

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-083

中性核心母乳寡糖生物合成的研究进展和发展趋势

刘丹^{1,2}, 王建宇³, 江正强^{1,2}

(¹ 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; ² 中原食品实验室, 河南 漯河 462300; ³ 中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 母乳寡糖 (human milk oligosaccharide, HMO) 是母乳中重要的功能和营养成分。其中, 中性核心母乳寡糖 (neutral core human milk oligosaccharide, ncHMO) 主要包括乳糖-*N*-三糖 (LNT II)、乳糖-*N*-新四糖 (LNnT) 和乳糖-*N*-四糖 (LNT), 在婴幼儿健康发育过程中发挥着不可替代的生理作用。近年来, 中性核心母乳寡糖的生物合成技术快速发展, 其工业化生产从可能走向现实。本文综述了中性核心母乳寡糖的酶法和微生物细胞法合成研究现状, 介绍了糖基转移酶和糖苷酶在酶法合成中性核心母乳寡糖的应用, 讨论了糖基转移酶的催化特性、底盘细胞的种类及改造等关键因素对微生物细胞法合成中性核心母乳寡糖产量的影响, 进一步对比了两种方法生物合成中性核心母乳寡糖的优缺点。目前, 中性核心母乳寡糖的生物合成存在酶催化效率低、底盘细胞选择与适配性差、副产物多及内毒素污染等问题, 需通过理性设计酶元件、优化安全底盘、动态调控代谢网络及强化发酵纯化工艺等策略协同攻关, 有望实现母乳寡糖的低成本、高效绿色生产, 为开发更具营养价值的婴幼儿健康食品提供核心支撑。

关键词: 母乳寡糖; 乳糖-*N*-三糖; 乳糖-*N*-新四糖; 乳糖-*N*-四糖; 生物合成

中图分类号: Q815 文献标志码: A

Research progress and development trends in the biosynthesis of neutral core human milk oligosaccharides

LIU Dan^{1,2}, WANG Jianyu³, JIANG Zhengqiang^{1,2}

(¹ College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ² Food Laboratory of Zhongyuan, Luoyi 462300, Henan, China; ³ College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Human milk oligosaccharides (HMOs) are essentially functional and nutritional components found in human milk. They can be primarily classified into fucosylated, neutral core, and sialylated HMOs. Lacto-*N*-triose II (LNT II), lacto-*N*-neotetraose (LNnT), and lacto-*N*-tetraose (LNT) are common neutral core human milk oligosaccharides (ncHMOs), which can be extended to form longer-chain HMOs and play important roles in intestinal health. In recent years, the biosynthesis of ncHMOs has developed rapidly, and industrial-scale production is from

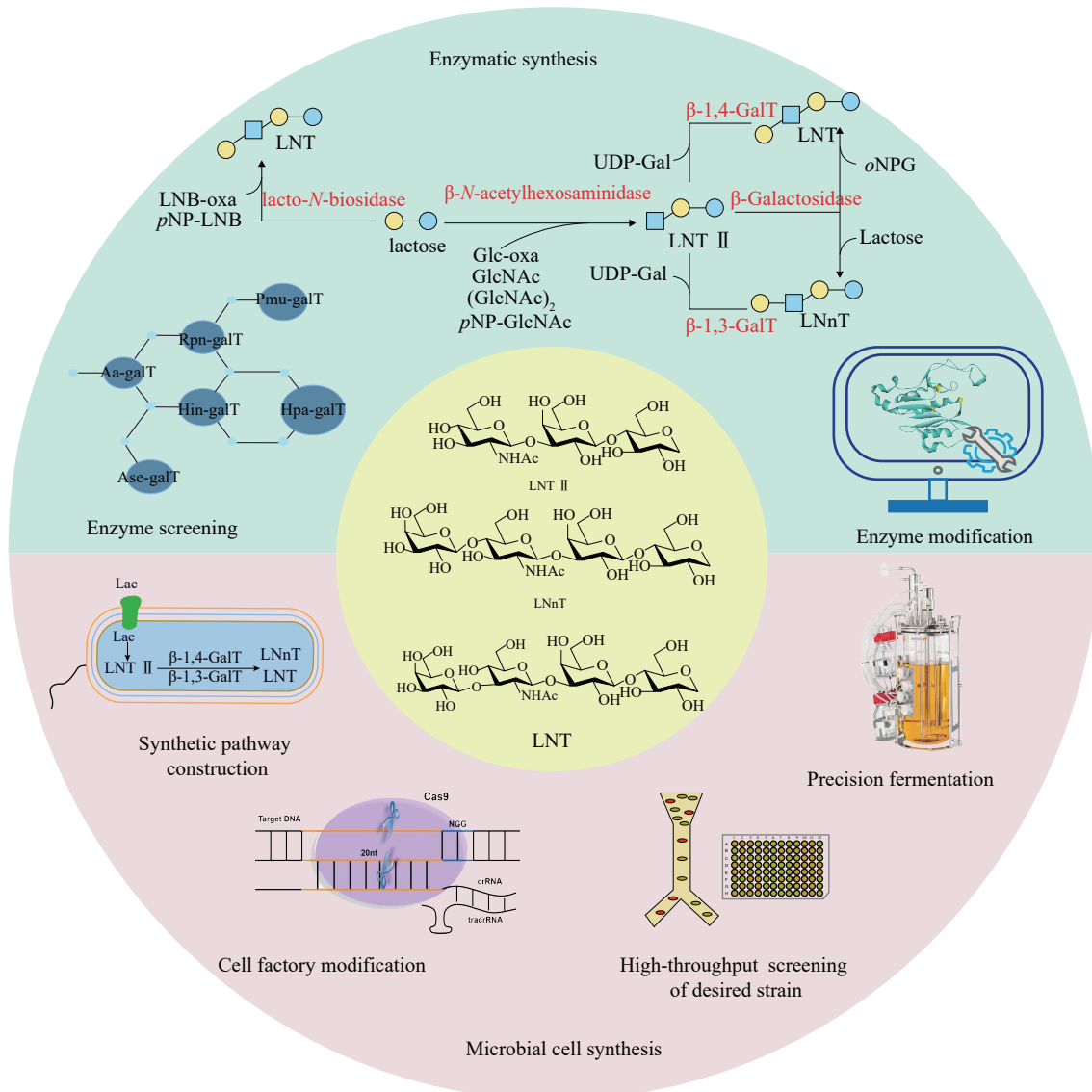
收稿日期: 2025-08-04 修回日期: 2025-09-16

基金项目: 国家自然科学基金 (32172159)

引用本文: 刘丹, 王建宇, 江正强. 中性核心母乳寡糖生物合成的研究进展和发展趋势[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 1126-1144

Citation: LIU Dan, WANG Jianyu, JIANG Zhengqiang. Research progress and development trends in the biosynthesis of neutral core human milk oligosaccharides[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(5): 1126-1144

theoretical possibility to practical reality. The synthesis approaches for ncHMOs include chemical synthesis, enzymatic synthesis, and microbial cell synthesis. As the rapid development in biotechnology, enzymatic and microbial cell synthesis have emerged as prominent methods in ncHMOs biosynthesis. Enzymatic synthesis is highly efficient, regioselective, and stereoselective. Currently, glycosyltransferases and glycoside hydrolases represent the two major types of enzymes used for biosynthesizing ncHMOs. Glycosidase-based enzymatic synthesis has demonstrated high conversion rates for LNT II and LNnT production. However, the enzymatic synthesis of LNT is less efficient and requires further improvement. Notably, the production of LNnT and LNT typically relies on LNT II as a key precursor, requiring a multi-step synthetic strategy. Microbial cell synthesis employs metabolic engineering to construct continuously synthetic pathways in microbial cells such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Knocking out genes in competitive pathway, optimizing genes expression, regenerating cofactors have significantly enhanced the yields of ncHMOs. The biosynthesis of ncHMOs faces several critical challenges, including the low activity and poor substrate specificity of key glycosyltransferases, such as β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase and β -1,3-galactosyltransferase. Additionally, the transporters of LNT II and LNnT are not clear in microbial cell. Furthermore, the yields of LNT II should be substantially improved for industrial-scale production. Thus, it is important to overcome the interconnected



limitations in enzyme engineering (particularly glycosyltransferase specificity and activity), microbial cell modification (focusing on metabolic compatibility and pathway design), and bioprocess optimization (through rational pathway redesign) *via* an integrated synthetic biology and fermentation engineering approach in the future. These strategies are essential for achieving efficient, cost-effective biosynthesis of ncHMO at industrial scale.

Keywords: human milk oligosaccharides; lacto-*N*-triose II (LNT II); lacto-*N*-neotetraose (LNnT); lacto-*N*-tetraose (LNT); biosynthesis

母乳是最富营养的食物，具有奶粉无法替代的优势。世界卫生组织与联合国儿童基金会建议，婴儿出生后6个月内纯母乳喂养，并在添加辅食后仍持续喂养至2岁或以上。母乳寡糖（human milk oligosaccharide, HMO）是母乳中一类难以消化的碳水化合物，在母乳的生理功能中占据核心地位^[1]。HMO是母乳中含量第三的固体成分，仅次于乳糖和脂类。HMO在初乳中浓度高达22~24 g/L，正常乳中维持在5~12 g/L的水平，其含量显著高于牛乳、羊乳等其他乳源^[2-3]。为提高奶粉母乳化程度，现已批准多种HMO作为核心配方成分应用于婴儿配方奶粉中。由于相关法规的批准，预计到2028年HMO市场总额达3.326亿美元（<https://www.prnewswire.com/>），这对它们的生物合成工艺提出了更高标准和要求。

HMO由D-葡萄糖、D-半乳糖、L-岩藻糖、*N*-乙酰氨基葡萄糖和*N*-乙酰神经氨酸等5种单糖通过不同糖苷键连接而成，结构多样、丰度跨度大，存在众多异构体^[4]。随着糖组学的发展，特别是生物质谱在表征聚糖方面的突破，现已发现大约200种结构不同的HMO，并表征了160种低聚糖结构^[5-7]。HMO的还原末端都带有乳糖，乳糖可通过添加 β -1, 3-连接的Gal β 1, 3GlcNAc或 β -1, 4-连接的Gal β 1, 4GlcNAc进行延伸。添加Gal β 1, 3GlcNAc形成I型链（I型寡糖），如乳糖-*N*-四糖（lacto-*N*-tetraose, LNT），LNT可进一步经岩藻糖基化修饰形成乳糖-*N*-岩藻五糖I（LNFP I）^[8]、乳糖-*N*-双岩藻糖基六糖II（LNDFH II）^[9]，经唾液酸化修饰形成双唾液酸乳糖-*N*-四糖（DSLNT）^[10]。添加的Gal β 1, 4GlcNAc则会形成II型链（II型寡糖），如乳糖-*N*-新四糖（lacto-*N*-neotetraose, LNnT），LNnT可进一步经岩藻糖基化修饰形成乳糖-*N*-岩藻乳糖III

（LNFP III）^[11]、乳糖-*N*-新双岩藻糖基六糖II（LNnDFH II）^[12]，经唾液酸化修饰形成唾液酸乳糖-*N*-四糖c（LSTc）^[13]、唾液酸乳糖-*N*-四糖d（LSTd）^[14] [图1(a)]。此外，乳糖或延伸后的寡糖链可通过添加岩藻糖（ α -1,2、 α -1,3或 α -1,4-连接）形成如2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖和二岩藻糖基乳糖等HMO，和/或通过添加唾液酸（ α -2,3或 α -2,6-连接）形成3'-唾液酸乳糖和6'-唾液酸乳糖等HMO^[15-17]。基于这些结构修饰，HMO可分为三大类：岩藻糖基化HMO、中性核心HMO和唾液酸化HMO^[18-19]。以乳糖-*N*-三糖II（lacto-*N*-triose II, LNT II）为核心骨架的LNnT和LNT是常见的ncHMO，其含量在人初乳中浓度分别可达0.4 g/L和0.59 g/L^[17, 20]（表1）。

ncHMO作为HMO的重要成分和其他关键功能性HMO的核心骨架结构，其生理功能正被逐步揭示[图1(b)]。LNT II为三糖，易被益生菌代谢或直接与宿主受体结合，能够上调肠道免疫因子DEFB1表达，对上皮细胞表面进行糖基化修饰，促进益生菌植物乳杆菌WCFS1肠道黏附与增殖^[21]。LNnT能够促进肠道干细胞增殖分化，巩固肠道屏障，效果优于低聚半乳糖^[22]。LNnT还能显著调节健康成年人的肠道菌群，特别是促进青春型双歧杆菌*Bifidobacterium adolescentis*的增殖。LNT能促进两歧双歧杆菌*B. bifidum*的增殖，并提高肠道乙酸含量^[23]。轮状病毒是导致婴幼儿患胃肠炎的主要病原体，其感染依赖于表面蛋白VP4的VP8*结构域与宿主细胞表面聚糖的特异性结合^[24]。研究表明，LNT通过氢键和疏水相互作用与VP8*稳定结合，在缓解胃肠炎方面发挥作用^[25]。LNT及LNT II衍生糖（LNFP I、LNFP II、LNFP III和DSLNT）通过黏附于致病性大肠杆菌

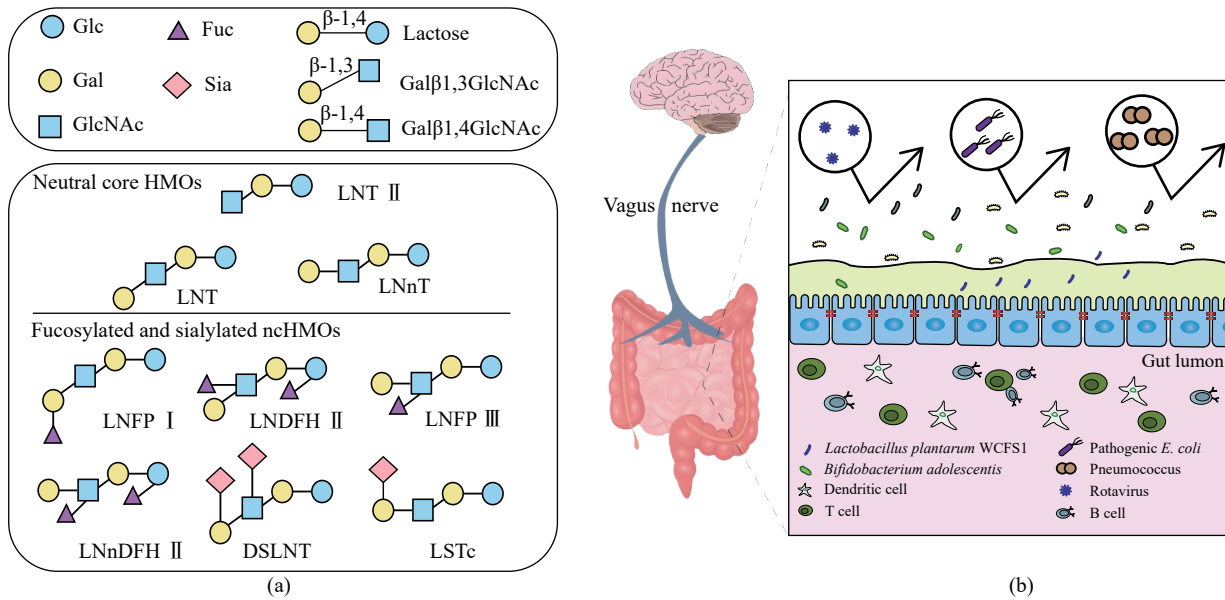


图1 LNT II 衍生糖结构 (a) 及功能 (b)

Fig. 1 The structures (a) and functions (b) of LNT II and their derivatives

表1 人初乳和正常乳中主要HMO含量

Table 1 Concentrations of major HMOs in human colostrum and regular milk

classification	HMOs	concentrations in colostrum/(g/L)	concentrations in mature breast milk/(g/L)
neutral HMOs	2'-FL	3.03 ± 1.79	1.64 ± 1.54
	3-FL	0.41 ± 0.43	1.35 ± 1.00
	LNFP I	1.90 ± 0.96	0.70 ± 0.67
	LNFP II	0.28 ± 0.37	0.54 ± 0.52
	LDFT	0.65 ± 0.71	0.19 ± 0.21
	LNDFH I	0.47 ± 0.26	0.25 ± 0.25
	LNDFH II	0.08 ± 0.10	0.12 ± 0.15
	DFLNH	0.05 ± 0.11	0.28 ± 0.30
neutral core HMOs	LNT II	0.16 ± 0.08	0.03 ± 0.01
	LNT	0.59 ± 0.39	0.59 ± 0.27
	LNnT	0.40 ± 0.12	0.34 ± 0.14
sialylated HMOs	3'-SL	0.21 ± 0.06	0.10 ± 0.02
	6'-SL	0.33 ± 0.11	0.22 ± 0.09
	DSLNT	0.36 ± 0.14	0.19 ± 0.07
	LSTc	1.37 ± 0.56	0.23 ± 0.18

和霍乱弧菌产生的不同外毒素而显示出抗病原活性^[26]。随着母乳寡糖制备技术的提高, ncHMO 衍生糖的研究也日益受到关注。LNFP III 能够激活小鼠骨髓树突状细胞, 以 TLR4 依赖的方式引发 Th2 免疫应答^[27]。LSTc 可以减少肺炎链球菌的定植和黏附, 预防肺炎链球菌感染^[28]。ncHMO 还可与其他 HMO 联用通过脑-肠轴促进大脑神经发育和认知功能完善^[29]。

最初, 研究人员利用高效液相色谱法从母乳中直接分离 ncHMO, 但分离成本很高, 难以实现规模化生产^[30]。1999 年, 研究人员首次利用化学法合成 LNnT 和 LNT, 20 多年来, 这两种寡糖的合成效率已取得显著提升^[31-33]。但化学法合成存在反应步骤繁琐(如保护基引入、偶联、脱保护)以及多次使用有毒试剂(三氟甲磺酸银、三甲基硅基三氟甲磺酸、N-碘代丁二酰亚胺)所带来的安

全隐患和环境污染等问题^[33]。随着生物技术的快速发展,酶法和微生物细胞法由于其在合成效率和环境友好性方面的突出优势,已成为目前ncHMO生物合成领域的研究热点。迄今,全球许多企业通过不同方法合成的LNnT、LNT及LNT II已获得多个国家监管机构批准,并应用于婴幼儿配方奶粉及相关食品中。2015年,欧盟批准Glycom A/S公司(现被DSM Firmenich收购)化学法合成的LNnT用于婴幼儿配方奶粉、食品补充剂、乳制品和类似物等多类食品中^[34]。2016年,Glycom A/S公司改造大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 DH1菌株合成的LNnT通过美国食品药品监督管理局(FDA)的一般公认安全(Generally Recognized as Safe, GRAS)认证。2019年,大肠杆菌K-12 DH1菌株合成的LNT通过GRAS认证。2020—2022年,大肠杆菌BL21发酵生产的LNnT和LNT通过了欧洲食品安全局(EFSA)的安全性评估^[35-36],随后欧盟委员会发布了上述LNnT和LNT作为新食品原料的授权公告。2023年10月,我国国家卫生健康委员会发布公告,批准由大肠杆菌K-12 DH1 MDO菌株合成的LNnT作为食品营养强化剂,可应用于部分奶粉和配方食品中。同年,我国恒鲁生物科技有限公司改造酵母合成的LNT II通过了美国GRAS认证。

本文将系统性综述中性核心母乳寡糖(ncHMO)生物合成研究的最新进展,分析讨论其生物合成所面临的关键技术挑战和发展前景,以期深化对ncHMO生物合成领域的认知,为推动以LNT II、LNnT和LNT为代表的HMO的绿色、高效、规模化生物制造提供科学依据。

1 酶法合成ncHMO

酶法合成具有高效性和立体区域选择性,能够有效地保证特定糖苷键构型并将单糖逐个加到糖基受体特定位置。相比于化学法,酶法合成反应过程无需添加有毒有害试剂,且环境友好。糖基转移酶和糖苷水解酶是目前合成ncHMO的两大类酶。

1.1 酶法合成LNT II

LNT II作为合成LNT和LNnT的直接前体,其高效合成是LNnT和LNT生物合成的重要前提。利用 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶(β -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase, EC 2.4.1.149)合成LNT II时,尿苷-5'-二磷酸-*N*-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)为常用糖基供体, β -乳糖为常用糖基受体^[37]。迄今,仅报道了脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)和幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)等少数细菌来源的 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶用于酶法合成LNT II,LNT II转化率为90%左右^[38-39]。

目前,LNT II的酶法合成主要利用 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β -*N*-acetylhexosaminidase, EC 3.2.1.52)。酶反应过程中,对硝基苯-*N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖(*p*NP-GlcNAc)、*N*-乙酰氨基葡萄糖和几丁二糖[(GlcNAc)₂]为糖基供体, β -乳糖为糖基受体^[40-42]。 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶来源广泛,主要存在于植物、哺乳动物、昆虫、细菌和真菌中。不同来源的 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶合成LNT II转化率不同(表2)。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)来源的*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶NagA(GenBank: AB085840.1)通过逆水解反应合成LNT II的转化率仅为0.21%^[41]。人肠道细菌*Tyzzarella nexili*来源的*TnHex189*是一种高效的 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶,在最适条件下合成LNT II的转化率为57.2%^[52]。 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶的转糖苷反应具有稳定性高、底物廉价等优点,但野生型 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶存在转化率低等问题。优化合成条件,如反应pH、温度、时间、受体浓度和加酶量等能够提高转化率,但提高程度有限,一般低于15%^[53]。为提高 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶的转糖苷活性,需要采用蛋白质工程手段进行分子改造。Liu等^[48]从*Haloferula sp.*中挖掘的野生型 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶(*HaHex74*)能够以几丁质降解产物几丁二糖为糖基供体合成LNT II,为利用几丁质合成LNT II提供新思路。为提高LNT II转化率,Liu等^[49]利用定向进化耦合饱和和突变获得了转化率提高两倍的突变体(*mHaHex74*),转化率达28.2%,为目

表2 不同来源的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶合成LNT II情况Table 2 Comparison of LNT II synthesis by different β -N-acetylhexosaminidases

来源	酶	受体	供体	转化率/%	参考文献
米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)	NagA	乳糖	GlcNAc	0.21	[41]
两歧双歧杆菌(<i>Bifidobacterium bifidum</i>)	BbhI-WT	乳糖	β -D-Glc _p NAcOpNP	16	[43]
两歧双歧杆菌(<i>B. bifidum</i>)	BbhI-D714T	乳糖	pNP-GlcNAc	84.7	[44]
两歧双歧杆菌(<i>B. bifidum</i>)	BbhI-D746E	乳糖	Glc-oxa	86.0	[45]
两歧双歧杆菌(<i>B. bifidum</i>)	BbhI-D746T	乳糖	pNP-GlcNAc	85.0	[44]
光冈链状杆菌(<i>Catenibacterium mitsuokai</i>)	CmHex187	乳糖	pNP-GlcNAc	44.3	[46]
居海藻黄杆菌(<i>Flavobacterium algicola</i>)	FlaNag2353	乳糖	pNP-GlcNAc	4.15	[47]
<i>Haloferula</i> sp.	HaHex74	乳糖	(GlcNAc) ₂	14.4	[48]
<i>Haloferula</i> sp.	mHaHex74	乳糖	(GlcNAc) ₂	28.2	[49]
土壤宏基因组	HEX1	乳糖	(GlcNAc) ₂	16.1	[50]
紫色链霉菌(<i>Streptomyces violascens</i>)	Hex(Sv)-2557(D297K)	乳清粉	(GlcNAc) ₂	14.85	[51]
丁氏泰泽菌(<i>Tyzzeraella nexilis</i>)	TnHex189	乳糖	pNP-GlcNAc	57.2	[52]

前天然供体的最高值。mHaHex74在分子上发生了两处突变，即His394Leu和Asn401Ile。其中His394Leu位于酶分子表面，提高了突变体的柔性；Asn401Ile位于催化凹槽入口处，降低了突变体凹槽内部水分子活度从而提高突变体转糖苷活性。此外，两歧双歧杆菌来源的Bbh I(GenBank: AB504521.1)也是一种高效的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶，Asp714和Asp746是Bbh I的关键残基，突变体D714T合成LNnT的转化率达85%，且不水解转糖苷产物^[44]。突变体D746E的选择性参数(转糖苷化与产物水解的比值)提高了13倍，1 h内利用NAG-1,2-噁唑啉(NAG-oxa)和乳糖合成LNT II转化率高达86%^[45]。Cao等^[51]选择 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的催化口袋入口处的关键残基Asp297作为突变靶点，基于定点饱和突变筛选出了高转糖苷活性和低水解活性的突变体Hex(Sv)-2557(D297K)。Hex(Sv)-2557(D297K)以乳清粉和(GlcNAc)₂为底物合成LNT II，转化率达14.85%。

与 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶相比， β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶催化效率更高，且反应不可逆，但来源有限，且异源表达困难^[38-39]。此外， β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶合成需要使用价格高昂的UDP-GlcNAc为糖基供体，无法使用更廉价易得的替代品。 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶合成LNT II所需底物(GlcNAc)₂或GlcNAc价格低廉且来源广泛，特别是(GlcNAc)₂和GlcNAc，可从几丁质(来源于虾蟹壳等废弃物)的酶解产物中获

得，原料成本低且可持续^[48]。

1.2 酶法合成LNnT

酶法合成LNnT主要利用 β -1,4-半乳糖基转移酶(β -1,4-galactosyltransferase, β -1,4-GalT, EC 2.4.1.22)和 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, EC 3.2.1.23)。 β -1,4-GalT能够催化UDP-半乳糖(UDP-galactose, UDP-Gal)的半乳糖基转移至LNT II，形成LNnT。Wakarchuk等^[54]首次表征了脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)的Nm-LgtB蛋白功能，证实它能够严格识别 β -GlcNAc并作为一种 β -1,4-半乳糖转移酶催化LNnT合成。酶法合成过程中，不同 β -1,4-GalT催化合成LNnT的转化率不同(表3)。

伴放线聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)来源的 β -1,4-GalT(GenBank: AP014520.1)催化LNT II和UDP-Gal合成LNnT的转化率达65%，而睡眠嗜组织菌(*Histophilus somni*)来源的 β -1,4-GalT(GenBank: WP_081376949.1)合成LNnT的转化率仅为33%^[55-56]。Luo等^[61]首次获得伴放线聚集杆菌来源的 β -1,4-GalT晶体结构，基于“隧道工程”对酶分子隧道周围关键位点进行多轮突变，得到酶活显著提高的突变体L5(K155M/H156D/F157W/K185M/Q216V)。由于底物UDP-Gal价格高昂，且纯化后的 β -1,4-GalT不稳定性，严重限制了酶法合成LNnT^[62]。

表3 β -1,4-半乳糖基转移酶和 β -半乳糖苷酶合成LNnT汇总Table 3 Summary of LNnT synthesis by β -1,4-galactosyltransferases and β -galactosidases

来源	酶	受体	供体	转化率/%	参考文献
伴放线聚集杆菌(<i>A. actinomycetemcomitans</i>) NUM 4039	<i>Aa</i> - β -1,4-GalT	LNT II	UDP-Gal	65	[55]
睡眠嗜组织菌(<i>H. somni</i>)	<i>Hs</i> - β -1,4-GalT	LNT II	UDP-Gal	33	[56]
环状芽孢杆菌(<i>Bacillus circulans</i>) ATCC 31382	Biolacta	LNT II	乳糖	19	[57]
环状芽孢杆菌(<i>B. circulans</i>) ATCC 31382	BgaD-D	LNT II	乳糖	17	[40]
芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i> sp.)	<i>mBsGal95-D</i>	LNT II	乳糖	30.1	[58]
嗜热栖热菌(<i>Thermus thermophilus</i>) HB27	<i>Tt</i> β -gly	LNT II	乳糖	5.2	[40]
水管致黑栖热菌(<i>T. scotoductus</i>)	<i>mTsGal48</i>	LNT II	乳糖	25.3	[59]
超嗜热菌(<i>Pyrococcus furiosus</i>) DSM 3638	CelB	LNT II	乳糖	1	[40]
南极类芽孢杆菌(<i>Paenibacillus antarcticus</i>)	<i>PaBgal2A-D</i>	LNT II	乳糖	16.4	[60]

少数 β -半乳糖苷酶能够利用廉价的乳糖合成LNnT, 相比于 β -1,4-GalT, β -半乳糖苷酶更适合LNnT大规模制备。酶源与反应条件是提高LNnT合成效率的重要因素。Murata等^[57]利用市售 β -半乳糖苷酶首次合成LNnT, 转化率为19%。Zeuner等^[40]比较了环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*, BgaD-D) ATCC 31382、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*, *Tt* β -gly) HB27和超嗜热菌(*Pyrococcus furiosus*, CelB)来源的半乳糖苷酶的转糖苷活性。通过优化底物浓度, BgaD-D合成LNnT转化率最高达17%, 但耐热性差; *Tt* β -gly在高温下表现较突出, 适合高温合成工艺。目前关于LNnT合成用 β -半乳糖苷酶的分子改造较少。Wang等^[59]挖掘并分子改造了水管致黑栖热菌(*Thermus scotoductus*)来源的 β -半乳糖苷酶(GenBank: WP_126165003.1), 获得了LNnT转化率明显提高的突变体*mTsGal48*。突变体由野生型*TsGal48*的高度保守氨基酸Phe76突变为Asp76。突变位点位于酶活性中心附近, 突变后酶-半乳糖中间体的不稳定性增加, 酶利用乳糖的转糖苷活性提高。酶截短是增加糖苷酶表达量和提高其转糖苷活性的有效方法^[63-65]。王建宇等^[58]从芽孢杆菌S3基因组中克隆了一个新型截短 β -半乳糖苷酶(*BsGal95-D*, GenBank: WP_149871867)并进行理性设计, 获得LNnT转化率明显提高的突变体T603A/Y606G (*mBsGal95-D*)。mBsGal95-D利用乳糖和LNT II合成LNnT的转化率达30.1%, 为野生型的1.64倍, 达到利用乳糖为供体合成LNnT的最高水平。

β -1,4-半乳糖基转移酶催化合成LNnT转化率

远高于 β -半乳糖苷酶, 但价格高昂的底物UDP-Gal以及辅因子严重限制了其工业化应用前景^[55]。 β -半乳糖苷酶虽然存在转化率低和水解副反应等不足, 但其可利用价廉的乳糖合成LNnT。此外, β -半乳糖苷酶来源广泛、稳定性高, 更易于工程改造^[59], 能够为大规模制备LNnT提供有效酶工具。

1.3 酶法合成LNT

酶法合成LNT常用 β -1,3-半乳糖基转移酶(β -1,3-galactosyltransferase, β -1,3-GalT, EC 2.4.1.-)、*N*-乙酰乳糖酶(lacto-*N*-biosidase, EC 3.2.1.140)和 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, EC 3.2.1.23)。基于 β -1,3-GalT的酶法合成LNT需要价格昂贵的底物, 因此酶法合成LNT的研究较少(表4)。目前, 仅有大肠杆菌O55:H7和紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)来源的 β -1,3-GalT用于分步酶法合成LNT, 在获得LNT II的基础上, LNT转化率分别高达87%和99%^[66-67]。

N-乙酰乳糖酶能水解LNT并从其非还原端释放二糖lacto-*N*-biose (Gal β 1,3GlcNAc, LNB), 少数*N*-乙酰乳糖酶具有转糖苷活性, 通过 β -1,3-糖苷键直接耦合LNB和乳糖合成LNT^[68]。目前已报道了两个能合成LNT的*N*-乙酰乳糖酶(表4)。金杆菌(*Aureobacterium* sp.) L-101来源的*N*-乙酰乳糖酶转糖苷活性较弱, LNT转化率仅为0.6%^[57]。两歧双歧杆菌JCM 1254来源的*N*-乙酰乳糖酶研究较多, 其能将LNT水解为乳糖和LNB以供自身吸收代谢, 当以*p*NP-LNB和乳糖为底物时, 能够检测到转糖苷活性^[73]。Schmölzer等^[68]利用定

表4 β -1,3-半乳糖基转移酶、*N*-乙酰乳糖酶和 β -半乳糖苷酶合成LNT汇总Table 4 Summary of LNT synthesis by β -1,3-galactosyltransferases, lacto-*N*-biosidases, and β -galactosidases

来源	酶	受体	供体	转化率/%	参考文献
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)O55:H7	WbgO	LNT II	UDP-Gal	87	[66]
紫色色杆菌(<i>Chromobacterium violaceum</i>)	Cy β GalT	LNT II	UDP-Gal	99	[67]
金杆菌(<i>Aureobacterium</i> sp.)L-101	—	乳糖	<i>p</i> NP-LNB	0.6	[57]
两歧双歧杆菌(<i>B. bifidum</i>)JCM 1254	LnbB-D320E	乳糖	LNB-oxa	30	[68]
两歧双歧杆菌(<i>B. bifidum</i>)JCM 1254	LnbB-W394F	乳糖	<i>p</i> NP-LNB	32	[69]
两歧双歧杆菌(<i>B. bifidum</i>)JCM 1254	LnbB-W394H	乳糖	LNB-oxa	72	[70]
环状芽孢杆菌(<i>Bacillus circulans</i>)ATCC 31382	β -gal-3	LNT II	<i>o</i> NPG	20,22	[57,71]
玉米乳酪杆菌(<i>Lactocaseibacillus zeae</i>)	<i>Lz</i> Bgal35A	LNT II	<i>o</i> NPG	45.4	[72]

注：—表示未命名。

点突变得到了LnbB突变体D320E，以LNB-oxa为供体和乳糖为受体合成LNT转化率达30%，对产物的二次水解作用明显降低，但仍存在较高的LNB-oxa水解活性。W394是LnbB活性中心的关键残基，位于底物结合亚位点-1的疏水区域。利用蛋白质工程获得了W394F和W394H突变体^[69-70]。突变体W394F利用*p*NP-LNB为糖基供体，合成LNT转化率达32%；突变体W394H明显降低产物的二次水解，W394H分别以LNB-oxa或*p*NP-LNB反应3 h和2 h，LNT转化率分别为72%和8%。W394F突变保留了芳香环的疏水特性，维持底物结合的基本框架，但移除了咪唑环的N—H基团削弱底物结合强度，从而减少过渡态的稳定，抑制水解倾向^[69]。W394H突变通过引入极性氨基酸削弱疏水作用，抑制水解过渡态的稳定^[70]。

不同来源的 β -半乳糖苷酶具有不同的区域选择性，催化形成的糖苷键类型取决于其活性位点对受体分子羟基的特异性识别。因此，某些 β -半乳糖苷酶主要生成 β -1,4-糖苷键，而另一些则倾向于生成 β -1,3-糖苷键^[57, 59]。LNnT合成用 β -半乳糖苷酶较多，而LNT合成用 β -半乳糖苷酶数量较少（表4）。Murata等^[57]从环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)中鉴定出一种对 β -1,3-糖苷键具有水解特异性的 β -半乳糖苷酶。该酶能够高效地从LNT中释放半乳糖，还能催化合成LNT及其同分异构体(Gal β 1, 6GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc)。为了提高LNT的纯度和转化率，Miyazaki等^[71]

在反应体系中加入了10%的助溶剂*N,N*-二甲基甲酰胺和来自于大肠杆菌的特异性水解LNT同分异构体的 β -半乳糖苷酶，获得的LNT转化率更高(22%)。Li等^[72]从玉米乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus zeae*)中挖掘了能够合成LNT的又一新酶*Lz*Bgal35A，以*o*NPG为糖基供体和LNT II为糖基受体合成LNT转化率为45.4%，为目前报道最高值。

β -1,3-半乳糖基转移酶和*N*-乙酰乳糖酶催化合成LNT转化率较高^[67, 69]，且具备高度的区域选择性，但所需底物(UDP-Gal、LNB、*p*NP-LNB、LNB-oxa)价格昂贵，不符合实际应用。 β -半乳糖苷酶存在区域选择性差以及催化效率低等问题，但可通过酶工程手段提高。此外， β -半乳糖苷酶合成LNT所需的乳糖底物价格低廉，更易于实际应用。

1.4 酶法合成其他ncHMO

酶法合成长链的ncHMO研究较少。Fang等^[74]利用多步酶法以6-叠氮己基乳糖苷为底物，依次合成了LNT II、LNnT、Type-2五糖(GlcNAc β 1,3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc)和*para*-乳糖-*N*-新六糖(*para*-lacto-*N*-neohexaose, *p*LNnH)。当以Type-2五糖为受体，利用幽门螺旋杆菌来源的 β -1,4-半乳糖基转移酶合成*p*LNnH得率为97%，但产量仅为59 mg。Vuillemin等^[75]发掘了GH136家族*N*-乙酰乳糖酶LnbX，以LNT为LNB供体，LNnT

为受体, 通过一步转糖苷反应合成了对位乳糖-*N*-六糖 (*para*-lacto-*N*-hexaose, *pLNH*)。但野生型 *LnbX* 的转糖苷效率较低 (最大得率仅 18%), 且存在水解等副反应。进一步, 基于理性设计获得了高选择性突变体 *LnbX* D416N, 3 h 内得率为 57% (摩尔分数), 且 *pLNH* 占总转糖苷产物的 82%。

2 微生物细胞法合成 ncHMO

微生物细胞法合成 ncHMO 主要基于代谢工程, 利用微生物体内代谢途径和糖基转移酶的体内区域和立体选择活性, 在微生物中过表达异源糖基转移酶基因以及调控合成路径上其他相关酶基因的表达^[76-78]。近年来, 由于合成生物学和系统生物学的快速发展, 生物合成途径的改造更易于操作, 从而使微生物细胞法合成 ncHMO 成为主流方法。

2.1 微生物细胞法合成 LNT II

在微生物细胞法合成 LNT II 的研究中, 大肠杆菌是目前应用最广泛和研究最深入的工程菌

株 (表 5)。

由于大肠杆菌缺乏 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶, 需将其引入才能利用外源添加的乳糖或 *N*-乙酰氨基葡萄糖和内源合成的 UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖 (UDP-GlcNAc) 合成 LNT II (图 2)。内源 UDP-GlcNAc 合成通路包含 *glmM*、*glmU* 以及 *glmS* 等关键基因, Zhu 等^[76] 利用不同拷贝数质粒微调 UDP-GlcNAc 合成通路表达强度, 并定点突变了 *glmS* 以解除前体物 GlcN-6-P 的反馈抑制, 敲除竞争路径中 *wecB* 和 *nagB* 后, 5 L 发酵罐中 LNT II 产量高达 46.2 g/L。乳糖作为合成 LNT II 的直接底物, 不同大肠杆菌菌株利用其效果不同。与大肠杆菌 BL21 (DE3) 相比, 大肠杆菌 JM109 需过表达 *lacY* 以提高乳糖渗透率^[77]。此外, 还需敲除 *lacZ* 防止乳糖降解^[77]。Hu 等^[78] 利用几丁质降解产物 GlcNAc 为底物, 敲除 *lacZ* 和 *nanE* 阻断副反应途径减少底物浪费, 过表达 *nagA*、*glmM* 和 *glmU* 以增强前体 UDP-GlcNAc 的供应, 通过基因表达优化, 3 L 发酵罐中 LNT II 产量为 15.8 g/L, 为利用生物质原料合成 HMO 提供了新思路。Sugita 等^[79] 过表达大肠杆菌内源转运体基因 *setA* 显著提高了 LNT II 产量, 但 *SetA* 转运 LNT II 具体转运机制尚不清晰。除了改造传统大肠杆菌, 还可以改造益生菌大肠

表 5 微生物细胞法合成 LNT II

Table 5 Microbial cell factory for LNT II synthesis

菌株	改造情况	底物	发酵条件	发酵罐产量/(g/L)	参考文献
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)JM109	<i>lacY</i> ⁺ <i>lacZ</i> ⁻ pCW- <i>NmlgtA</i>	乳糖、甘油	pH 6.8、34 °C、0.2 mmol/L IPTG、矿物培养基	6(2 L) ^①	[77]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	Δ <i>wecB</i> Δ <i>nagB</i> Δ <i>lacZ</i> pRSF- <i>glmM</i> - <i>glmU</i> - <i>glmS</i> * pET- <i>NmlgtA</i>	乳糖、甘油	pH 6.8、25 °C、0.1 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	46.2(5 L)	[76]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	Δ <i>lacZ</i> Δ <i>nanE</i> ⁻ pRSF- <i>nagA</i> - <i>glmM</i> pET- <i>glmU</i> pET- <i>NmlgtA</i>	乳糖、GlcNAc	pH 6.9、25 °C、0.2 mmol/L IPTG、GlcNAc 优化培养基	15.8(3 L)	[78]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)W3110S	Δ <i>lacZY</i> Δ <i>yhjB</i> pUAKQE- <i>NplgtA</i> - <i>lacY</i>	乳糖、葡萄糖	pH 6.9、30 °C、1 mmol/L IPTG、葡萄糖优化培养基	34.2(3 L)	[79]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)Nissle 1917	pSTV29- <i>setA</i> Δ <i>endA</i> Δ <i>wecB</i> pET-P _{<i>lac</i>} - <i>NmlgtA</i>	乳糖、甘油	— ^② 、25 °C、—、—	2.04(3 L)	[80]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)K12 MG1655	Δ <i>nagB</i> Δ <i>wecB</i> Δ <i>lacIZ</i> ::P _{J23116} - <i>lacY</i> - <i>GlmS</i> * pTrc99A- <i>Nm58lgtA</i> (R13H/L24M/R205C)- InfB-RBST7- <i>GlmS</i> *	乳糖、甘油	—、25 °C、—、M9 培养基	57.44(3 L)	[81]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)JM109 + 酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>E. coli</i> JM109(DE3) pET- <i>NahK</i> -linker- <i>EcglmU</i> - <i>lgtA</i>	乳糖、GlcNAc	pH 6.98、18 °C、0.2 mmol/L IPTG、葡萄糖优化培养基	52.34(5L)	[82]

① 括号内为发酵罐体积。

② “—” 表示不详。

促融标签减少了包涵体形成,最后通过RBS工程和优化关键限速酶表达提高了LNT II合成水平,在5 L发酵罐中产量达57.44 g/L,为目前报道最高水平。Wang等^[82]采用两步法全细胞催化策略,开发了大肠杆菌-酵母耦合系统,以GlcNAc和乳糖为底物在5 L发酵罐中合成了52.34 g/L LNT II,乳糖转化率达95.95%。

2.2 微生物细胞法合成LNnT

微生物细胞法合成LNnT是在LNT II合成通路的基础上引入异源 β -1,4-GalT,催化内源UDP-半乳糖的半乳糖残基转移到LNT II上形成LNnT(图2)。目前已报道许多 β -1,4-GalT用于LNnT微生物细胞合成,产量在1.24~112.47 g/L(表6)。微生物细胞法合成LNnT的研究较多,已在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母等微生物细胞中实现了LNnT的生物合成。

2.2.1 细菌底盘合成LNnT

大肠杆菌具有遗传背景清晰、操作简便等优点,已成为合成LNnT的主要底盘,在产量和应用方面占据重要地位。目前,已报道嗜血杆菌(*Histophilus somni*)^[56]、伴放线聚集杆菌NUM4039^[83]、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)^[84]、脑膜炎奈瑟氏菌^[85]、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)^[86]来源的 β -1,4-GalT用于合成LNnT。研究表明,幽门螺杆菌来源的 β -1,4-GalT在大肠杆菌中合成LNnT产量更高,且LNT II残留更少^[87]。基因敲除是强化LNnT合成通路普遍使用的策略,通常需要敲除*lacZ*、*nagB*、*wecB*、*ugd*、*wcaC*和*wcaJ*^[88-89]。模块化工程、辅因子工程、RBS工程、转运体工程也能显著提高大肠杆菌合成LNnT产量^[87, 89, 95-96]。Tao等^[86]首次利用群体响应系统动态调控LgtA和 β -1,4-GalT的表达,在5 L发酵罐中LNnT产量达20.33 g/L。在合成LNnT的过程中,糖基转移酶的底物混杂性导致长链寡糖衍生物pLNnH的生成,影响产物纯度和质量。通过计算机辅助进行同源建模和分子对接,鉴定了LgtA的底物结合口袋,采用丙氨酸扫描和位点饱和突变技术对关键氨基酸位点(N223和K228)进行突变,引入空间位阻阻止LNnT作为底物进入催化口

袋,从而减少了副产物的产生,但LNnT合成产量也随之降低^[97]。最近,Liu等^[96]以葡萄糖为唯一碳源、构建内源乳糖合成途径,敲除葡萄糖磷酸转移酶系统基因*ptsG*和*ptsI*优化了葡萄糖利用,为降低生产成本提供了新策略。Liao等^[89]筛选了高效的LNnT转运蛋白*CmSET*,优化了碳源(甘油/葡萄糖)比例,实现了LNnT在吨级发酵罐的放大生产,产量达107.4 g/L。与大肠杆菌相比,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)无内毒素更具安全性,同时具有较好的分泌能力^[98],LNnT合成潜力较大。迄今,枯草芽孢杆菌合成LNnT的研究较少,5 L发酵罐产量在5 g/L左右^[92-93]。

2.2.2 真菌底盘合成LNnT

除了细菌外,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[99]和法夫驹形氏酵母(*Komagataella phaffii*,曾用名毕赤酵母)^[94]等也用于合成LNnT。相较于大肠杆菌产内毒素的风险,这些微生物是GRAS菌株,且不会降解直接底物乳糖。Liu等^[99]开发了一种高效的UDP-葡萄糖再生偶联比色法高通量筛选技术,从突变库中筛选出高活性 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶,通过增强异源基因的表达,构建的酿酒酵母工程菌株合成LNnT产量提升至1.29 g/L。法夫驹形氏酵母合成LNnT面临更大挑战。其一是法夫驹形氏酵母构建细胞工厂的基因编辑工具尚不成熟且基因调控元件匮乏,LNnT合成过程需将 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,4-GalT、乳糖渗透酶和UDP-葡萄糖-4-差向异构酶等异源酶整合到法夫驹形氏酵母基因组中,增加了改造难度^[94]。其二是法夫驹形氏酵母表达系统依赖具有毒性的甲醇作为诱导剂,增加了LNnT生物合成的安全风险^[94]。

2.3 微生物细胞法合成LNT

迄今,微生物细胞法合成LNT均在大肠杆菌中开展,尚未见利用其他微生物底盘合成LNT的报道。只有沙门氏菌(*Salmonella enterica*)^[84]、嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Pseudogulbenkiania ferrooxidans*)^[100]、大肠杆菌O55:H7^[101]来源的 β -1,3-GalT用于大肠杆菌合成LNT(表7)。

Li等^[90]通过敲除竞争路径酶基因,提高辅因子UTP供应,利用不同拷贝数质粒微调LNT合成通路基因,最终工程大肠杆菌菌株在5 L发酵罐中

表6 微生物细胞法合成LNnT
Table 6 Microbial cell factory for LNnT synthesis

菌株	改造情况	底物	发酵条件	发酵罐产量/(g/L)	参考文献
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) JM09	pCW- <i>lgtA</i> pBB- <i>lgtB</i>	乳糖、葡萄糖	pH 6.8、28 °C、0.2 mmol/L IPTG、矿物培养基	<5(2 L) ^①	[77]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	$\Delta wecB\Delta nagB\Delta lacZ$ pRSF- <i>M-US*</i> pET- <i>lgtA</i> pAC- <i>AagalT</i> (源自 <i>A. actinomycetemcomitans</i> NUM4039)	乳糖、甘油	pH 6.8、25 °C、0.2 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	12.1(3 L)	[83]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21 star (DE3)	$\Delta lacZ\Delta ugd\Delta ushA\Delta agp\Delta wcaJ\Delta otsA\Delta wcaC\Delta galM::$ <i>galETKM</i> pRSF- <i>lgtA-galE</i> pET- <i>HpgalT</i> (源自 <i>Helicobacter pylori</i>)	乳糖、甘油	pH 6.8、28 °C、0.2 mmol/L IPTG、优化培养基	22.07(3 L)	[84]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	$\Delta lacZ\Delta wecB\Delta ugd\Delta gloA$ pAC- <i>M-US</i> pCD- <i>lgtA-lgtB</i> (源自 <i>N. meningitidis</i>)	乳糖、甘油	— ^② 、25 °C、0.4 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	13.25(3 L)	[85]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21 MG1655	$\Delta wcaJ\Delta lacZ\Delta P_{lacY}::P_{J23119}$ pTrec99a-PQS03- <i>lgtA</i> pCD- <i>luxR-</i> <i>P_{QS33}-luxI-CP</i> (源自 <i>S. agalactiae</i>)	乳糖、甘油	pH 6.8、30 °C、一、甘油优 化培养基	20.33(5 L)	[86]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) K-12 MG1655	$\Delta lacZ\Delta nagB\Delta ugd\Delta wecB$ gSk-ybaL:: <i>lgtA-SH3lig-</i> <i>HpGalT-PDZlig-PDZ-SH3 mscK-ybaM::lgtA-SH3lig-</i> <i>HpGalT-PDZlig-PDZ-SH3 Phr-dtpD::ParaBAD--dCpfI</i> $\Delta fliK::P_{J23119}-pfkA3-zwfP_{lac}::P_{mfc}$	乳糖、葡萄糖	pH 6.8、30 °C、0.2 mmol/L IPTG、0.5 mmol/L 阿拉伯 糖、葡萄糖优化培养基	23.73(3 L)	[87]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	$\Delta lacZ\Delta lacA\Delta wecB\Delta nagB\Delta ugd\Delta gcd\Delta setA$ pCD- <i>lgtA-M-</i> <i>U-S*</i> pET- <i>lacY-prs</i> pRSF- <i>lgtB-pgm-galE-galU</i>	乳糖、甘油	pH 7.2、25 °C、0.1 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	19.4(3 L)	[88]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21 star (DE3)	$\Delta lacZ\Delta ugd\Delta ushA\Delta agp\Delta wcaJ\Delta otsA\Delta wcaC\Delta galM::$ <i>galETK</i> $\Delta lacA::lgtA-galE$ $\Delta yjgX::lgtA$ $\Delta nagB::HpgalT$ $\Delta yjiv::HpgalT$ $\Delta ydeu::HpgalT$ $\Delta caiB::HpgalT$ $\Delta hlyE::$ <i>CmSET</i> $\Delta xylB::galE$ $\Delta P_{galU}::P_{T7}$ $\Delta P_{glmM}::P_{T7}$	乳糖、葡萄糖、 甘油	pH 6.8、29.5 °C、0.2 mmol/L IPTG、优化培养基	112.47(5 L)	[89]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	$\Delta lacZ\Delta ugd\Delta wecB\Delta setA$ pCD- <i>lgtA-AagalT</i> pET- <i>galE</i>	乳糖、甘油	pH 6.8、25 °C、一、甘油优 化培养基	15.53(5 L)	[90]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) BL21 (DE3)	$\Delta lacZ\Delta lacA\Delta nagB\Delta wecB$ $\Delta ugd\Delta gcd\Delta setA\Delta iclR$ pRSF- <i>lgtB-pgm-galU-galE-Galtpm1141</i> pET- <i>lgtA-M-U-S*</i> pCD- <i>prsA-pgi-glf</i>	葡萄糖	pH 7.0、25 °C、0.1 mmol/L IPTG、葡萄糖优化培养基	25.4(3 L)	[91]
枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) 168	$\Delta amyE::P_{43}-lacY$ $P_{43}-lgtB$ $P_{43}-lgtB$ $P_{43}-pgi$ $P_{43}-gtaB$ $P_{43}-glmS$ $P_{43}-glmM$ $P_{43}-$ <i>galE</i> $\Delta tuaD::lox72$	乳糖、葡萄糖	pH 7.0、37 °C、120 mmol/L 木糖、优化培养基	4.52(3 L)	[92]
枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>) 168	$P_{xyIA}-comK$ $\Delta amyE::P_{43}-lacY$ 3拷贝 $P_{43}-lgtB$, $P_{43}-pgi$ $P_{43}-$ <i>gtaB</i> $P_{43}-glmS$ $P_{43}-glmM$ $P_{43}-galE$ pP43NMK- <i>lgtA</i> $\Delta ganA::xylR-P_{xyIA}-dCas9$ $P_{veg}-sgRNA-pfkA7$ <i>pyk1</i> <i>zwf1</i> $P_{veg}-sgRNA-mnaA2$ $\Delta tuaD::lox72$ $P_{43}-lgtB$	乳糖、葡萄糖	pH 7.0、37 °C、120 mmol/L 木糖、优化培养基	5.41(3 L)	[93]
法夫驹形氏酵母 (<i>Komagataella phaffii</i>) 168	<i>HIS4::pGAP-hCas9-HIS4::pTEF1-ScRAD52-int11::pGAP-</i> <i>ScRAD59-Int20::pTEF1-ScMRE11</i> <i>int12::lgtA-lgtB-int21::lacI2-intE1::gal10</i> <i>intE9::pgm-intE26::gfa-intE20-ugp-intE24::gna-intE14::qri-</i> <i>intE13::pcm intE10::lgtA-linker3-lgtB pfk-a::X1 pfk-β::X2</i>	乳糖、葡萄糖、 甘油	pH 6.5、30 °C、一、BMGY 培养基	1.24(3 L)	[94]

① 括号内为发酵罐体积。

② “—”表示不详。

表7 微生物细胞法合成LNT

Table 7 Microbial cell factory for LNT synthesis

菌株	改造情况	底物	发酵条件	发酵罐产量/(g/L)	参考文献
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	$\Delta wecB\Delta nagB\Delta lacZ$ pCD-pfgalT-galE(源自 <i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i>)	乳糖、甘油	pH 6.8、28 °C、0.2 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	25.49(3 L) ^①	[100]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	$\Delta lacZ\Deltaugd$ pCD- <i>lgtA-wbgO</i> pET- <i>ETK</i> (源自 <i>E. coli</i> O55:H7)	乳糖、甘油	pH 6.8、25 °C、0.4 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	31.56(3 L)	[101]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	$\Delta wecB\Delta nagB\Delta lacZ\Delta recA::P_{lac}$ -galE、pET- <i>lgtA</i> 、pAC- <i>PfgalT</i> 、 pCD- <i>udk-pyrF</i>	乳糖、甘油	pH 6.8、25 °C、0.2 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	57.5(5 L)	[90]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) BL21(DE3)	菌株 A: $\Delta lacZ\Delta wecB\Delta nagB\Deltaugd \Delta recA::P_{lac}$ -galE 四拷贝: $\Delta IS186-1::P_{lac}$ - <i>lgtA</i> pET-wbgO 菌株 B:pET- <i>BbhI</i>	乳糖、甘油	pH 6.8、25 °C、0.2 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	30.13(5 L)	[102]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) BL21 star (DE3)	$\Delta lacZ\Delta wcaJ \Delta intQ::lgtA-galE \Delta caiB::wbdO$	乳糖、甘油	pH 6.8、29.5 °C、0.02 mmol/L IPTG、甘油优化培养基	109.8(5 L)	[103]
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) MG1655	$\Delta lacZ\Delta wcaJ\Deltaugd \Delta P_{lacY}::P_{J23119} P_{galE}::P_{lac}$ $\Delta arsB::lgtA \Delta nagB::lgtA \Delta poxB::lgtA \Delta ldhA::wbgO \Delta wecB::$ $wbgO \Delta manY::wbgO \Delta manZ::wbgO \Delta xylB::wbgO \Delta hlyE::mdfA$	乳糖、甘油	pH 6.8、25 °C、— ^② 、 甘油优化培养基	42.38(5 L)	[91]

①括号中为发酵罐体积。

②“—”表示不详。

合成LNT产量达57.5 g/L。相较于质粒系统，无质粒菌株在发酵过程中具有更高的遗传稳定性^[91]。Wang等^[103]通过INTEGRATE系统构建了LNT合成无质粒菌株，敲除*lacZ*和*wcaJ*后，LNT在摇瓶中产量达4.6 g/L，在5 L发酵罐中达109.8 g/L，为目前报道最高水平。为解决LNT合成过程中LNT II残留问题，Yang等^[102]开发了双阶段双菌发酵技术，在发酵后期将携带 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶基因*BbhI*的菌株加入到发酵体系中，实现了LNT II零残留发酵，为工业化生产提供新思路。细胞内区室化是生物体调控代谢反应和信号转导的重要空间组织^[104]。除了传统的膜结合细胞器（如线粒体和内质网），无膜区室（如应激颗粒和P小体）在动态调控菌体行为和代谢中也发挥着关键作用^[105-107]。受自然界区室化的启发，Wan等^[108]利用具有头尾聚合能力的结构域（DIX结构域和PB1结构域）构建支架蛋白，在大肠杆菌中将LNT合成路径酶与结构域融合，实现酶的共定位自组装形成人工无膜区室用于酶的空间定位和代谢通量调控，LNT摇瓶产量显著提升至2.25 g/L，比游离酶提高4.5倍。

2.4 微生物细胞法合成其他ncHMO

迄今，少有报道利用微生物细胞法合成其他

长链ncHMO的研究。乳糖-*N*-新己糖（lacto-*N*-neoheptaose, LNnH）是在乳糖的半乳糖上通过 β -1,3-和 β -1,6-糖苷键分别连接两个*N*-乙酰乳糖胺（Gal β 1,4GlcNAc）单元而形成。Li等^[109]以大肠杆菌SHuffle T7底盘细胞成功实现人源 β -1,6-*N*-乙酰葡萄糖氨基转移酶2（GCNT2）的可溶性表达，通过优化表达质粒、敲除竞争路径基因、提高关键酶可溶性表达以及优化发酵条件，LNnH在5 L发酵罐中产量达173.21 mg/mL，但检测到较多中间物质LNnT（168.35 mg/L）。

3 结论与展望

中性核心母乳寡糖是母乳中重要的功能性成分，其生物合成主要是酶法和微生物细胞法，两种方法各有优势，但也存在技术瓶颈。酶法合成在产物纯度方面具有独特优势：该方法具有高度的立体和区域选择性，能保证特定糖苷键的形成，副产物少，产物纯度高。微生物细胞工厂法在低成本、大规模生产方面潜力很大：该方法通过代谢工程改造底盘细胞，在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等底盘细胞中构建连续合成途径，能利用廉价碳源发酵合成，更易于实现规模化生产。目前，该方法在产量上具有明显优势，LNnT和LNT产量

均已达到每升百克级。 β -半乳糖苷酶和 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶已用于LNT II和LNnT的高效合成,但LNT的酶法合成转化率尚需提高,主要原因是缺乏高效合成LNT的 β -半乳糖苷酶。以LNT II为底物酶法合成LNnT和LNT时,由于LNT II价格高,往往通过分步酶法先利用廉价底物合成LNT II,再合成LNnT和LNT,这种分步合成策略增加了工艺的复杂性。大肠杆菌合成LNnT和LNT产量已分别达到了112.47 g/L和109.8 g/L,而LNT II产量相对较低(57.44 g/L),仍有较大的提升空间。不同微生物底盘系统的合成效率不同,大肠杆菌合成ncHMO已取得很大进展,枯草芽孢杆菌和酿酒酵母具有较高的安全性,但其合成ncHMO的效率仍远低于大肠杆菌。此外,大肠杆菌合成LNnT过程中,由于 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶对LNnT存在一定亲和力,导致更长链的HMO(*p*LNnH、*p*LNnO)等副产物产生,降低了LNnT的合成效率,增加了下游纯化难度。同时,发酵过程中的中间产物LNT II一旦排出到胞外便不会再进入胞内,影响了LNnT和LNT的合成效率。尽管利用大肠杆菌模式菌株(如K-12衍生菌株)生产ncHMO在技术上已趋于成熟,并获得了监管机构的批准,但其在发酵中存在的潜在风险仍不容忽视。其中,由噬菌体污染导致的发酵失败和由细菌裂解产生的内毒素污染是两大主要生物安全挑战。

基于生物合成ncHMO存在的问题,需构建从分子设计到发酵工艺的全链条优化体系,可以围绕以下几个方面进行突破:

①酶元件的理性设计与高通量挖掘。关键酶在中性核心母乳寡糖的生物合成中占据重要位置,酶分子的挖掘及分子改造大大提高了合成效率。针对关键酶(如 β -1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖基转移酶、 β -1,3-半乳糖基转移酶)活性低、底物专一性差的问题,可以利用蛋白质从头设计以及酶高通量筛选平台创制ncHMO合成专用酶,通过结构生物学解析与计算模拟,精准改造酶活性中心,降低对LNnT的亲和力;同时从天然微生物宏基因组或合成文库中挖掘高效酶,为ncHMO合成提供优质酶催化元件。

②底盘细胞的选择及优化。底盘细胞的选择

需兼顾底物利用效率与产物合成兼容性,因此首选能高效转运并利用甘油以及乳糖的底盘细胞,其次优选产物合成能力强的底盘细胞;在确定最适底盘的基础上,通过动态调控或模块化工程,平衡产物合成和细胞生长,解决生长与合成的失衡问题;另外需优化底盘细胞的转运系统:针对LNT II胞外泄漏以及LNnT胞内残留较多问题,利用转录组学鉴定其特异性转运体,在不影响乳糖转运以及细胞生长的情况下,提高LNT II胞内浓度以及LNnT的外排速度。

③发酵工艺优化。小试阶段通过响应面法或机器学习优化碳氮比、pH、溶氧、诱导剂浓度及诱导时机等参数,实现产物最大化合成;放大阶段,可以结合计算流体动力学模拟,解决规模化培养中的传质与剪切力问题。ncHMO的生物合成需以“酶-底盘细胞-发酵工艺”三位一体策略为核心,通过合成生物学与发酵工程的深度融合,突破限速步骤,有望实现ncHMO的高效、低成本生物制造。

④强化以安全菌株为核心的ncHMO合成体系。针对大肠杆菌内毒素问题,将生产宿主从大肠杆菌转向无内毒素且公认安全的酿酒酵母和芽孢杆菌将是一个重要突破点。要增强酶元件在上述底盘的可溶性表达水平和稳定性,还要优化底盘改造元件提高底盘细胞的改造效率。

⑤建立高效纯化与品控一体化的下游生产工艺体系。针对大肠杆菌存在的内毒素问题,需要在产品下游纯化过程中集中去除内毒素。首先可利用超滤去除发酵液中菌体、宿主细胞蛋白及大分子杂质(内毒素等),再经纳滤进行脱盐、浓缩,并选择性去除小分子杂质(如残留盐分、单糖),最后将纳滤截留的浓缩液进行干燥(如喷雾干燥或冷冻干燥),干燥后的样品需采用鲎试剂法测定内毒素含量使其严格控制在法规安全限值之内。

参 考 文 献

- [1] 史然,江正强. 2'-岩藻糖基乳糖的酶法合成研究进展和展望[J]. 合成生物学, 2020, 1(4): 481-494.
SHI R, JIANG Z Q. Enzymatic synthesis of 2'-fucosyllactose: advances and perspectives[J]. Synthetic Biology Journal, 2020,

- 1(4): 481-494.
- [2] SOUSA Y R F, MEDEIROS L B, PINTADO M M E, et al. Goat milk oligosaccharides: composition, analytical methods and bioactive and nutritional properties[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 92: 152-161.
- [3] URRUTIA-BACA V H, ÁLVAREZ-BUYLLA J R, GUEIMONDE M, et al. Comparative study of the oligosaccharide profile in goat, bovine, sheep, and human milk whey[J]. Food Chemistry, 2025, 463: 141123.
- [4] 马心悦, 黄纯翠, 赵耀, 等. 人乳寡糖的结构及其分离分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(12): 2869-2878.
- MA X Y, HUANG C C, ZHAO Y, et al. Structure and separation analysis of human milk oligosaccharides[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2023, 50(12): 2869-2878.
- [5] BENSIMON J, LU X N. Human milk oligosaccharides produced by synthetic biology[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2024, 18: 101361.
- [6] BODE L. Human milk oligosaccharides: next-generation functions and questions[J]. Nestle Nutrition Institute Workshop Series, 2019, 90: 191-201.
- [7] LI Y Y, DU G C, CHEN J, et al. Glycosyltransferases in human milk oligosaccharide synthesis: structural mechanisms and rational design[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2025, 93: 103315.
- [8] ZHU Y Y, YANG L H, ZHAO C H, et al. Microbial synthesis of lacto-*N*-fucopentaose I with high titer and purity by screening of specific glycosyltransferase and elimination of residual lacto-*N*-triose II and lacto-*N*-tetraose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(8): 4317-4324.
- [9] WANG L, ZHU Y Y, ZHAO C H, et al. Engineering *Escherichia coli* for highly efficient biosynthesis of lacto-*N*-difucohexaose II through *de novo* GDP-L-fucose pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(18): 10469-10476.
- [10] PEI C X, PENG X L, WU Y R, et al. Characterization and application of active human α 2,6-sialyltransferases ST6GalNAc V and ST6GalNAc VI recombined in *Escherichia coli*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2024, 177: 110426.
- [11] SUGITA T, SAMPEI S, KOKETSU K. Efficient production of lacto-*N*-fucopentaose III in engineered *Escherichia coli* using α 1,3-fucosyltransferase from *Parabacteroides goldsteini*[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 361: 110-118.
- [12] 孟佳炜, 朱莺莺, 罗国聪, 等. 乳糖-*N*-新四糖的生理功能、生物合成及其衍生化研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(3): 320-328.
- MENG J W, ZHU Y Y, LUO G C, et al. Recent advances on physiological function, biosynthesis, and derivatization of lacto-*N*-neotetraose[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(3): 320-328.
- [13] LI C C, LI M L, GAO W, et al. Biosynthesis of sialyllacto-*N*-tetraose c in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(46): 25836-25846.
- [14] SPRENGER G A, BAUMGÄRTNER F, ALBERMANN C. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 258: 79-91.
- [15] GALEOTTI F, COPPA G V, ZAMPINI L, et al. Capillary electrophoresis separation of human milk neutral and acidic oligosaccharides derivatized with 2-aminoacridone[J]. ELECTROPHORESIS, 2014, 35(6): 811-818.
- [16] TONON K M, MIRANDA A, ABRÃO A C F V, et al. Validation and application of a method for the simultaneous absolute quantification of 16 neutral and acidic human milk oligosaccharides by graphitized carbon liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 691-697.
- [17] BYCH K, MIKŠ M H, JOHANSON T, et al. Production of HMOs using microbial hosts: from cell engineering to large scale production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 130-137.
- [18] SCHENK S, BODE L, JENSEN S R, et al. Systemic availability of human milk oligosaccharides in infants and adults: a narrative review[J]. Advances in Nutrition, 2025, 16(9): 100488.
- [19] PALUR D S K, PRESSLEY S R, ATSUMI S. Microbial production of human milk oligosaccharides[J]. Molecules, 2023, 28(3): 1491.
- [20] GE H D, ZHU W X, ZHANG J, et al. Human milk microbiota and oligosaccharides in colostrum and mature milk: comparison and correlation[J]. Frontiers in Nutrition, 2024, 11: 1512700.
- [21] KONG C L, CHENG L H, KRENNING G, et al. Human milk oligosaccharides mediate the crosstalk between intestinal epithelial caco-2 cells and *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in an *in vitro* model with intestinal peristaltic shear force[J]. The Journal of Nutrition, 2020, 150(8): 2077-2088.
- [22] LIAO J Q, WANG M H, LI H Y, et al. Human milk oligosaccharide LNnT promotes intestinal epithelial growth and maturation during the early life of infant mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(11): 6678-6690.
- [23] LI M L, LU H, XUE Y L, et al. An *in vitro* colonic fermentation study of the effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota and short-chain fatty acid production in infants aged 0-6 months[J]. Foods, 2024, 13(6): 921.
- [24] CHEN Y L, LUO G X, SONG F B, et al. Truncated rotavirus VP4 proteins induce stronger protective immunity compared to

- P2-VP8 in animal models[J]. *Antiviral Research*, 2025, 238: 106156.
- [25] SUN X M, LI D D, QI J X, et al. Glycan binding specificity and mechanism of human and porcine P [6]/P [19] rotavirus VP8*s[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(14): e00538-18.
- [26] EL-HAWIET A, KITOVA E N, KLASSEN J S. Recognition of human milk oligosaccharides by bacterial exotoxins[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(8): 845-854.
- [27] 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]. *Journal of Immunology*, 2003, 171(11): 5837-5841.
- [28] IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ I, SIMON P M, ZOPF D, et al. Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176(3): 704-712.
- [29] OTTINO-GONZÁLEZ J, ADISE S, MACHLE C J, et al. Consumption of different combinations of human milk oligosaccharides in the first 6 months of infancy is positively associated with early cognition at 2 years of age in a longitudinal cohort of Latino children[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2024, 120(3): 593-601.
- [30] CHEETHAM N W H, DUBE V E. Preparation of lacto-*N*-neotetraose from human milk by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1983, 262: 426-430.
- [31] ALY M R E, IBRAHIM E I, EL ASHRY E H, et al. Synthesis of lacto-*N*-neotetraose and lacto-*N*-tetraose using the dimethylmaleoyl group as amino protective group[J]. *Carbohydrate Research*, 1999, 316(1-4): 121-132.
- [32] BANDARA M D, STINE K J, DEMCHENKO A V. The chemical synthesis of human milk oligosaccharides: lacto-*N*-neotetraose (Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc) [J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 483: 107743.
- [33] BANDARA M D, STINE K J, DEMCHENKO A V. The chemical synthesis of human milk oligosaccharides: lacto-*N*-tetraose (Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc) [J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 486: 107824.
- [34] 刘丹, 孙柳, 赵春华, 等. 母乳低聚糖 LNnT 和 LNT 的研究进展及法规市场情况概述[J]. *中国食品添加剂*, 2024, 35(8): 230-240.
- LIU D, SUN L, ZHAO C H, et al. Research progress and regulatory market overview of breast milk oligosaccharides LNnT and LNT[J]. *China Food Additives*, 2024, 35(8): 230-240.
- [35] EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), TURCK D, CASTENMILLER J, et al. Safety of lacto-*N*-neotetraose (LNnT) produced by derivative strains of *E. coli* BL21 as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal European Food Safety Authority*, 2020, 18 (11): e06305.
- [36] EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), TURCK D, BOHN T, et al. Safety of lacto-*N*-tetraose (LNT) produced by derivative strains of *Escherichia coli* BL21 (DE3) as a Novel Food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal*, 2022, 20(5): e07242.
- [37] 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]. *Chemical Communications*, 2015, 51(36): 7689-7692.
- [38] JENNINGS M P, HOOD D W, PEAK I R A, et al. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-*N*-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 18(4): 729-740.
- [39] PENG W J, PRANSKEVICH J, NYCHOLAT C, et al. *Helicobacter pylori* β1, 3-*N*-acetylglucosaminyltransferase for versatile synthesis of type 1 and type 2 poly-LacNAcs on *N*-linked, *O*-linked and I-antigen glycans[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(11): 1453-1464.
- [40] ZEUNER B, NYFFENEGGER C, MIKKELSEN J D, et al. Thermostable β-galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides[J]. *New Biotechnology*, 2016, 33(3): 355-360.
- [41] MATSUO I, KIM S, YAMAMOTO Y, et al. Cloning and overexpression of β-*N*-acetylglucosaminidase encoding gene *nagA* from *Aspergillus oryzae* and enzyme-catalyzed synthesis of human milk oligosaccharide[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(3): 646-650.
- [42] NYFFENEGGER C, NORDVANG R T, ZEUNER B, et al. Backbone structures in human milk oligosaccharides: transglycosylation by metagenomic β-*N*-acetylhexosaminidases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19): 7997-8009.
- [43] TEZE D, ZHAO J, WIEMANN M, et al. Rational enzyme design without structural knowledge: a sequence-based approach for efficient generation of transglycosylases[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2021, 27(40): 10323-10334.
- [44] CHEN X D, JIN L, JIANG X K, et al. Converting a β-*N*-acetylhexosaminidase into two trans-β-*N*-acetylhexosaminidases by domain-targeted mutagenesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(2): 661-673.
- [45] 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 Catalysis*, 2019, 9(6): 5503-5514.
- [46] LIU Y H, MA J W, SHI R, et al. Biochemical characterization of a β-*N*-acetylhexosaminidase from *Catenibacterium mitsuokai* suitable for the synthesis of lacto-*N*-triose II [J]. *Process*

- Biochemistry, 2021, 102: 360-368.
- [47] LI C Q, CAO Z N, JIANG H, et al. Characterization of a GH20 β -*N*-acetylhexosaminidase from *Flavobacterium algicola* suitable to synthesize lacto-*N*-triose II [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(9): 4849-4857.
- [48] LIU Y H, YAN Q J, MA J W, et al. Production of lacto-*N*-triose II and lacto-*N*-neotetraose from chitin by a novel β -*N*-acetylhexosaminidase expressed in *Pichia pastoris*[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(41): 15466-15474.
- [49] LIU Y H, YAN Q J, MA J W, et al. Directed evolution of a β -*N*-acetylhexosaminidase from *Haloferula* sp. for lacto-*N*-triose II and lacto-*N*-neotetraose synthesis from chitin[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 164: 110177.
- [50] JAMEK S B, MUSCHIOL J, HOLCK J, et al. Loop protein engineering for improved transglycosylation activity of a β -*N*-acetylhexosaminidase[J]. ChemBioChem, 2018, 19(17): 1858-1865.
- [51] CAO Z N, LI C Q, JIANG H, et al. Molecular modification of a GH84 β -*N*-acetylglucosaminidase from *Streptomyces violascens* for synthesis of lacto-*N*-triose II using whey powder and chitin-derived *N*-acetyl chitobiose[J]. Food Chemistry, 2025, 474: 143046.
- [52] 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 Chemistry, 2020, 332: 127438.
- [53] ABDUL MANAS N H, MD ILLIAS R, MAHADI N M. Strategy in manipulating transglycosylation activity of glycosyl hydrolase for oligosaccharide production[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 272-293.
- [54] WAKARCHUK W, MARTIN A, JENNINGS M P, et al. Functional relationships of the genetic locus encoding the glycosyltransferase enzymes involved in expression of the lacto-*N*-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(32): 19166-19173.
- [55] ZHU Y Y, LUO G C, LI Z Y, et al. Efficient biosynthesis of lacto-*N*-neotetraose by a novel β -1, 4-galactosyltransferase from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* NUM4039[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 153: 109912.
- [56] LUO G C, ZHU Y Y, MENG J W, et al. A novel β -1,4-galactosyltransferase from *Histophilus somni* enables efficient biosynthesis of lacto-*N*-neotetraose via both enzymatic and cell factory approaches[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(20): 5683-5690.
- [57] 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.
- [58] 王建宇, 向芷璇, 刘丹, 等. 芽孢杆菌截短 β -半乳糖苷酶的理性设计及在合成乳糖-*N*-新四糖中的应用[J]. 食品工业科技, 2025, 46(17): 232-239.
- WANG J Y, XIANG Z X, LIU D, et al. Rational design of a truncated β -galactosidase from *Bacillus* sp. and its application in the synthesis of lacto-*N*-neotetraose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(17): 232-239.
- [59] WANG J Y, XIANG Z X, LIU D, et al. Protein engineering of a novel β -galactosidase from *Thermus scotoductus* for efficient synthesis of lacto-*N*-neotetraose from chitin powder[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(16): 9289-9296.
- [60] LI J, WANG J Y, YAN Q J, et al. Biochemical characterization of a novel C-terminally truncated β -galactosidase from *Paenibacillus antarcticus* with high transglycosylation activity [J]. Journal of Dairy Science, 2024, 107(12): 10141-10152.
- [61] LUO G C, HUANG Z L, ZHU Y Y, et al. Crystal structure and structure-guided tunnel engineering in a bacterial β -1,4-galactosyltransferase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 279: 135374.
- [62] LAU K, THON V, YU H, et al. Highly efficient chemoenzymatic synthesis of β 1-4-linked galactosides with promiscuous bacterial β 1-4-galactosyltransferases[J]. Chemical Communications, 2010, 46(33): 6066-6068.
- [63] ZHANG Z Q, KONG H C, BAN X F, et al. C-terminal domains of β -galactosidase from *Paenibacillus macquariensis* modulate product distribution by altering substrate binding conformation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 310: 143412.
- [64] CHOI J Y, HONG H, SEO H, et al. High galactooligosaccharide production and a structural model for transgalactosylation of β -galactosidase II from *Bacillus circulans*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(47): 13806-13814.
- [65] HE X Y, LI Y, TAO Y H, et al. Discovering and efficiently promoting the extracellular secretory expression of *Thermobacillus* sp. ZCTH02-B1 sucrose phosphorylase in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 532-540.
- [66] LIU X W, XIA C F, LI L, et al. Characterization and synthetic application of a novel β 1,3-galactosyltransferase from *Escherichia coli* O55: H7[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(14): 4910-4915.
- [67] 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.
- [68] SCHMÖLZER K, WEINGARTEN M, BALDENIUS K, et al. Lacto-*N*-tetraose synthesis by wild-type and glycosynthase variants of the β -*N*-hexosaminidase from *Bifidobacterium*

- bifidum*[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2019, 17(23): 5661-5665.
- [69] CASTEJÓN-VILATERSANA M, FAIJES M, PLANAS A. Transglycosylation activity of engineered *Bifidobacterium lacto-N*-biosidase mutants at donor subsites for lacto-*N*-tetraose synthesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 3230.
- [70] VUILLEMIN M, HOLCK J, MATWIEJUK M, et al. Improvement of the transglycosylation efficiency of a lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum* by protein engineering [J]. Applied Sciences, 2021, 11(23): 11493.
- [71] MIYAZAKI T, SATO T, FURUKAWA K, et al. Enzymatic synthesis of lacto-*N*-difucohexaose I which binds to *Helicobacter pylori*[J]. Methods in enzymology, 2010, 480: 511-524.
- [72] LI T, LI J, YAN Q J, et al. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Lactocaseibacillus zeae* and its application in synthesis of lacto-*N*-tetraose[J]. Journal of Dairy Science, 2023, 106(10): 6623-6634.
- [73] WADA J, ANDO T, KIYOHARA M, et al. *Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 3996-4004.
- [74] FANG J L, TSAI T W, LIANG C Y, et al. Enzymatic synthesis of human milk fucosides α 1, 2-fucosyl para-lacto-*N*-hexaose and its isomeric derivatives[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2018, 360(17): 3213-3219.
- [75] VUILLEMIN M, LENGYEL M, MUSCHIOL J, et al. Enzymatic lacto-*N*-biose elongation of human milk oligosaccharides with the GH136 lacto-*N*-biosidase LnbX engineered for improved transglycosylation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2025, 189: 110660.
- [76] ZHU Y Y, WAN L, MENG J W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for lacto-*N*-triose II production with high productivity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3702-3711.
- [77] 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.
- [78] HU D D, WU H, ZHU Y Y, et al. Engineering *Escherichia coli* for highly efficient production of lacto-*N*-triose II from *N*-acetylglucosamine, the monomer of chitin[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 198.
- [79] 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.
- [80] HU M M, ZHANG T. Metabolic engineering of the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for lacto-*N*-triose II production [J]. Food Bioscience, 2024, 59: 103959.
- [81] LI J Z, HE T Y, ZHAO J J, et al. Combination of metabolic engineering and high-throughput screening to realize high-producing lacto-*N*-triose II in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(28): 17769-17775.
- [82] WANG Z J, ZHANG Z M, LI Y, et al. Two-step production method for lacto-*N*-triose II via cell-coupled biocatalytic strategy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(14): 8391-8400.
- [83] ZHANG P, ZHU Y Y, LI Z Y, et al. Designing a highly efficient biosynthetic route for lacto-*N*-neotetraose production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(32): 9961-9968.
- [84] LIAO Y X, WU J Y, LI Z K, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level production of lacto-*N*-neotetraose and lacto-*N*-tetraose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(30): 11555-11566.
- [85] HU M M, LI M L, LI C C, et al. High-level productivity of lacto-*N*-neotetraose in *Escherichia coli* by systematic metabolic engineering[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(9): 4051-4058.
- [86] TAO M T, YANG L H, ZHAO C H, et al. Implementation of a quorum-sensing system for highly efficient biosynthesis of lacto-*N*-neotetraose in engineered *Escherichia coli* MG1655 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(13): 7179-7186.
- [87] LIAO C, XU X H, HUANG H Y, et al. Construction of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for lacto-*N*-neotetraose biosynthesis[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2024, 4(3): 965-982.
- [88] ZHANG M W, ZHANG K, LIU T L, et al. High-level production of lacto-*N*-neotetraose in *Escherichia coli* by stepwise optimization of the biosynthetic pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(43): 16212-16220.
- [89] LIAO Y X, LAO C W, WU J Y, et al. High-yield synthesis of lacto-*N*-neotetraose from glycerol and glucose in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(10): 5325-5338.
- [90] LI Z Y, ZHU Y Y, ZHANG P, et al. Pathway optimization and uridine 5'-triphosphate regeneration for enhancing lacto-*N*-tetraose biosynthesis in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(25): 7727-7735.
- [91] QIAN Q Y, YANG L H, ZHAO C H, et al. Highly efficient production of lacto-*N*-tetraose in plasmid-free *Escherichia coli* through chromosomal integration of multicopy key glycosyltransferase genes[J]. International Journal of

- Biological Macromolecules, 2025, 284: 137987.
- [92] DONG X M, LI N, LIU Z M, et al. Modular pathway engineering of key precursor supply pathways for lacto-*N*-neotetraose production in *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 212.
- [93] 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(8): 2477-2484.
- [94] YANG J, MUND N K, YANG L R, et al. Engineering glycolytic pathway for improved lacto-*N*-neotetraose production in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2025, 184: 110576.
- [95] 刘丹, 梁山泉, 闫巧娟, 等. 基于模块优化强化大肠杆菌合成乳糖-*N*-新四糖的研究[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(2): 75-83.
- LIU D, LIANG S Q, YAN Q J, et al. Study on enhancement of lacto-*N*-neotetraose synthesis in *Escherichia coli* based on module optimization[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(2): 75-83.
- [96] LIU T L, ZHANG K, ZHANG M W, et al. *De novo* synthesis of lacto-*N*-neotetraose in *Escherichia coli* through metabolic engineering with glucose as the sole carbon source[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(22): 13736-13745.
- [97] TAO M T, YANG L H, ZHAO C H, et al. Rational modification of *Neisseria meningitidis* β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase for lacto-*N*-neotetraose synthesis with reduced long-chain derivatives[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 345: 122543.
- [98] LIU Y F, LIU L, LI J H, et al. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(5): 548-562.
- [99] LIU H, ZENG Q Q, ZHU C L, et al. High-throughput screening and directed evolution of β -1, 3-*N*-acetylglucosaminyltransferase for enhanced LNnT production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(13): 7966-7974.
- [100] 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.
- [101] HU M M, LI M L, MIAO M, et al. Engineering *Escherichia coli* for the high-titer biosynthesis of lacto-*N*-tetraose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(28): 8704-8712.
- [102] YANG L H, ZHU Y Y, ZHAO C H, et al. Elimination of residual lacto-*N*-triose II for lacto-*N*-tetraose biosynthesis in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(33): 12511-12518.
- [103] WANG J, LAO C W, WU J Y, et al. Multimodular metabolic engineering strategy enables high-efficiency synthesis of lacto-*N*-fucopentaose I in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(25): 15869-15879.
- [104] ABRAHAMSON C H, PALMERO B J, KENNEDY N W, et al. Theoretical and practical aspects of multienzyme organization and encapsulation[J]. Annual Review of Biophysics, 2023, 52: 553-572.
- [105] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2017, 18(5): 285-298.
- [106] LYON A S, PEEPLES W B, ROSEN M K. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021, 22(3): 215-235.
- [107] LAU Y H, GIESSEN T W, ALTENBURG W J, et al. Prokaryotic nanocompartments form synthetic organelles in a eukaryote[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1311.
- [108] WAN L, ZHU Y Y, KE J T, et al. Compartmentalization of pathway sequential enzymes into synthetic protein compartments for metabolic flux optimization in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2024, 85: 167-179.
- [109] LI Y S, LI Y, LI P F, et al. Whole-cell biosynthesis of branched human milk hexasaccharide lacto-*N*-neohexaose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(28): 17814-17823.



通讯作者: 江正强(1971—),男,教授,博士生导师。研究方向为酶工程等。
E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn



第一作者: 刘丹(1995—),女,博士研究生。研究方向为食品生物技术。
E-mail: liudan379@163.com