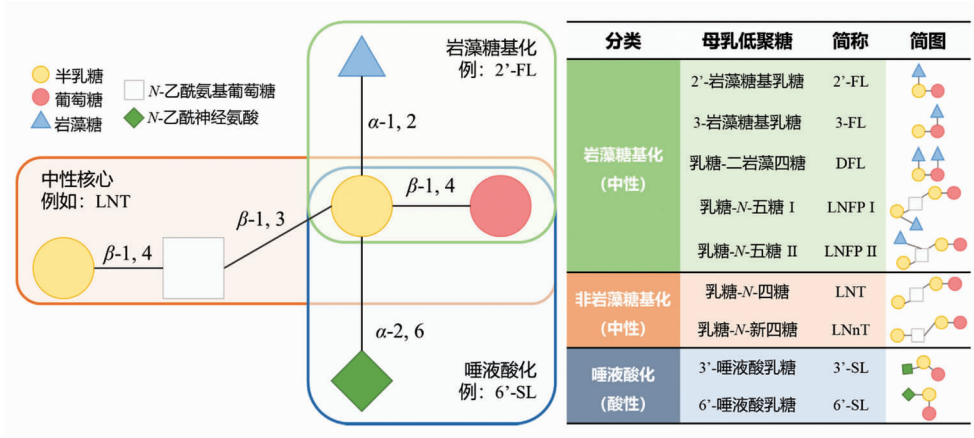


图 1 主要母乳低聚糖的结构及组成

Fig.1 Schematic diagram of the structural elements of major HMOs

在 HMOs 中,2'-FL 和乳糖-N-新四糖(Lactoyl-N-neotetraose, LNnT)被广泛研究。与其它 HMOs 相比,这 2 种母乳低聚糖的化学结构相对简单,在母乳中含量更加丰富^[14-15]。欧盟食品安全局,美国食品药品监督管理局和澳新食品标准局均已经认定这 2 种低聚糖可添加到婴幼儿配方奶粉中^[16]。目前,市场上已经出现了部分添加 HMOs 的婴幼儿配方奶粉产品(表 2)。

HMOs 具有改善肠道微环境、影响免疫应答、降低病原体入侵和促进早期大脑发育等重要的作用^[17-18]。Marcobal 等^[19]证明 LNnT 可以显著促进婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium. infantis*)的生长。目前普遍认为 HMOs 通过促进有益菌的生长来间接抑制病原菌。Newburg 等^[20]则提出 HMOs 可以增加黏膜的抗黏附性而直接减少病原微生物定殖或感染。这可能对于塑造婴儿机体的微生物组有不容

表2 市场上添加母乳低聚糖的婴幼儿配方奶粉及其含量

Table 2 Infant formula milk powder supplemented with human milk oligosaccharides on the market and its content

品牌	添加 HMOs 的种类	含量		价格 ^a
		g/100 mL 调制奶	g/100 g 奶粉	
品牌 1	2'-FL	0.020	0.13	358 元/800 g
品牌 2	2'-FL、LNT、3'-SL、6'-SL、DiFL	0.050	0.37	229 元/900 g
品牌 3	2'-FL、3'GL	0.064	0.44	325 元/900 g
品牌 4	2'-FL	0.025	0.17	328 元/800 g
品牌 5	2'-FL、LNnT、3'-SL、6'-SL、LNT、DFL	0.060	0.41	385 元/850 g
品牌 6	2'-FL	0.050	0.39	538 元/800g
品牌 7	2'-FL	0.030	0.17	315 元/900 g

注:a. 价格为电商渠道供应的海外版产品售价,均以二段奶粉产品为例。

忽视的贡献。此外,大量证据表明,大脑的发育和认知功能与含唾液酸(Sialic acid, Sia)的神经节苷脂和糖蛋白密切相关^[21]。母乳中含有丰富的唾液酸,这可能归功于母乳中唾液酸化的 HMOs。与配方奶粉喂养的婴儿相比,母乳喂养婴儿的大脑中含唾液酸的神经节苷脂和蛋白质的含量明显更高^[22]。虽然还没有确切的证据直接证明唾液酸化的 HMOs 是唾液酸的载体,但唾液酸化的 HMOs 为发育中的大脑提供了必要的营养,并且使母乳喂养婴儿具有更优越的智商和记忆力^[2]。

HMOs 的健康益处不仅仅只与婴儿有关,它们可能对于哺乳期的母亲也具有相似的作用。母亲的个人状态和所处环境等决定了其所产生的 HMOs 的种类和丰度^[23]。HMOs 也可以通过充当益生元或抑菌剂或者直接参与局部免疫反应来影响

微生物生态,进而影响母乳喂养的母亲^[24]。一些成人益生菌补充剂中会将 HMOs 作为益生元共同添加,用于改善肠道微生态。

2 母乳低聚糖的合成

母乳低聚糖获取方式的发展可以简单分为 3 个阶段:1)分离提取阶段,2)基于物质结构的化学合成阶段,3)基于生物合成的高效生物制造阶段。在分离提取阶段,人们基于乳汁中不同组分的基本物性来实现物质分离。由于新鲜乳汁原料供应有限,导致 HMO 产量极低。新鲜乳汁中还存在一些难以分离的组分,进而导致产物不纯。此外,在已经表征结构的母乳低聚糖中,通过模块化的单体组装,可以实现特定母乳低聚糖的规模化合成。这种方式的出现显著提升了生产通量并推进了工业化的实现。然而,化学合成仍然存在合成步骤复

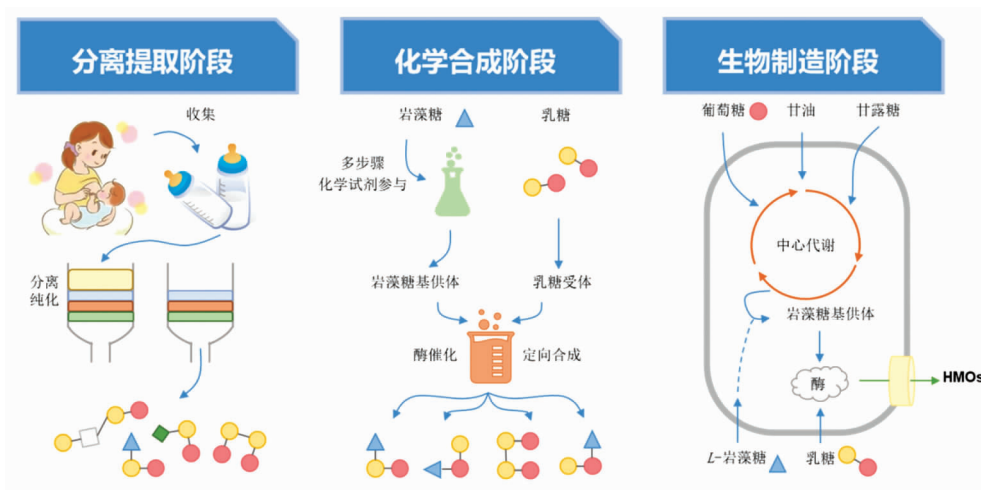


图2 获取母乳低聚糖的主要途径

Fig.2 The major approaches to obtaining human milk oligosaccharides

杂、条件苛刻以及潜在的食品安全风险。目前,由关键酶主导的生物合成途径已经表现出强劲的生产应用前景。生物法的优势主要体现在生产工艺简单和具有竞争力的底物经济性,这也使得现在生物合成 HMOs 已经成为主流。

2.1 化学酶法合成

不同于传统的化学合成,化学酶法合成的突出特点在于基于对 HMOs 化学结构和组装机制的理解,由生物酶驱动整个合成过程。该技术伴随着 PCR、DNA 重组技术等出现而得以迅速发展。这些工具保障了化学酶法合成中所必要的、具有体外催化稳定性和特异性的酶的供应。化学酶法合成的主要 2 个路径包括糖苷键的水解和糖苷键的组装。其中岩藻糖基化的 HMOs 分别由岩藻糖水解酶 (α -L-Fucosidases) 和糖基转移酶 (Fucosyltransferases, FUT) 介导。

岩藻糖苷酶 (α -L-Fucosidases) 介导的糖苷键水解。Nagae 等^[25]从婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 中分离出糖苷水解酶 (Glycoside hydrolyse, GH) 第 95 家族的第一个成员 α -1,2-L-岩藻糖苷酶 (AfcA), 并揭示了该家族 α -L-岩藻糖苷酶的一种新的催化机理, 即通过反转机制水解 Fuc- α -1,2-Gal 糖苷键。不同于传统的岩藻糖苷酶, 其可以催化连接 L-岩藻糖基团的糖苷键断裂, 进而促进带有岩藻糖基的新糖链的形成。受此启发, 人们尝试将经典的岩藻糖苷酶设计、改造成为转岩藻糖苷酶。Osano 等^[26]采用定向进化技术将来自海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 的 GH29 家族的转岩藻糖苷酶 (Tm α Fuc) 催化活性从 7% 提高到 60%。Saumonneau 等^[27]以长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. infantis) 来源的 α -L-岩藻糖苷酶作为母本, 基于半理性设计, 仅通过 1~2 个位点的突变, 在体外实现了多种复杂低聚糖的有效岩藻糖基化修饰, 可合成乳糖二岩藻四糖 (LDFT)、乳糖-N-岩藻五糖 II (LNFP-II)、乳糖-N-岩藻五糖 (LNFP-III) 和乳糖-N-二岩藻六糖 I (LNDFH-I)。史然等^[28]同样采用定向进化技术对来源于地杆菌 (*Pedobacter* sp.) 的 α -L-岩藻糖苷酶 (PbFuc29A1) 进行分子改造, 将 2'-FL 的转化率从 14.5% 提高到 23.6%。除了分子改造手段外, 挖掘性能优越的天然酶也是增强产物转化、

提升产物得率的可靠途径。Zhou 等^[29]异源表达了海洋来源的新型 α -L-岩藻糖苷酶 (OUC-Jdch16) 并证明其在最佳条件下转岩藻糖基化产物的产率在 48 h 和 120 h 内分别达到了 84.82% 和 92.15%。这些研究均表明岩藻糖苷水解酶可以实现 HMOs 的定向合成, 酶的自身性能是主导催化合成过程的关键因素。

不同于岩藻糖苷水解酶有限的转化率, 岩藻糖基转移酶理论上可以实现更高的时空产率。岩藻糖基转移酶可将单核苷酸活化的岩藻糖基供体转移至受体上, 具有明确的底物选择性。细菌来源的 α -1,2-岩藻糖基转移酶 (α -1,2-FUT), 如幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) FutC^[30], 大肠杆菌 (*E. coli*) O128 WbsJ^[31], O86:B7 WbwK^[32], O127:K63 (B8) WbiQ^[33], 都不能以乳糖作为底物。Engels 等^[34]发现了对 β -4 型半乳糖苷受体具有高活性的 WbgL, 其可以完美利用乳糖/乳果糖作为底物。有研究报道利用专一性特点, 实现了 2'-FL 的可控合成, 并且不产生其它异构副产物^[35]。

岩藻糖基转移酶在某一位置点执行精准催化的特点催生了一种化学酶法合成 HMOs 的新策略, 即在一个反应体系中的多酶级联催化, 也称做“一锅多酶合成 (One-pot multienzyme, OPME)”。通过在半乳糖模块上进行特异性酶促氧化以掩盖不需要的唾液酸化位点, 首次实现了唾液酸化糖链的可控合成^[36-37]; 在岩藻糖基化糖链合成中引入 α -2,6-唾液酸化酶和岩藻糖基化产生竞争性反应, 从而精准控制岩藻糖基化的修饰位点^[38]。上述研究已经证明, 运用不同的糖苷酶或糖基转移酶进行不同路线的糖单元组装, 可以完成多种复杂化学结构的 HMOs 合成。已有研究团队找到了具有更高活性的 β -3-半乳糖基转移酶 (β -3-GalT), 使用一锅多酶 (OPME) 策略从乳糖出发合成 LNT, 达到了克级规模 (>10 g)^[39], 并指出如果没有此 β -3-GalT, 一些 HMOs 无法通过酶促合成获得。可见, 在此过程中, 糖基转移酶的种类以及其自身催化活性仍然是限制性因素。

整体来看, 限制 HMOs 化学酶法合成的主要障碍是岩藻糖基供体来源不足和酶的底物特异性有限。这是 HMOs 合成研究中所面临的共同问题。岩藻糖基供体可以通过 OPME 方法原位合成, 而

此步骤仍受限于酶对于某一位点或底物的特异性。改善或改变酶的底物特异性是当下 HMOs 生产合成的迫切诉求。这要求所需的糖基转移酶具有更宽的底物适应性、更强的底物耐受性。

2.2 全细胞合成

利用微生物发酵生产 HMOs 相当于把体外酶催化过程放进微生物体内。同样是经过多步酶催

化,微生物反应不需要额外的催化剂或严苛的反应条件,用廉价的初级原料(葡萄糖、甘油等)就可以实现产物转化。尽管不同的 HMOs 获得途径都具有各自不可比拟的优势,但更多的生产商选择了全细胞合成法,并 HMOs 的产量仍在持续提升,且似乎还并没有真正触碰到上限。

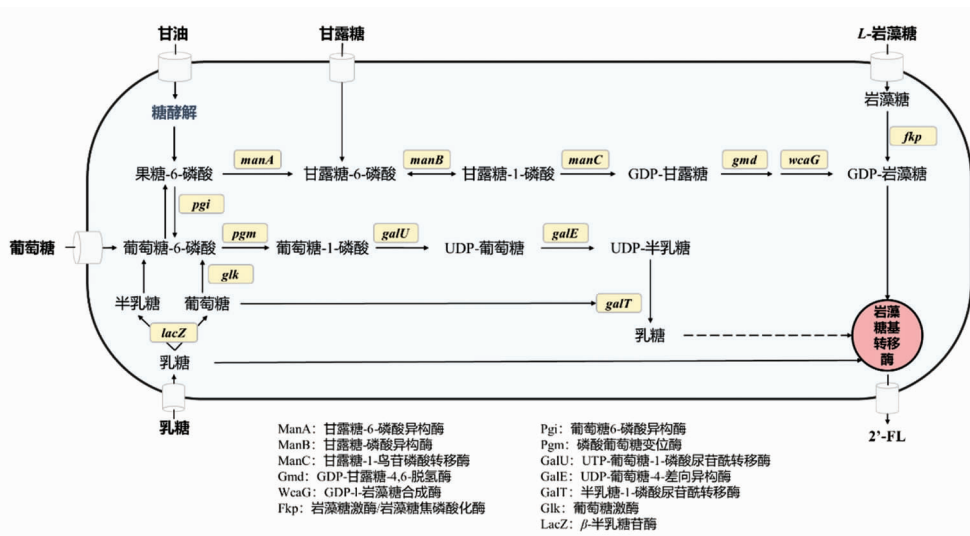


图3 微生物合成母乳低聚糖的通常策略(以大肠杆菌为例)

Fig.3 Common strategy for microbial synthesis of HMO (*E. coli* as an example)

HMOs 的合成生物学生产策略主要包括如下3部分:1)核苷酸活化的糖基供体的胞内供应;2)胞内糖基转移酶的作用;3)物质和能量供应的局部调整和优化。这个合成模式已经在多个物种中被验证,例如常见的大肠杆菌^[40-41]、酵母^[42-43]、枯草芽孢杆菌^[44]等。这些常用的表达宿主都不能天然产生和利用 HMOs,确保了其在积累或外排 HMOs 的兼容性。这种方法随着合成生物学的飞速发展而成为了当下的优先选择。已有企业证明了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)两种酵母菌株在 2'-FL 商业化生产中的潜力^[42]。Lee 等^[43]进一步优化了以木糖为底物的酿酒酵母合成 2'-FL 的能力,并实现了产物在细胞内外的定向分布。Zhang 等^[35]利用对底物识别能力不同的 2 种岩藻糖基转移酶实现了 2'-FL 和 LDFT 2 种产物的一步生产。

为了在胞内过量积累 HMO 合成所需的前体,即核苷酸活化的糖基供体,以 GDP-岩藻糖为例,

学者们基于代谢工程逻辑对大肠杆菌进行了系列改造(图3)。大肠杆菌自身虽然具备合成 GDP-岩藻糖的代谢通路,即 GDP-岩藻糖从头合成途径(以甘露糖-6-磷酸为底物,经4种酶催化得到 GDP-岩藻糖),但其代谢通量较低。已有研究发现,敲除了 β -半乳糖苷酶、岩藻糖异构酶、岩藻糖激酶、阿拉伯糖异构酶和鼠李糖异构酶可强化 GDP-岩藻糖的供给,使 2'-FL 的最高发酵产量达到 47 g/L^[40-41,45-46]。此外,通过引入了另一条 GDP-岩藻糖合成途径,可以由 L-岩藻糖直接转化得到 GDP-岩藻糖^[47]。相较于从头合成途径,该途径只需要 2 种酶参与。然而,新的产物合成途径的引入也给宿主菌株带来了更大的负担,导致转化率低。近年来,研究报道了应用于 HMOs 合成的细胞工厂的多种优化和改造策略,包括调控转录和翻译水平^[48-49],删除冗余代谢途径^[50],加强产物合成和转运^[51],核苷酸活化前体的再生,辅因子循环^[52]以及发酵策略的优化^[53]等组合作^[54],都可以有效提

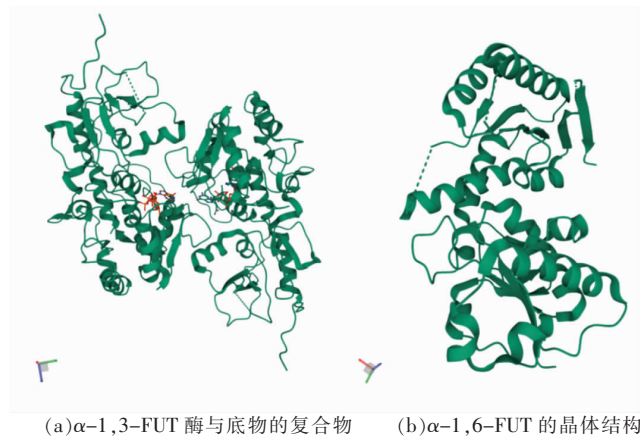
高 HMOs 的合成效率。

近年来,也有学者提出最佳的代谢工程策略是用最少的人工干预完成最大限度的产物转化。这样不仅可以避免外源基因线路引起的不兼容和细胞负担,还降低了基因工程菌遗传稳定性较差的风险。有研究发现,在用高拷贝质粒过表达聚- β -羟丁酸(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)合成酶时,意外发现低 pH 值培养基激活了大肠杆菌的可拉酸(Colanic acid, CA)生物合成,CA 的最大质量浓度可达到 10.39 g/L^[55]。CA 的前体正是 GDP-岩藻糖,这意味着在这种条件下,GDP-岩藻糖在胞内的累积也达到了极高水平。通过在重组菌中加入岩藻糖基转移酶构建 2'-FL 转化途径,发现摇瓶发酵可使 2'-FL 的质量浓度达到 1.03 g/L^[56]。相比前面提到的代谢工程策略,此路线减少了强化 GDP-岩藻糖合成途径所需的基因引入,一定程度上减少了外源基因线路对底盘细胞的干扰,有利于增加宿主的代谢效率。

胞内糖基供体(如:GDP-岩藻糖)的积累是 HMOs 合成的第 1 步,第 2 步是糖基转移酶正确识别糖基供体和受体并完成糖基的转移和组装。首先,糖基转移酶需要在细胞工厂中保持较高的异源表达活性,能够抵抗胞内复杂的生化环境。纵观目前报道过的糖基转移酶,如岩藻糖基转移酶,都几乎不能满足此要求。Seydametova 等^[57]对 10 个来源于细菌的 α -1,2-FUT 进行氨基酸序列分析,并对其中 4 条序列进行功能验证,发现只有 1 个基因能成功表达并执行催化功能。Lin 等^[54]通过在 α -1,2-FUT 的 N 端融合特定标签来增强其在细胞内的可溶性表达和稳定性。本团队通过组合 RBS 工程和融合短肽策略优化了 α -1,2-FUT 在宿主中的异源表达水平,并且证明了不同宿主对于其活性的影响不容忽视^[58]。在此基础上,本团队改造了 α -1,2-FUT 对于非天然底物(乳糖)的识别能力,通过点突变和组合突变,获得了底物亲和力提升近 100 倍的突变体,大幅度提高了糖基转移酶的效率^[59]。

与化学酶法中所面临的问题一样,细胞工厂中也需要糖基转移酶具备强劲的催化能力、精确的底物识别能力以及专一的糖基转运能力。然而,一些糖基转移酶表现出的低催化效率严重影响了

合成反应效率。因此,挖掘新的酶资源或是改造现有酶种势在必行。Zhu 等^[51]从 14 个候选酶中筛选出一个新的 β -1,3-半乳糖基转移酶 (β -1,3-GalT)并检验其在细胞工厂中的表现,结果表明该酶能够实现更高的 LNT 产量。运用定向进化技术对 α -1,3-FUT 进行改造,通过针对性的荧光底物设计并结合荧光分选,将酶的催化活性提高了 14 倍;进一步分析突变体的晶体结构后提出结构域之间铰链区的电荷转变增加了结构域之间的运动性,从而更有利于底物的进出^[60]。该区域可能是类似结构糖基转移酶的功能热点区域,研究结果对于至今没有晶体结构报道的糖基转移酶(如 α -1,2-岩藻糖基转移酶)具有重要的指导意义。然而,不同糖基转移酶之间的结构相似性很低,催化机制也不尽相同,很难将其构效关系笼统概括(图 4)。从蛋白结构上看,糖基转移酶常含有大范围的无规卷曲结构,而此区域通常很难系统研究其结构和功能。此外,以 α -1,2-岩藻糖基转移酶为例,已报道细菌来源酶之间的序列相似性很低^[58]。即使是同家族的酶尚且序列相似性低,不同家族酶从序列到结构到功能上更是很难保有共性。直至今现在,工程化改造岩藻糖基转移酶仍面临巨大挑战。



注:a 图中彩色棍棒结构为糖基供体,PDB code 为 5ZOI;b 图 PDB code 为 2HLH。

图 4 岩藻糖基转移酶的结构

Fig.4 Structure of fucosyltransferase

在搭建完 HMOs 生物合成途径后,宿主内的代谢合成还需要系统化调控。一条外源基因线路的引入可能会牵动整个细胞代谢网络的响应,特

别是产物合成途径的引入意味着更多物质和能量的全局扰动。通用性能量代谢途径改造实现产物增产的策略具有普适应,常被用于提高2'-FL合成效率。Li等^[52]证实了NADPH和GTP再生途径的共同引入更有利于2'-FL的产物合成,摇瓶发酵水平可达到2.24 g/L。Huang等^[61]对细胞内氧化还原再生途径进行了改造,进一步增强了2'-FL和3-FL的滴度。此外,在细胞合成HMOs后,还需要考虑产物的外排。产物在细胞内的浓度直接影响合成反应的进行方向、副反应的发生和细胞耐受性等。研究中普遍报道使用糖外排转运蛋白(Sugar efflux transporter, SET)家族的蛋白来转运胞内HMOs^[62]。然而,由同一转运蛋白实现的外排过程不具备选择性,外排的效果还是未知的。同时,乳糖作为底物之一在胞内高水平累积时,也会由不具备选择性的转运蛋白排出细胞,这对于产物合成是不利的。

整体来说,HMOs的合成生物学途径符合常规的逻辑策略:通过挖掘基因元件(高效的糖基转移酶)、优化基因线路(核苷酸活化的糖基供体的胞内积累)、改造底盘细胞(能量供应),经过模块化组装后执行产物合成的功能。每个模块的执行情况对于HMOs大容量生产都至关重要。值得一提的是,目前利用细胞工厂生产的HMOs都是结构相对简单的种类(如2'-FL、3-FL等),聚合度更高、复杂结构的HMOs合成似乎还存在一些不确定性。细胞内过度的糖基化反应或许也会给细胞带意外的损伤^[63-64],这可能是微生物细胞工厂在HMOs合成领域所面临的挑战。

3 展望

随着人们对健康需求的增加,HMOs已经从高端婴幼儿奶粉的添加成分升级为功能食品中的重要补充剂,并为某些医药产品的开发提供新视角。虽然国内外学者们对HMOs的研究充满热情,但从结果来看,传统生产方法的低效率、高成本与新兴生产方法的安全性风险和不确定性都使得HMOs并没有在实际生产和应用上有更大的突破。不过,国内外的财政激励和健康浪潮推动的市场升级仍然显示出HMOs的巨大应用潜力,其必将引领下一轮创新热潮。2023年10月,国家卫生

健康委员对2款HMOs物质——2'-岩藻糖基乳糖和乳糖-N-新四糖发布了“三新公告”,标志着HMOs在食品添加剂领域的新突破。我国充分具备自主研发、自主生产的能力,相信在不久的将来,HMOs乃至整个食品领域都能涌现中更多中国智造。在此期间,开发酶工程化改造的关键技术、开发具有普适性的分子设计平台,实现酶的智能创制,有望形成以核心生物酶制剂为导向的天然产物合成方式,进而进一步凸显HMOs生物合成的优势。

参 考 文 献

- [1] 傅磊. 全球奶粉贸易格局变化背景下中国奶粉进口布局优化研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020. FU L. Research on the optimization of China's milk powder import layout under the background of global milk powder trade changes[D]. Beijing: Institute of Agricultural Information Graduate School, 2020.
- [2] BODE L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(9): 1147-1162.
- [3] PARKER M G, STELLWAGEN L M, NOBLE L, et al. Promoting human milk and breastfeeding for the very low birth weight infant[J]. *Pediatrics*, 2021, 148(5): e2021054272.
- [4] NEWBURG D S, GRAVE G. Recent advances in human milk glycobiology[J]. *Pediatric Research*, 2014, 75(5): 675-679.
- [5] THURL S, MUNZERT M, HENKER J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods [J]. *British Journal of Nutrition*, 2010, 104: 1261-1271.
- [6] BODE L. The functional biology of human milk oligosaccharides[J]. *Early Human Development*, 2015, 91(11): 619-622.
- [7] SHI Y, HAN B S, ZHANG L N, et al. Comprehensive identification and absolute quantification of milk oligosaccharides in different species[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(51): 15585-15597.
- [8] 穆闯录. 不同泌乳阶段牛羊乳及母乳中蛋白质和总氨基酸分析及评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

- MU C L. Comparative analysis and evaluation of protein and total amino acid in different stages in cows, goats and breast milk.[D]. Northwest A & F University, 2017.
- [9] 张宏达, 王立娜, 张宇, 等. 基于脂质组学对母乳、牛乳及羊乳脂质的差异分析[J]. 食品科学, 2018, 41(4): 207-213.
- ZHANG H D, WANG L N, ZHANG Y, et al. Comparative lipidomic analysis of human, bovine and caprine milk[J]. Food Science, 2018, 41(4): 207-213.
- [10] 张宇, 王立娜, 张宏达, 等. 母乳、牛乳及山羊乳脂肪酸组成的差异分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 21-26.
- ZHANG Y, WANG L N, ZHANG H D, et al. Difference analysis of fatty acid composition of breast milk, bovine milk and goat milk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(4): 21-26.
- [11] VAN LEEUWEN S S, TE POELE E M, CHATZIOANNOU A C, et al. Goat milk oligosaccharides: Their diversity, quantity, and functional properties in comparison to human milk oligosaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(47): 13469-13485.
- [12] 揭良, 苏米亚, 贾宏信, 等. 母乳寡糖的研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(10): 258-260.
- JIE L, SU M Y, JIA H X, et al. Recent progress in research of human milk oligosaccharides[J]. Food Industry, 2020, 41(10): 258-260.
- [13] 陈庆学, 石丰毅, 赵丽娜, 等. 母乳低聚糖的体内代谢与体外合成研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 379-387.
- CHEN Q X, SHI F Y, ZHAO L N, et al. Recent advances in *in vivo* metabolism and *in vitro* synthesis of breast milk oligosaccharides[J]. Food Science, 2021, 42(19): 379-387.
- [14] 魏远安, 郑惠玲, 吴少辉, 等. 中国母乳中低聚糖组分及含量变化--以中国广东江门地区为例[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 180-186.
- WEI Y A, ZHENG H L, WU S H, et al. Change in composition and content of oligosaccharides in human milk from chinese lactating mothers[J]. Food Science, 2017, 38(18): 180-186.
- [15] TOTTE S M, WU L D, PARKER E A, et al. Rapid-throughput glycomics applied to human milk oligosaccharide profiling for large human studies[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406: 7925-7935.
- [16] TURCK D, CASTENMILLER J, DE HENAUW S, et al. Safety of 2'-fucosyllactose/difucosyllactose mixture as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283[J]. EFSA J, 2019, 17(6): e05717.
- [17] MOROZOV V, HANSMAN G, HANISCH F G, et al. Human milk oligosaccharides as promising antivirals[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62: 1700679-1700693.
- [18] ZIVKOVIC A M, GERMAN J B, LEBRILLA C B, et al. Human milk glycomiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108: 4653-4658.
- [19] MARCOBAL A, BARBOZA M, FROELICH J W, et al. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(9): 5334-5340.
- [20] NEWBURG D S, RUIZ-PALACIOS G M, MORROW A L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens[J]. Annual Review of Nutrition, 2005, 25(1): 37-58.
- [21] WANG B, YU B, KARIM M, et al. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2007, 85(2): 561-569.
- [22] WANG B, BRAND-MILLER J, MCVEAGH P, et al. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 74(4): 510-515.
- [23] YATSUNENKO T, REY F E, MANARY M J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. Nature, 2012, 486(7402): 222-227.
- [24] LANE J A, MEHRA R K, CARRINGTON S D, et al. Development of biosensor-based assays to identify anti-infective oligosaccharides[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 410(2): 200-205.
- [25] NAGAE M, TSUCHIYA A, KATAYAMA T, et al. Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- α -L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(25): 18497-18509.
- [26] OSANJO G, DION M, DRONE J, et al. Directed evolution of the α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an α -L-transfucosidase[J]. Biochem-

- istry, 2007, 46(4): 1022–1033.
- [27] SAUMONNEAU A, CHAMPION E, PELTIER-PAIN P, et al. Design of an α -L-trans fucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs[J]. *Glycobiology*, 2015, 26(3): 261–269.
- [28] 史然, 张登娅, 谷懿寰, 等. 地杆菌 α -L-岩藻糖苷酶的分子改造及其在合成 2'-岩藻糖基乳糖中的应用[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 135–142.
- SHI R, ZHANG D Y, GU Y H, et al. Direct evolution of the α -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. and its application in the synthesis of 2'-fucosyllactose[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 135–142.
- [29] ZHOU W, JIANG H, LIANG X, et al. Discovery and characterization of a novel α -L-fucosidase from the marine-derived *Flavobacterium algicola* and its application in 2'-fucosyllactose production[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130942.
- [30] WANG G, BOULTON P G, CHAN N W C, et al. Novel *Helicobacter pylori* α 1,2-fucosyltransferase, a key enzyme in the synthesis of Lewis antigens[J]. *Microbiology*, 1999, 145: 3245–3253.
- [31] SHAO J, LI M, JIA Q, et al. Sequence of *Escherichia coli* O128 antigen biosynthesis cluster and functional identification of an α -1,2-fucosyltransferase[J]. *FEBS Letters*, 2003, 553(1/2): 99–103.
- [32] LI M, SHEN J, LIU X, et al. Identification of a new α 1,2-fucosyltransferase involved in O-antigen biosynthesis of *Escherichia coli* O86:B7 and formation of H-type 3 blood group antigen[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(44): 11590–11597.
- [33] PETTIT N, STYSLINGER T, MEI Z, et al. Characterization of WbiQ: An α 1,2-fucosyltransferase from *Escherichia coli* O127:K63(B8), and synthesis of H-type 3 blood group antigen[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 402(2): 190–195.
- [34] ENGELS L, ELLING L. WbgL: A novel bacterial α 1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose[J]. *Glycobiology*, 2014, 24(2): 170–178.
- [35] ZHANG A, SUN L, BAI Y Y, et al. Microbial production of human milk oligosaccharide lactodifucotetraose[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 66: 12–20.
- [36] MENG X, YAO W L, CHENG J S, et al. Regioselective chemoenzymatic synthesis of ganglioside disialyl tetrasaccharide epitopes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(14): 5205–5208.
- [37] LU N, YE J F, CHENG J S, et al. Redox-controlled site-specific α 2-6-sialylation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(11): 4547–4552.
- [38] YE J F, XIA H, SUN N, et al. Reprogramming the enzymatic assembly line for site-specific fucosylation[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2: 514–522.
- [39] 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 Catalysis*, 2019, 9(12): 10721–10726.
- [40] CHIN Y W, SEO N, KIM J H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce 2'-fucosyllactose via salvage pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP) - L-fucose[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(11): 2443–2452.
- [41] CHIN Y W, KIM J Y, LEE W H, et al. Enhanced production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* BL21star (DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 210: 107–115.
- [42] HOLLANDS K. Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 232–242.
- [43] LEE J W, KWAK S, LIU J J, et al. Enhanced 2'-fucosyllactose production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* using xylose as a co-substrate[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 322–329.
- [44] DENG J Y, GU L Y, CHEN T C, et al. Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2418–2427.
- [45] CHIN Y W. Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative α -1,2-fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 257: 192–198.
- [46] JUNG S M, CHIN Y W, LEE Y G, et al. Enhanced production of 2'-fucosyllactose from fucose by elimination of rhamnose isomerase and arabinose isomerase in engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116: 2412–2417.

- [47] COYNE M J, REINAP B, LEE M M, et al. Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation[J]. *Science*, 2005, 307(5716): 1778–1781.
- [48] YU W W, JIN K, WU Y K, et al. A pathway independent multi-modular ordered control system based on thermosensors and CRISPRi improves bio-production in *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(11): 6587–6600.
- [49] ZHANG Q W, LIU Z M, XIA H Z, et al. Engineered *Bacillus subtilis* for the de novo production of 2'-fucosyllactose [J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 110.
- [50] LEE J W, KWAK S, LIU J J, et al. 2'-Fucosyllactose production in engineered *Escherichia coli* with deletion of waaF and wcaJ and overexpression of FucT2[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 340: 30–38.
- [51] ZHU Y Y, LI Z Y, LUO G C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient biosynthesis of lacto-N-tetraose using a novel β -1,3-galactosyltransferase from *Pseudogulbenkiania ferrooxidans*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(38): 11342–11349.
- [52] LI M L, LI C C, HU M M, et al. Metabolic engineering strategies of de novo pathway for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Escherichia coli* [J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 15(2): 1561–1573.
- [53] LI W, ZHU Y Y, WAN L, et al. Pathway optimization of 2'-fucosyllactose production in engineered *Escherichia coli* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(5): 1567–1577.
- [54] LIN L, GONG M Y, LIU Y F, et al. Combinatorial metabolic engineering of *Escherichia coli* for de novo production of 2'-fucosyllactose[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 351: 126949.
- [55] WU H Y, CHEN S W, JI M H, et al. Activation of colanic acid biosynthesis linked to heterologous expression of the polyhydroxybutyrate pathway in *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 128: 752–760.
- [56] CHEN Q, WU H Y, JI M H, et al. Engineering a colanic acid biosynthesis pathway in *E. coli* for manufacturing 2'-fucosyllactose[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94: 79–85.
- [57] SEYDAMETOVA E, YU J, SHIN J, et al. Search for bacterial α 1,2-fucosyltransferases for whole-cell biosynthesis of 2'-fucosyllactose in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Microbiological Research*, 2019, 222: 35–42.
- [58] LIU W X, TANG S Z, PENG J, et al. Enhancing heterologous expression of a key enzyme for the biosynthesis of 2'-fucosyllactose [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(12): 5162–5171.
- [59] LIU W X, TANG S Z, PENG J, et al. Enhancing lactose recognition of a key enzyme in 2'-fucosyllactose synthesis: α -1,2-Fucosyltransferase[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 103(3): 1303–1314.
- [60] TAN Y M, ZHANG Y, HAN Y B, et al. Directed evolution of an α 1,3-fucosyltransferase using a single-cell ultrahigh-throughput screening method [J]. *Science Advances*, 2019, 5(10): eaaw8451.
- [61] HUANG D, LIU B. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 23–28.
- [62] SUGITA T, KOKETSU K. Transporter engineering enables the efficient production of lacto-N-triose II and lacto-N-tetraose in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(16): 5106–5114.
- [63] PRUDDEN A R, LIU L, CAPICCIOTTI C J, et al. Synthesis of asymmetrical multiantennary human milk oligosaccharides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(27): 6954–6959.
- [64] LI J, HSU H C, MOUNTZ J D, et al. Unmasking fucosylation: From cell adhesion to immune system regulation and diseases[J]. *Cell Chemical Biology*, 2018, 25(5): 499–512.

Advances in the Biosynthesis of Human Milk Oligosaccharides

Liu Wenxian¹, Peng Jing¹, Cheng Haina^{1,2}, Chen Zhu^{1,2}, Wang Yuguang^{1,2}, Zhou Hongbo^{1,2*}

(¹School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083

²Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education, Central South University, Changsha 410083)

Abstract Human milk oligosaccharides are one of the most critical components of breast milk, with valuable functions such as regulating immunity and promoting brain development, and they have significant commercial potential in infant nutrition and medical therapy. The rapidly growing market demand has put new requirements on their supply, and new production methods of human milk oligosaccharides have emerged. The biosynthetic routes have broken traditional barriers and brought new opportunities and challenges to the industry. This review first introduced the basic properties and industrial application of human milk oligosaccharides, then focused on the research advances in the biosynthesis pathway of human milk oligosaccharides and discussed in depth the key technologies, advantages, and pain points of the chemoenzymatic method and microbial cell factory in their synthesis. Finally, the future outlook of human milk oligosaccharides had been prospected.

Keywords biosynthesis; chemoenzymatic; cell factory; human milk oligosaccharide