

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-047

母乳低聚糖生物合成研究进展

万李^{1,2}, 杨龙浩¹, 罗国聪¹, 朱莺莺¹, 沐万孟¹

(¹ 江南大学食品学院, 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122; ² 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 母乳低聚糖 (Human milk oligosaccharides, HMOs) 是母乳中的核心营养成分, 对于婴幼儿的生长发育具有无可替代的生理功效, 是新一代婴幼儿配发奶粉的核心原料。目前针对HMOs的研究主要集中在生理功能、临床应用以及生物合成技术开发等方面。鉴于HMOs广阔的市场需求, 高效生物合成HMOs逐渐成为研究热点。合成生物学技术的突破使微生物发酵法大规模生产HMOs成为可能, 显著提升了产业化进程的经济可行性。本文系统综述近年来HMOs的研究进展并展望了HMOs的发展趋势及挑战, 包括: (1) HMOs相关生理功能研究进展; (2) HMOs生物合成关键糖基转移酶研究进展; (3) 基于微生物细胞工厂的HMOs生物合成路径设计; (4) 用于改造HMOs合成底盘细胞的合成生物学策略。通过解析HMOs生物合成关键酶元件筛选、代谢途径通量平衡及底盘细胞代谢网络调控等核心科学问题, 为HMOs的高效生物制造提供理论依据与技术参考。

关键词: 母乳低聚糖; 糖基转移酶; 合成生物学; 代谢网络调控

中图分类号: 文献标志码:

Research progress on biosynthesis of human milk oligosaccharides

WAN Li^{1,2}, YANG Longhao¹, LUO Guocong¹, ZHU Yingying¹, MU Wanmeng¹

(¹ State Key Laboratory of Food Science and Resources, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Human milk oligosaccharides (HMOs), recognized as key bioactive constituents of human milk, play indispensable roles in infant growth and development through immunomodulation, gut microbiota regulation, and pathogen defense mechanisms. These multifaceted compounds have emerged as pivotal ingredients in next-generation infant formula formulations. Current investigations primarily concentrate on three domains: elucidation of biological functions, exploration of therapeutic applications, and optimization of biosynthesis platforms. The growing commercial demand for HMOs has driven significant advancements in enzymatic synthesis and metabolic engineering approaches to achieve cost-effective production at industrial scales. The rapid development of synthetic biology has revolutionized the production of HMOs, making large-scale microbial fermentation a viable and economically feasible strategy for

收稿日期: 2025-05-20 修回日期: 2025-07-21

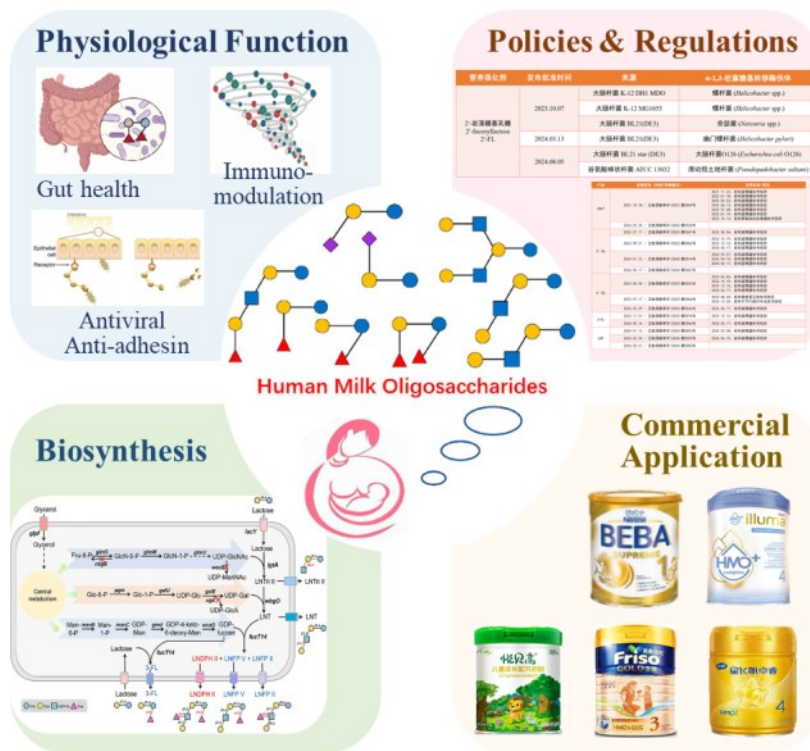
基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2104900); 国家自然科学基金 (32302010); 江苏省自然科学基金 (BK20231043)

引用本文: 万李, 杨龙浩, 罗国聪, 朱莺莺, 沐万孟. 母乳低聚糖生物合成研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-047

Citation: WAN Li, YANG Longhao, LUO Guocong, ZHU Yingying, MU Wanmeng. Research progress on biosynthesis of human milk oligosaccharides [J].

Synthetic Biology Journal, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-047

industrial applications. This paradigm shift has significantly accelerated the commercialization of HMOs, which are increasingly recognized for their critical roles in infant nutrition, gut microbiota modulation, and immune system development. In this comprehensive review, we systematically evaluate the latest research progress in HMOs, with particular emphasis on their biosynthesis, functional mechanisms, and biotechnological production, focusing on four key dimensions: (1) Physiological functions and mechanistic insights of HMOs—recent studies have elucidated the prebiotic, antimicrobial, and immunomodulatory properties of HMOs, highlighting their structural diversity and structure-function relationships. Advances in glycomics and microbiome research have deepened our understanding of how HMOs influence host-microbe interactions and metabolic pathways. (2) Discovery and engineering of glycosyltransferases for HMOs biosynthesis—glycosyltransferases (GTs) play a pivotal role in determining the structural diversity of HMOs. We review the latest strategies for enzyme mining, characterization, and protein engineering, including directed evolution and computational design, to enhance catalytic efficiency and substrate specificity. (3) Metabolic pathway design and optimization in microbial cell factories – the construction of efficient microbial chassis for HMOs production requires systematic pathway engineering. Key considerations include precursor supply, cofactor balancing, and the elimination of metabolic bottlenecks. We discuss recent advances in dynamic pathway regulation and modular assembly techniques to improve yield and purity. (4) Synthetic biology strategies for chassis cell development – the optimization of host strains involves genome-scale metabolic modeling, CRISPR-based genome editing, and adaptive laboratory evolution. Additionally, novel approaches such as cell-free biosynthesis and consortia-based fermentation are emerging as promising alternatives for complex HMOs synthesis. Furthermore, we discuss emerging challenges and future directions in this field.



Keywords: human milk oligosaccharides; glycosyltransferases; synthetic biology; metabolic network regulation

母乳低聚糖 (Human milk oligosaccharides, HMOs) 是一种天然存在于母乳中的重要成分, 含量约为 5-15 g/L, 仅次于乳糖和脂肪, 是母乳中第三大营养成分。近年来, HMOs 因其在促进婴幼儿健康方面的多重生物学功能引发学界广泛关注。除了作为天然益生元调控肠道菌群外, 研究证实 HMOs 具有抗菌抗病毒活性、免疫调节功能以及促进神经发育等独特生理功能。当前 HMOs 研究领域快速发展, 主要集中于以下几个方向: (1) 不同地域母乳中 HMOs 的组成特征的解析, 包括总含量、优势组分及其影响因素; (2) HMOs 的临床功效评价及生理功能机制研究; (3) HMOs 的生物合成技术开发及工业化生产。这三个研究方向紧密联系, 通过基础研究支撑临床转化、临床需求推动合成技术发展、工业化生产促进应用推广, 形成具有协同效应的良性循环体系。

HMOs 可划分为三大类: 中性核心型 (如乳糖-N-四糖 LNT、乳糖-N-新四糖 LNnT)、岩藻糖基化型 (如 2'-岩藻糖基乳糖 2'-FL、3-岩藻糖基乳糖 3-FL 及二岩藻糖基乳糖 DFL) 以及唾液酸化型 (如 3'-唾液酸乳糖 3'-SL 和 6'-唾液酸乳糖 6'-SL) (图1)。此外, 复杂 HMOs 的合成通常以中性核心型为骨架结构, 通过 $\alpha 1,2$ -、 $\alpha 1,3$ -或 $\alpha 1,4$ -糖苷键

进行岩藻糖基化修饰, 或借助 $\alpha 2,3$ -、 $\alpha 2,6$ -糖苷键完成唾液酸化延伸^[1-2]。上述典型 HMOs 多数已通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 公认安全物质 (GRAS) 认证, 并实现商业化添加于婴幼儿配方奶粉中。其中, 2'-FL 和 LNnT 于 2023 年 10 月被国家卫健委批准为食品营养强化剂新品种, 这是中国首次批准的利用微生物发酵合成的两款 HMOs 产品。另外, 国家卫健委相继受理了 3'-SL、6'-SL、3-FL 和 LNT 作为食品营养强化剂新品种的申请。当前, HMOs 已广泛应用于婴儿配方奶粉, 例如惠氏 Illuma 系列、雀巢 BEBA 和雅培 Similac 等 (图1)。

合成生物学技术的突破使微生物发酵法大规模生产 HMOs 成为可能, 显著提升了产业化进程的经济可行性。本文系统综述近年来 HMOs 的研究进展, 包括: (1) HMOs 相关生理功能研究进展; (2) HMOs 生物合成关键糖基转移酶研究进展; (3) 基于微生物细胞工厂的 HMOs 生物合成路径设计; (4) 用于改造 HMOs 合成底盘细胞的合成生物学策略。通过解析 HMOs 生物合成关键酶元件筛选、代谢途径通量平衡及底盘细胞代谢网络调控等核心科学问题, 为 HMOs 的高效生物制造提供理论依据与技术参考。

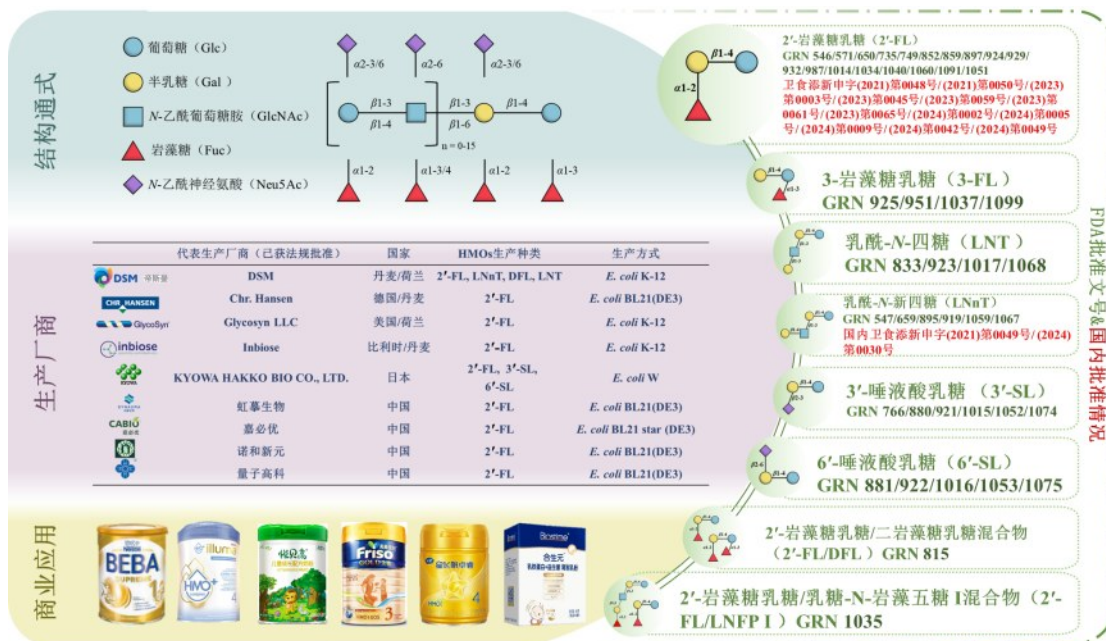


图1 母乳低聚糖的基本情况概览

Fig. 1 Overview of the basic situation of human milk oligosaccharides

1 HMOs 生理功能

HMOs 在新生儿生长发育及免疫调节过程中发挥着不可替代的生物学作用, 包括促进肠道益生菌定殖、介导免疫应答调控、抑制病原微生物黏附、调节上皮细胞功能以及参与神经发育等关键生理过程^[3-5]。HMOs 最初被认为是母乳中重要的“双歧因子 (bifidus factor)”, 其益生元特性表现为选择性促进特定有益菌群 (尤其是双歧杆菌属) 的增殖及代谢活动^[6]。研究表明, 双歧杆菌代谢 HMOs 这类复杂碳水化合物化合物的能力存在显著种属差异性。如长双歧杆菌婴儿亚种 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) 因具备完整的糖苷水解酶系统, 可有效分解多数 HMOs^[7]; 而长双歧杆菌长亚种 (*B. longum* subsp. *longum*) 和短双歧杆菌 (*B. breve*) 受限于其糖苷水解酶系统的特异性, 仅能利用 LNT、LNnT 等短链寡糖^[8-9]。代谢过程产生的短链脂肪酸 (SCFAs) 不仅是肠道屏障的重要营养底物, 更在免疫稳态维持中发挥关键调控作用。除益生元作用以外, 有研究证明 HMOs 具有病原体拮抗功能: 通过竞争性结合机制抑制胃肠道致病菌 (如致肠病性大肠杆菌和假单胞菌属) 及病毒的黏附侵袭。其分子机制可能涉及两方面: (1) 通过模拟宿主细胞表面糖缀合物结构, 形成分子“诱饵”阻断病原体识别位点; (2) 通过上调 γ -干扰素及 IL-10 等免疫调节因子的表达, 降低病毒毒力^[10]。

不同结构 HMOs 通过差异化信号通路发挥生物学效应。Wu 等通过肠上皮转录组学分析发现: 在预防坏死性小肠结肠炎 (NEC) 方面, 2'-FL、3-FL 等 5 种代表性 HMOs 虽均具有保护作用, 但分别通过不同信号通路实现肠道屏障修复与炎症调控^[11-12]。HMOs 还可通过促进肠上皮糖萼发育、调控微生物群组成及 SCFAs 水平等途径增强肠道屏障功能并干预食物过敏等免疫相关疾病^[13-14]。此外, 研究报道 HMOs 在诱导 *B. infantis* 成人植入的过程中是必要且充分的, HMOs 的剂量会影响植入的比例, 当 HMOs 停止补充时, *B. infantis* 的水平会迅速下降^[15]。进一步研究表明, 由 HMOs 和 *B. infantis* 组成的合生元可以安全、可预测地控制成人肠道微生物群, 从而精确调节成人肠道微生物

群^[16]。这一发现不仅拓展了 HMOs 的应用场景, 更为肠道菌群靶向治疗提供了新的干预策略。从基础研究到临床应用, HMOs 作为母乳中独特的生物活性成分, 其多靶点、多层次的生理调控机制已得到充分阐释, 不仅为新生儿肠道菌群定殖和免疫成熟提供关键支持, 其与双歧杆菌的协同作用展现出精准调控肠道微生态的潜在价值。

2 参与母乳低聚糖合成的典型糖基转移酶

2.1 典型糖基转移酶分类

HMOs 的合成主要依赖于四种糖基转移酶 (Glycosyltransferases, GTs), 包括 β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶 (GlcNAcTs) 和 β -半乳糖基转移酶 (GalTs) 用于合成中性核心 HMOs, 而 α -岩藻糖基转移酶 (FucTs) 和 α -唾液酸转移酶 (SiaTs) 则分别参与岩藻糖基化和唾液酸化 HMOs 的合成。GlcNAcTs 在 HMOs 合成中可形成不同的糖苷键, 例如细菌 LgtA^[17] 和人源 GCNT2^[18] 可催化尿苷 5'-二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺 (UDP-GlcNAc) 中的 GlcNAc 转移至乳糖或 LacNAc 的 Gal 残基, 分别生成 β 1,3-和 β 1,6-糖苷键型。GalTs 则包括 β 1,3-和 β 1,4-GalT, 能够将 UDP-半乳糖 (UDP-Gal) 的半乳糖基转移至乳糖-N-三糖 II (LNTri II) 的 GlcNAc 残基, 分别生成 I 型四糖 LNT 和 II 型四糖 LNnT^[19]。FucTs 以鸟苷 5'-二磷酸-岩藻糖 (GDP-Fuc) 为供体催化岩藻糖基化, 其中 α 1,2-FucT 特异性作用于 Gal 残基, 而 α 1,3-和 α 1,3/4-FucT 则作用于 GlcNAc 和 Glc 残基^[20]。SiaTs 则以胞苷 5'-单磷酸-N-乙酰神经氨酸 (CMP-Neu5Ac) 为供体催化唾液酸化, α 2,3-和 α 2,6-SiaT 分别生成相应的 α 2,3-和 α 2,6-糖苷键型^[21]。

2.2 晶体结构解析

大多数参与 HMOs 生物合成的糖基转移酶难以纯化^[22], 目前仅获得少数截短改造后的晶体结构。研究发现, α 1,3-FucT 和 α 2,3/6-SiaT 均采用 GT-B 折叠构象, 其 N 端与 C 端形成的空腔可同时

结合糖基供体和受体。当供体结合时，蛋白质构象会从开放态转变为闭合态，并重塑底物结合口袋^[23]。最近解析的 $\beta 1,4$ -GalT^[19]则呈现GT-A折叠特征，这些结构为酶工程改造提供了重要依据。

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 来源的 $\alpha 1,3$ -FucT (FutA) 的结构研究揭示了其催化机制^[24]: FutA 呈现典型的罗斯曼折叠 $\alpha/\beta/\alpha$ 拓扑结构，分为N端和C端两个区域，催化口袋位于两者结合处。C端区域结合供体GDP-Fuc，与10个残基形成氢键网络，其中Arg195、Lys250和Glu249在催化中起关键作用，Glu95作为催化残基参与质子转移。受体GlcNAc结合在N端口袋，通过Glu95的亲核攻击完成转糖基反应(图2a)。来源于*Pasteurella multocida*的 $\alpha 2,3$ -唾液酸转移酶PmST1是首个被解析的GT-B型唾液酸转移酶。其N端截短24个氨基酸的突变体($\Delta 24$ PmST1)^[25]结构研究表明，Trp270作为门控残基，在CMP激活的糖核苷酸供体结合后发生构象翻转，参与受体糖的结合。另一来源于多杀性巴氏杆菌的 $\alpha 2,3$ -SiaT^[26] PM0188具有相似的催化残基(图2b)，其与CMP和乳糖的复合物结构显示，酶呈现典型的 $\alpha/\beta/\alpha$ 罗斯曼折叠构象，分为N端和C端两个结构域。供体CMP-Neu5Ac结合在C端区域，而受体乳糖结合在N端区域。催化过程中，Asp141作为质子碱，促使半

乳糖基C3-OH去质子化，进而攻击供体CMP-Neu5Ac的异头碳C2，完成转糖基反应。*Photobacterium* sp. J-ISH-224来源的 $\alpha 2,6$ -SiaT ($\Delta 16$ psp26ST) 呈现独特的三个结构域^[27]: 结构域1为免疫球蛋白样 β 夹心，结构域2-3构成GT-B折叠。CMP和乳糖结合在结构域2-3的裂隙中，其中D232(催化碱)与半乳糖O6形成氢键，H405与CMP磷酸基相互作用，共同介导置换机制(图2c)。*Actinobacillus actinomycetemcomitans*来源的 $\beta 1,4$ -GalT (Aa $\beta 4$ GalT) 采用GT-A折叠^[19]，二聚体界面包含9个 β 链和10个 α 螺旋。其Rossmann折叠模体对UDP-Gal结合至关重要。基于结构指导的隧道工程获优势突变体L5，催化效率较野生型提高50倍，证实了半理性设计在优化GTs性能中的价值(图2d)。这些GTs均需要糖核苷酸作为供体，且对不同受体表现出偏好性。例如，Te2FT优先作用于1型低聚糖，而*H. pylori*来源的FucTIII (Hp-FucIII) 对2型LacNAc的催化效率比1型LNB高39倍。部分GTs还具有多功能性，如Bf13FT和Hp-FucIII可催化多种HMOs的岩藻糖基化，而多杀性光杆菌SiaT甚至具备六种酶活性，包括唾液酸转移、水解和反式唾液酸化等。因此，在HMOs合成路径设计中，选择合适的GTs对提高效率 and 产物特异性至关重要。

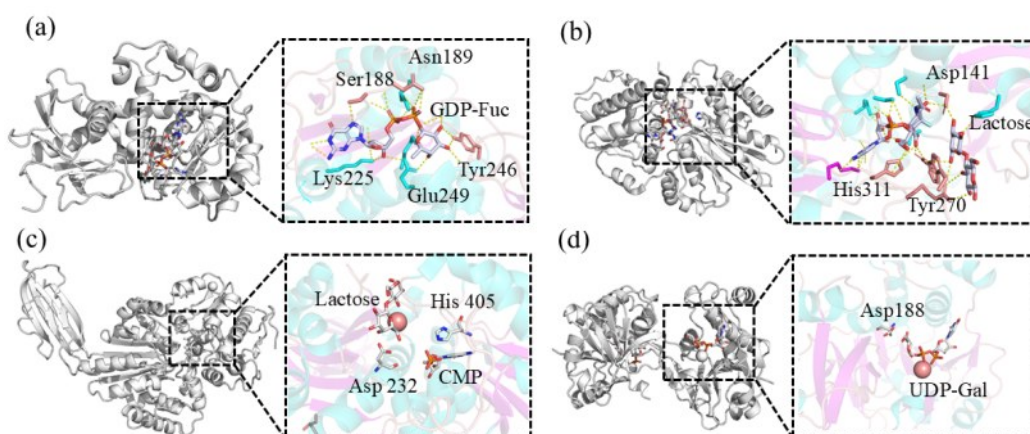


图2 合成母乳低聚糖的糖基转移酶晶体结构

(a) $\alpha 1,3$ -FucT (FutA) 整体结构，FutA 与 GDP-Fuc 结合位点构象；(b) $\alpha 2,3$ -SiaT (PM0188) 整体结构，PM0188 与 CMP 和乳糖的复合物结构；(c) $\alpha 2,6$ -SiaT ($\Delta 16$ psp26ST) 整体结构， $\Delta 16$ psp26ST 与 CMP，乳糖结合位点；(d) $\beta 1,4$ -GalT 整体结构 (Aa $\beta 4$ GalT)，Aa $\beta 4$ GalT 与 UDP-Gal 结合位点构象

Fig. 2 Glycosyltransferase crystal structure for the synthesis of human milk oligosaccharides

(a) Structure of $\alpha 1,3$ -FucT (FutA), Conformation of FutA and GDP-Fuc binding sites; (b) Structure of $\alpha 2,3$ -SiaT (PM0188), Complex structure of PM0188 with CMP and lactose; (c) Structure of $\alpha 2,6$ -SiaT ($\Delta 16$ psp26ST), $\Delta 16$ psp26ST and CMP, lactose binding site; (d) Structure of $\beta 1,4$ -GalT (Aa $\beta 4$ GalT), Conformation of the binding site of Aa $\beta 4$ GalT and UDP-Gal

3 HMOs的生物合成

3.1 糖核苷酸的体外级联合成系统

由于糖核苷酸成本较高，研究人员开发了基于单糖和核苷酸的酶级联合成系统。例如，*B. longum* 来源的 *N*-乙酰己糖胺-1-激酶 (Nahk) 和 *P. multocida* 来源的 GlcNAc-1-磷酸尿苷转移酶 (GlmU) 可组成“一锅酶 (one-pot multienzyme, OPME)”模块，在 ATP 和 UTP 存在下催化 GlcNAc 转化为 UDP-GlcNAc^[28]。类似地，*Streptococcus pneumoniae* 来源的半乳糖激酶 (GalK) 和 *B. longum* 来源的 UDP-糖焦磷酸化酶 (USP) 可合成 UDP-Gal，而双功能酶岩藻糖激酶/GDP-Fuc 磷酸化酶 (Fkp) 则能将 Fuc 逐步转化为 GDP-Fuc^[29]。此外，CMP-Neu5Ac 可通过 CMP-Neu5Ac 合成酶 (CSS) 和 Neu5Ac 合酶 (SiaC) 的级联反应从 ManNAc 合成^[30]。上述 OPME 模块已成功应用于 HMOs 的高效合成。例如，含 Hp2FucT 和 GDP-Fuc 模块的系统可高效生产 2'-FL^[29]，而 CMP-Neu5Ac 模块与 PmST1 或 Pd2, 6ST 联用可分别合成 3'-SL 和 6'-SL^[31]。中性核心 HMOs (如 LNT 和 LNNt) 的合成通常需要两步糖基化：首先由 LgtA 和 UDP-GlcNAc 模块将乳糖转化为 LNTri

II，再通过 β 1, 3-或 β 1, 4-GalT 与 UDP-Gal 模块进一步延伸为 LNT 或 LNNt^[32]。类似策略还可用于合成更长链的 HMOs，并最终通过 FucT 和 SiaT 修饰获得多样化的岩藻糖基化和唾液酸化 HMOs。Tsai 等人利用 *H. pylori* DSM 6709 来源的 α 1, 3/4-fucosyltransferase FucTIII 以 Lac 和 GlcNAc 为原始底物合成了一系列岩藻糖基化的 HMOs，其中包括乳糖-*N*-岩藻糖基五糖 I (LNFP I) 和乳糖-*N*-岩藻糖基五糖 V (LNFP V)^[33]。

3.2 糖核苷酸的体内生物合成

HMOs 生物合成过程高度依赖于四种关键糖苷供体的协同作用，包括 UDP-GlcNAc、UDP-Gal、GDP-Fuc 和 CMP-Neu5Ac。这些糖苷供体在酶催化过程中提供糖基单元，促进糖链的延伸和分支 (图 3)。基于这些糖苷供体的合成机制，通过基因工程手段 (如分支途径基因敲除或关键酶基因过表达) 来优化代谢通量分配，已成为提高 HMOs 合成效率的重要策略。HMOs 的体内代谢合成通常涉及胞内多个糖核苷酸的有效供给，如乳糖-*N*-岩藻糖基五糖和乳糖-*N*-二岩藻糖基六糖的细胞工厂从头合成涉及 UDP-GlcNAc、UDP-Gal 和 GDP-Fuc 三中糖核苷酸，唾液酸乳糖-*N*-四糖的生物合成则

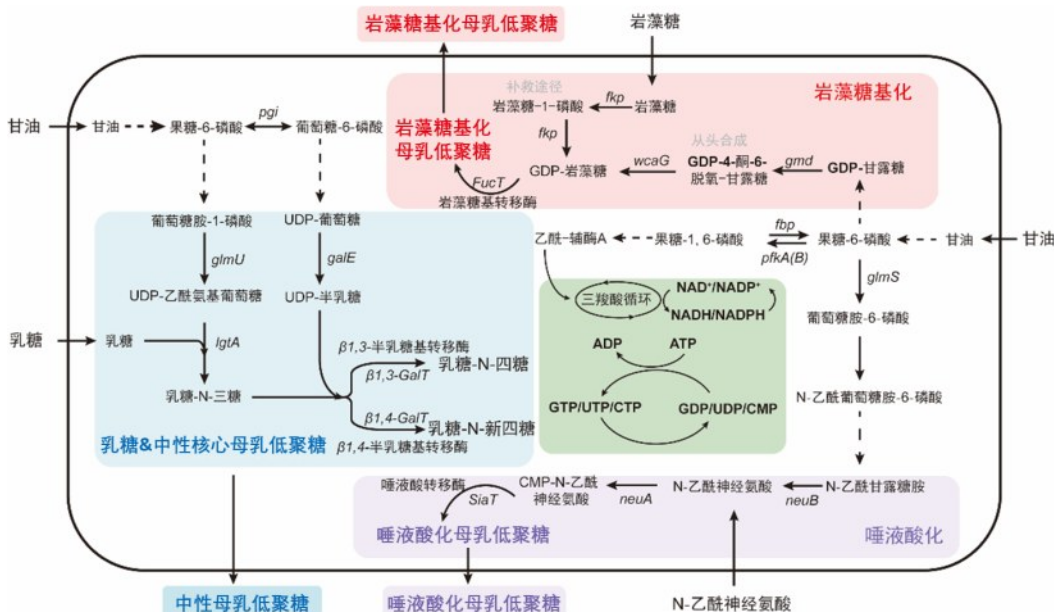


图3 微生物细胞工厂合成HMOs通路图

Fig. 3 Pathway diagram of biosynthesis of HMOs via microbial cell factories

涉及UDP-GlcNAc、UDP-Gal和CMP-Neu5Ac三中糖核苷酸。如何精准调控代谢网络,实现糖核苷酸前体的平衡供给是提升相关HMOs生物合成效率的关键。相较于的体外级联合成,糖核苷酸的胞内生物合成具有显著优势:(1)通过廉价可再生碳源从头合成降低了生产成本;(2)细胞内天然存在辅因子(ATP/NADPH)循环再生通路,降低辅因子依赖。然而,糖核苷酸的胞内合成仍然存在局限,如内源代谢通路对相关糖核苷酸的分流,如UDP-Glc等糖核苷酸会流向糖原合成。此外,内源通路合成的糖核苷酸通量通常较低,难以满足下游HMOs的高效生物转化,通常需要针对特定的内源代谢通路做进一步基因编辑和迭代改造。

在UDP-Gal和UDP-GlcNAc供体优化方面,Liao等人系统研究了与UDP-Gal合成途径相关的*pgi*、*pgm*、*galE*和*galU*基因,以及与UDP-GlcNAc合成途径相关的*glmS*、*glmM*和*glmU*基因的强化表达效果。实验结果表明,过表达*galU*、*galE*和*glmM*基因可分别使LNnT产量提高24%、27.25%和18.22%,充分证实了糖苷供体强化对HMOs生物合成的促进作用^[34]。CMP-Neu5Ac由UDP-GlcNAc经UDP-*N*-乙酰葡萄糖胺-2-差向异构酶(NeuC)、*N*-乙酰神经氨酸合成酶(NeuB)和CMP-唾液酸合成酶(NeuA)的级联催化反应生成。Yue等研究者通过靶向敲除竞争途径基因(包括Neu5Ac代谢相关的*nanATEK*基因簇和*N*-乙酰氨基葡萄糖代谢相关的*nagAB*基因)优化代谢网络,同时采用质粒过表达CMP-Neu5Ac合成途径关键基因*neuB*和*neuC*。经72小时摇瓶发酵后,6'-SL产量达到0.98 g/L,显著提高了唾液酸化HMOs的生产效率^[35]。GDP-Fuc的合成存在两条路径:从头合成途径需要甘露糖-6-磷酸异构酶(*ManA*)、磷酸甘露糖变位酶(*ManB*)、甘露糖-1-磷酸鸟苷酰转移酶(*ManC*)、鸟苷二磷酸-甘露糖-4,6-脱水酶(*Gmd*)和鸟苷二磷酸-岩藻糖合酶(*WcaG*)五种酶的参与,补救途径则以岩藻糖为底物,经Fkp的两步催化后直接合成GDP-Fuc。Zhu等人通过删除UDP-葡萄糖脂质载体转移酶编码基因*wcaJ*阻断GDP-Fuc向可拉酸的转化,同时采用强组成型启动子P_{J23119}替换GDP-Fuc合成途径中*manC-manB*和*gmd-wcaG*基因簇的原始启动子以增强供体供应,

最终使2'-FL产量提高了66.6%^[36]。总之,通过基因工程技术强化糖苷供体合成途径或阻断竞争性分支途径,是提高HMOs生物合成效率的有效策略。

4 合成生物学策略用于HMOs的合成

随着合成生物学与代谢工程技术的快速发展,基于微生物细胞工厂的HMOs生物合成策略已取得突破性进展。该技术路径的核心在于改造微生物底盘细胞实现以下关键要素的系统性调控:受体底物(如乳糖)的稳定吸收、糖核苷酸供体(如UDP-Gal、CMP-Neu5Ac)的有效供给、异源糖基转移酶的胞内活性表达、终产物的跨膜转运等。与传统化学合成法以及酶法合成相比,微生物细胞工厂在HMOs生产中展现出显著优势:第一,以可再生碳源(如甘油、葡萄糖等)为原料,符合绿色生物制造理念且生产成本较低;第二,通过模块化代谢工程策略实现产物结构的精准调控;第三,具备规模化发酵的工艺兼容性,发酵产量可达数十至上百克级/升水平。该技术已成功应用于多种核心HMOs的高效生物合成乃至工业化生产,并逐步成为行业主导技术路线(表1)。目前,2'-FL和LNnT的产量在发酵罐水平已超过100 g/L^[34, 37],3-FL、DFL、LNT和3'-SL产量已超过50 g/L^[38-40, 41]。6'-SL、LNFP I和LNFP V产量超过25 g/L^[42-44]。此外,多种高阶的岩藻糖基化和唾液酸化的HMOs的生物合成底盘细胞也被开发并具备不错的生产能力,包括乳酰-*N*-二岩藻糖基六糖II(LNDFH II)、唾液酸乳酰-*N*-四糖a(LST a)和唾液酸乳酰-*N*-四糖c(LST c)(表1)^[45-47, 36]。

4.1 HMOs合成相关糖基转移酶的定向筛选

在HMOs的生物合成中,四种糖核苷酸依赖性GTs发挥着核心催化作用,包括GlcNAcTs、GalTs、FucTs和SiaTs。这些酶能够分别识别UDP-GlcNAc、UDP-Gal、GDP-Fuc和CMP-Neu5Ac糖苷供体,并催化形成特定的糖苷键,从而形成HMOs的多样化结构。通过将这些糖基转移酶整合至代谢工程改造的微生物细胞工厂中,可构建

表1 微生物细胞工厂生物合成HMOs主要案例

Table 1 The main cases of microbial cell factories for HMOs biosynthesis

宿主菌株	基因修饰	关键基因(来源)	产物及产量(g/L)	参考文献
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>wcaJ</i> 和 <i>pgi</i> ; 整合三拷贝 <i>lacY</i> 基因; 质粒过表达基因 <i>setA</i> , <i>rcsA</i> , <i>rcsB</i> , <i>NsfutC</i> , <i>manC</i> , <i>manB</i> , <i>gmd</i> 和 <i>wcaG</i>	<i>NsfutC</i> (<i>Neisseria</i> sp.)	2'-FL , 26.17 g/L (摇瓶); 141.27 g/L (5 L 发酵罐)	[37]
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	删除基因 <i>fucI</i> , <i>fucK</i> , <i>lacZ</i> , <i>wcaJ</i> , <i>lon</i> 和 <i>lacA</i> ; 整合基因 <i>manC</i> , <i>manB</i> , <i>gmd</i> , <i>wcaG</i> , <i>futM2</i> , <i>dtpA</i> 和 <i>glpF</i>	<i>futM2</i> (<i>Bacteroides gallinaceum</i>)	3-FL , 11.26 g/L (摇瓶); 60.24 g/L (5 L 发酵罐)	[38]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> 和 <i>wcaJ</i> ; <i>manA</i> , <i>manC</i> - <i>manB</i> 和 <i>gmd</i> - <i>wcaG</i> 的启动子强化; 整合基因 <i>SAMT</i> (两拷贝), <i>fut3Bc</i> 和 <i>RcsAB</i> ; 质粒过表达基因 <i>SAMT</i> 和 <i>fut3Bc</i>	<i>SAMT</i> (<i>Azospirillum lipoferum</i>); <i>fut3Bc</i> (<i>Neobacillus cucumis</i>)	DFL , 8.34 g/L (摇瓶); 53.15 g/L (5 L 发酵罐)	[39]
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>nanAKET</i> , <i>nagB</i> , <i>pfkB</i> 和 <i>pfkA</i> ; 整合基因 <i>neuBCA</i> (两拷贝), <i>nST</i> , <i>glmM</i> , <i>glmS*</i> , <i>cmk</i> , <i>lacY</i> 和 <i>scrY</i>	<i>nST</i> (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	3'-SL , 8.12 g/L (摇瓶); 56.8 g/L (5 L 发酵罐)	[40]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>wecB</i> , <i>nagB</i> 和 <i>ugd</i> ; 整合基因 <i>galE</i> ; 质粒过表达基因 <i>lgtA</i> , <i>Pf</i> , <i>galE</i> , <i>udK</i> 和 <i>pyrF</i>	<i>lgtA</i> (<i>N. meningitidis</i>); <i>Pf</i> (<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i>)	LNT , 6.16 g/L (摇瓶); 57.5 g/L (5 L 发酵罐)	[41]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>nanA</i> , <i>pfkA</i> , <i>nanK</i> 和 <i>manA</i> ; 质粒过表达基因 <i>neuBCA</i> , <i>glnA</i> , <i>plst6*</i> , <i>pyrG</i> , <i>ndk</i> 和 <i>cmk</i>	<i>plst6*</i> (<i>Photobacterium leiognathi</i> JT-SHIZ-119)	6'-SL , 3.85 g/L (摇瓶); 25.31 g/L (3 L 发酵罐)	[42]
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>ugd</i> , <i>ushA</i> , <i>agp</i> , <i>wcaJ</i> , <i>otsA</i> , <i>wcaC</i> , <i>lacA</i> 和 <i>nagB</i> ; 整合基因 <i>galETKM</i> , <i>lgtA</i> , <i>galE</i> , <i>hpgalT</i> (四拷贝), <i>lgtA</i> , <i>galE</i> 和 <i>CmSET</i> ; 基因 <i>galU</i> 和 <i>glmM</i> 的启动子强化	<i>lgtA</i> (<i>N. meningitidis</i>); <i>hpgalT</i> (<i>H. pylori</i>)	LNT , 112.47 g/L (5 L 发酵罐); 107.4 g/L (1000 L 发酵罐)	[34]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>wecB</i> , <i>nagB</i> 和 <i>ugd</i> ; 整合基因 <i>galE</i> , <i>lgtA</i> (四拷贝) 和 <i>wbgO</i> (三拷贝); 质粒过表达基因 <i>manC</i> , <i>manB</i> , <i>gmd</i> , <i>wcaG</i> , <i>wbgO</i> 和 <i>thspR2FT</i>	<i>lgtA</i> (<i>N. meningitidis</i>); <i>wbgO</i> (<i>E. coli</i> O55:H7); <i>thspR2FT</i> (<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. RBITD)	LNFP I , 4.42 g/L (摇瓶); 35.1 g/L (5 L 发酵罐)	[43]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>wecB</i> , <i>nagB</i> 和 <i>ugd</i> ; 整合基因 <i>galE</i> ; 质粒过表达基因 <i>manC</i> , <i>manB</i> , <i>gmd</i> , <i>wcaG</i> , <i>wbgO</i> 和 <i>Bf13FT</i> (K128D)	<i>lgtA</i> (<i>N. meningitidis</i>); <i>wbgO</i> (<i>E. coli</i> O55:H7); <i>Bf13FT</i> (<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343)	LNFP V , 2.44 g/L (摇瓶); 25.68 g/L (5 L 发酵罐)	[44]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>wecB</i> , <i>nagB</i> 和 <i>ugd</i> ; 整合基因 <i>galE</i> ; 质粒过表达基因 <i>manC</i> , <i>manB</i> , <i>gmd</i> , <i>wcaG</i> , <i>wbgO</i> , <i>fucT14</i> 和 <i>futM1</i>	<i>lgtA</i> (<i>N. meningitidis</i>); <i>wbgO</i> (<i>Escherichia coli</i> O55:H7); <i>fucT14</i> (<i>Helicobacter pylori</i> DMS 6709); <i>futM1</i> (a <i>Bacteroidaceae</i> bacterium from gut metagenome)	LNDFH II , 3.01 g/L (摇瓶); 18.06 g/L (5 L 发酵罐)	[45]
<i>E. coli</i> K-12 W310	删除基因 <i>lacZY</i> 和 <i>wcaJM</i> ; 质粒过表达基因 <i>HpgalT</i> , <i>NplgtA</i> , <i>PgsfucT</i> , <i>rcsA</i> 和 <i>lacY</i>	<i>NplgtA</i> (<i>Neisseria polysaccharea</i> ATCC 43768); <i>HpgalT</i> (<i>H. pylori</i> NCTC 11637); <i>PgsfucT</i> (<i>Parabacteroides goldsteinii</i> JCM 13446)	LNFP III , 1.05 g/L (摇瓶); 3.84 g/L (3 L 发酵罐)	[46]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>wecB</i> , <i>nagB</i> , <i>ugd</i> , <i>nanA</i> , <i>nanK</i> 和 <i>nanT</i> ; 整合基因 <i>galE</i> 和 <i>lgtA</i> (四拷贝); 质粒过表达基因 <i>neuB</i> , <i>neuC</i> , <i>neuA</i> , <i>wbgO</i> 和 <i>nst</i>	<i>lgtA</i> (<i>N. meningitidis</i>); <i>wbgO</i> (<i>Escherichia coli</i> O55:H7); <i>nst</i> (<i>Neisseria meningitidis</i>)	LST a , 1.24 g/L (摇瓶); 4.85 g/L (5 L 发酵罐)	[47]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	删除基因 <i>lacZ</i> , <i>wecB</i> , <i>nagB</i> , <i>ugd</i> , <i>nanA</i> , <i>nanK</i> 和 <i>nanT</i> ; 整合基因 <i>galE</i> 和 <i>lgtA</i> (四拷贝); 质粒过表达基因 <i>neuB</i> , <i>neuC</i> , <i>neuA</i> , <i>hpgalT</i> 和 <i>ed6st</i>	<i>lgtA</i> (<i>N. meningitidis</i>); <i>hpgalT</i> (<i>H. pylori</i> J99); <i>ed6st</i> (<i>Vespertiliibacter pulmonis</i>)	LST c , 1.72 g/L (摇瓶); 9.74 g/L (5 L 发酵罐)	[36]

HMOs生物合成途径, 而筛选高催化活性和严格底物特异性的GTs是优化产物合成的关键环节。Blixt等人于1999年首次从脑膜炎奈瑟菌 (*N. meningitidis*) 中克隆并鉴定了LgtA酶, 该 β 1, 3-GlcNAcT能够高效催化LNTri II的合成, 成为

HMOs生物合成的奠基性工具酶^[48]。McArthur等人通过比较四种细菌同源物, 发现Cv β 3GalT对UDP-Gal和LNTri II的催化效率较对照组提升数十倍, 显著提高了LNT的合成效率^[28]。此外, 通过NCBI的BLAST从微生物库中筛选的*H. pylori*来源

的HpgalT（一种 β 1,4-GalT），在LNnT合成中表现出优异的催化性能，产量较对照提高28.57%^[49]。Zhu等人筛选出两株高活性的 α 1,2-FucT——固氮螺菌（*A. lipoferum*）SAMT^[50]和螺杆菌（*H. sp.*）BKHT^[51]，它们具备高效的2'-FL合成能力，且无 α 1,3-FucT活性。基于这两种酶构建的代谢工程大肠杆菌在补料分批培养中分别实现112.56 g/L和94.7 g/L的2'-FL产量。Li等人系统评估了三种不同来源的 α 2,6-SiaT及其突变体对6'-SL合成的影响，发现最优菌株的产量较对照提升2.01 g/L，凸显了酶选择对产物得率的关键影响^[52]。综上，微生物来源的GTs是构建HMOs生物合成途径的重要工具，但不同酶的催化效率及底物特异性存在显著差异。因此，筛选高效的GTs对于开发高效微生物细胞工厂具有重要意义。

4.2 蛋白质工程修饰糖基转移酶

与蛋白质和寡核苷酸的生物合成不同，寡糖的合成并非模板依赖的过程，因此复杂HMOs的合成路线设计高度依赖于GTs的底物特异性。Tao等人^[53]基于AlphaFold对LgtA的三维结构建模，结合丙氨酸扫描技术鉴定了其于乳糖结合的活性口袋。通过将关键氨基酸残基突变为酪氨酸或色氨酸以空间阻碍底物结合通道，他们成功阻断了LgtA对LNnT的识别。其中，突变体N223Y和K228W使长链低聚糖的摩尔产率降低了30%，有效调控了糖链延伸。Nidetzky团队^[54]则对 β -D-半乳糖苷唾液酸转移酶的活性口袋进行了理性设计，通过双突变（P7H/M117A）将其区域选择性从天然 α 2,3型转变为 α 2,6型，并阐明了关键氨基酸残基与区域选择性的构效关系。这一策略为唾液酸乳糖和唾液酸-N-乙酰乳糖胺的酶法合成提供了指导。为实现乳糖向DFL的高效转化，Zhu等人^[39]基于结构指导的理性设计，对催化关键酶HP3/4FT进行优化，获得五突变体MH5（F49K/Y131D/Y197N/E338D/R369A）。通过在大肠杆菌中共表达GDP-Fuc合成基因簇、 α 1,2FucT2及MH5突变体，最终在补料分批发酵中实现DFL产量达45.81 g/L，展现了工业化生产的潜力。

Yu等人通过对*H. pylori*来源的三种 α 1,3FucT

的碳端七肽重复的截断（只保留1或2组七肽重复）可以增强转移酶的可溶性。此外，通过增加这些 α 1,3FucT七肽重复的个数并截断碳端膜锚定区域，可提升其在大肠杆菌中合成3-FL的产量（提升10~2倍）^[55]。Tan等人通过单细胞超高通量-荧光激活细胞分选对 α 1,3FucT进行了定向进化，最终获得的七点突变体M32合成3-FL的催化效率提升了14倍^[56]。通过多种蛋白质工程策略对HMOs合成相关糖基转移酶的改造可以有效改变其理化性质，包括底物选择性、可溶性、催化活力等，从而显著改善相关HMOs的合成效率。

4.3 代谢通路的模块化组装

代谢途径的模块化组装是指将复杂的代谢网络分解为功能相对独立、灵活可控的模块单元，每个模块负责特定的代谢功能，包括碳源摄取、前体/中间体合成、产物输出等。借助合成生物学工具，优化各模块内部及模块之间的相互作用，实现代谢通路的精准调控与代谢通量平衡，最终达到目标产物的高效合成目的^[57-59]。2010年，Ajikumar等人最早提出多变量-模块化策略并应用于紫杉二烯生物代谢合成中，使得其产量相较于对照组提升约15000倍^[60]。此后，该策略被广泛应用于各种产品的微生物代谢合成中，包括脂肪酸^[61]、异戊二烯^[62]、N-乙酰葡萄糖胺^[63]、 β -胡萝卜素等^[64]。

组合模块化代谢工程策略同样被应用于HMOs的生物合成中。Zhu等人通过组合模块化策略优化HMOs关键中间LNTri II的生物合成^[65]。通过将代谢途径分为糖核苷酸UDP-GlcNAc合成模块以及产物LNTri II合成模块，基于表达质粒的拷贝数以及核糖体结合位点的翻译强度组合调控各模块的胞内表达水平，显著提升了LNTri II的产量。此外，代谢途径模块化组装策略还被应用于提升多种HMOs的微生物细胞工厂代谢合成效率，包括2'-FL、LNT、LNnT、3'-SL、6'-SL等^[42, 66-71]。该策略是一种简单、高效且通用的代谢合成策略，通过靶向优化各节点的表达，提升整体生物合成效率。值得注意的是，HMOs的微生物代谢合成还涉及跨模块的代谢流分支，如辅因子（NADPH、

核苷酸)的代谢合成和循环再生,可通过全局代谢模型的优化实现代谢流分配的协调,进一步提升目标产品的合成效率和产量^[72-73]。

4.4 代谢通路的动态调控

静态代谢工程方法常因代谢负担过重而导致产物合成受限,构建动态调控系统以实现细胞生长与产物合成代谢通量的精准平衡,已成为促进目标代谢产物高效合成的有效策略。动态代谢调控系统的构建依赖于遗传回路的合理设计,这些回路通常基于能够响应外部诱导剂、细胞内代谢物、环境因素或细胞生长状态的各类生物传感器。Yu等人创新性地设计并重构了适用于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的温敏型调控元件,以温度作为输入信号实现对不同基因模块的动态调控,并将其成功应用于2'-FL的代谢合成。通过将代谢模块的关键调控节点与温度响应节点相耦合,构建了多模块时序调控系统,并创造性地将热传感器与CRISPR干扰技术(CRISPRi)相结合,开发出新型可编程温度响应遗传电路。应用该动态调控系统后,2'-FL在摇瓶培养中的产量达到1839.7 mg/L,较亲本菌株提高了5.16倍^[74]。此外,基于Lux型群体感应系统的动态调控策略在LNnT合成中也展现出显著优势。Tao等人将Lux型群体感应系统元件整合至LNnT合成底盘菌株中,利用AHL分子介导的细胞密度感应机制,实现了对LNnT合成基因的自动时序调控。通过优化不同启动子的触发时间,该动态调控系统使LNnT产量较静态控制提高了2.4倍。进一步利用群体感应启动子调控CRISPRi系统的表达,实现了对竞争途径基因*zwf*和*pfkA*的动态下调,从而有效提升了LNnT的合成效率^[75]。动态调控技术凭借其快速响应和精准调控的特性,已成为HMOs生物合成领域的关键赋能工具。随着合成生物学技术的持续发展和人工智能技术的深度融合,动态调控策略将在HMOs合成领域发挥更加重要的作用,为复杂糖类化合物的高效生物制造提供新的技术路径。

4.5 代谢通路的空间组织

天然生物催化系统通常形成有组织的多酶复

合物、酶分子支架或反应微区室,以促进底物在酶活性位点之间转移来提升多酶级联反应的效率^[76-79]。微生物细胞工厂中异源代谢途径没有类似的空间组织结构,通常会导致代谢通量失衡和生物合成效率较低。研究人员不断尝试开发多酶空间组织策略,将特定的酶和底物在时间和空间上聚集在一起,这类人工合成的多酶复合体系能够有效加速底物/中间产物在通路酶之间的传递,缓解代谢通量不平衡、有毒中间产物的积累、不稳定中间产物的降解以及内源代谢途径的串扰等问题(图4)。目前,已开发出多种通路酶的空间组织策略,包括基于合成支架的多酶复合物构建、无支架多酶自组装以及基于人工合成亚细胞区室(细胞器)的代谢通路区室化。

已有多种代谢通路空间组织策略被用于提升HMOs的代谢合成。Wan等人使用互作短肽对RIAD-RIDD将2'-FL补救合成途径关键酶Fkp和FutC自组装形成多酶复合体。通过调整短肽标签的位置和数量优化了多酶复合体的空间结构和通路酶化学计量比,最终2'-FL的产量相较于对照菌株提升了134.6%^[80]。此外,通过在大肠杆菌胞内表达Laf-1蛋白的内在无序结构域RGG,成功构建了基于无序蛋白的人工合成无膜细胞器。将合成细胞器用于代谢通路酶的区室化,提升了2'-FL和3-FL的生物合成效率^[81-82]。Yu等通过从头设计无序蛋白成功构建了多功能无膜细胞器并将该工具用于2'-FL从头合成途径区室化^[83]。此外,沐万孟团队基于DIX结构域、类DIX的特殊寡聚结构域以及自定义双嵌段结构相分离蛋白开发了一系列性质各异的合成蛋白区室,并将其用于2'-FL、LNT和LNnT的代谢途径关键酶的区室化共定位,目标产物的产量获得大幅度提升^[84-86]。具体来说,通过在大肠杆菌中表达可发生“头对尾”寡聚的特殊结构域,可生成具有多种形态的胞内合成区室体系。将互作基序RIAD-RIDD整合到结构域和客户蛋白中,可实现对目标蛋白的胞内共定位。选择了包括2'-FL、LNT、LNnT在内的多种HMOs生物合成途径作为代谢模型,将途径顺序酶共定位至合成区室中,目标产物产量都有显著提升^[84]。在另一项研究中,构建了自定义的嵌段结构功能肽,基于该蛋白成功构建了人工合成无膜细胞器。

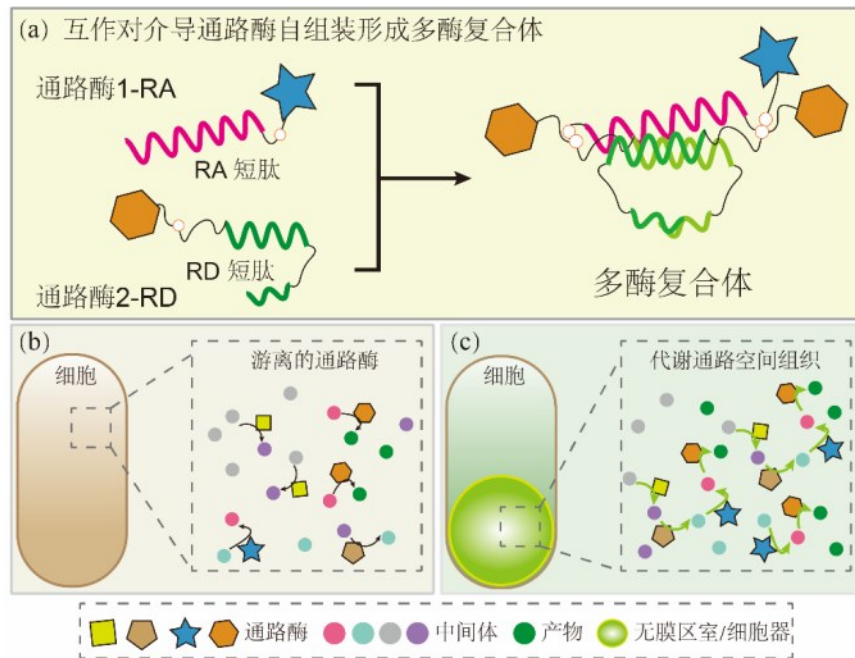


图4 代谢通路的空间组织提升产物合成效率

(a) 互作对介导通路酶自组装形成多酶复合体；(b) 宿主表达游离的通路酶；(c) 宿主内表达蛋白区室并实现通路酶共定位

Fig. 4 Spatial organization of metabolic pathways enhances product synthesis efficiency

(a) Interaction pairs mediate pathway enzyme self-assembly to form multi-enzyme complexes; (2) Strains expressing free-floating pathway enzymes; (3) Expression of protein compartments in hosts and co-localization of pathway enzymes

通过对功能肽组成的改变，可调节胞内凝聚物的相行为与理化性质。基于嵌段结构功能肽的合成细胞器系统能募集关键通路酶实现区室化共定位，有效强化了LNnT和LNT的代谢通量^[86]。

4.6 宿主和底物选择

大肠杆菌是目前HMOs生物合成应用最为广泛的模式菌株，其天然存在合成UDP-Gal、UDP-GlcNAc以及GDP-Fuc三种糖核苷酸的内源代谢通路，具备吸收底物乳糖的机制，在生产效率、底物转化率、产品种类及工业化生产等方面具备优势。随着基因编辑技术、合成生物学和代谢工程策略的不断发展，多种微生物宿主，如谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)^[87]、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)^[88]、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)^[89]、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)^[90] 及 *B. subtilis*^[91] 等，也已被开发用于HMOs代谢合成。此外，加州大学伯克利分校 Patrick M. Shih 团队研究报道了利用植物平台（如本氏烟草 *Nicotiana benthamiana*）合成各种HMOs，

包括多种中性、岩藻糖基化和唾液酸化的HMOs。植物能从光合作用固定的二氧化碳中产生多种聚糖，包括多种糖核苷酸，其强大的糖代谢能力和农业规模的种植能力使其成为生产HMOs的一种可能的平台^[92]。

除了宿主的选择，HMOs的生物合成还应当从成本及转化率等方面考虑底物碳源的合理选择。Zhang 等人以海藻中的甘露醇作为碳源，利用代谢工程改造 *Y. lipolytica* 为底盘细胞，实现2'-FL的高效合成，表明了其直接利用褐藻加工废水生产高附加值化合物的能力^[89]。Zhu 等人通过工程改造的大肠杆菌实现从葡萄糖和木糖（两种木质纤维素生物质的主要成分）共培养高效合成2'-FL，展示了利用木质纤维素生物质生产高价值HMOs的潜力，为未来利用廉价生物质生产HMOs提供了一种可行的方案^[93]。此外，蔗糖、果糖等廉价可再生碳源也被应用于2'-FL的生物合成中^[94-95]。应当注意的是，HMOs的生物合成通常需要较为复杂的GTs以及多种糖核苷酸供应的催化代谢网络，宿主和底物的选择直接影响合成效率、产物特异性和规模化生产的可行性。

5 总结与展望

HMOs作为母乳中的核心功能组分,对婴幼儿生长发育具有不可替代的生理调节功能,现已成为新一代配方奶粉的关键活性成分。本文系统综述HMOs领域的最新研究动态,重点探讨了以下核心议题:(1)HMOs生理功能研究进展:聚焦肠道菌群调控及免疫激活调控等;(2)关键糖基转移酶的发掘与改造:解析其底物特异性、晶体结构及催化机制;(3)微生物细胞工厂的代谢途径设计:涵盖前体供给优化与合成通量强化策略;(4)底盘细胞适配性改造策略:结合系统代谢工程与动态调控技术。通过阐述关键酶元件的筛选、代谢通量的精准平衡及细胞网络的全局调控等核心科学问题,旨在为HMOs的高效生物合成提供理论支撑与技术创新路径。

HMOs作为一种天然的功能性营养成分,凭借其独特的生理功能和作用机制,在婴幼儿营养、成人健康乃至医疗领域展现出巨大的应用潜力。随着对HMOs生理功能的深入探究,HMOs的应用范围已经突破了婴幼儿营养领域(配方奶粉),向成人健康领域(功能性食品、特医食品等)拓展。HMOs凭借其多元生物活性与菌群调控能力,已成为特医食品创新开发的核心组分。从婴幼儿过敏管理到成人慢性炎症干预,从单一成分应用到与益生菌(双歧杆菌、植物乳杆菌等)或其他功能性寡糖(低聚半乳糖、低聚果糖等)的复配,其在不同类型的特医食品中表现出强大的应用潜力。未来可通过个性化适配,建立基于HMOs的精准营养生态系统。然而,HMOs结构多样性与其功能特异性的对应关系、跨物种研究的转化可行性以及长期干预的生物学效应仍需系统探究。未来研究需结合多组学技术与临床队列验证,深入解析HMOs在生命早期发育及成人健康中的分子机制,为开发基于HMOs的功能性制剂提供理论依据。

HMOs的规模化生物合成仍然面临着市场需求激增与技术瓶颈的双重挑战。当前研究聚焦于构建高效微生物细胞工厂,通过系统性的代谢工程策略实现目标产物的定向合成。尽管合成生物学和代谢工程的不断发展为HMOs的高效生物合成提供了技术支撑,但多种HMOs的大规模生物合

成技术仍不成熟,突破现有瓶颈需建立多维度系统优化策略。例如,多组学技术分析工程菌株的代谢副产物分布;基于AI和机器学习的代谢网络建模协同多组学数据分析,精确识别关键代谢节点,改善目标产品合成效率等。HMOs生物合成的关键要素之一是深入探究特定GTs催化的各种糖基化反应的作用机制及受体特异性。使用恰当的GTs,将有利于控制较长糖链衍生物的糖基化反应(如岩藻糖基化和/或唾液酸化)。

当前HMOs的产业化仍面临糖基化位点的精准控制和规模化生产的成本控制两大技术瓶颈。糖基化位点的精确调控是合成复杂长链HMOs的难点,主要体现在以下方面:(1)酶特异性不足与副产物积累,如岩藻糖基转移酶对底物的选择性不足,易导致副产物生成。可通过特定转移酶的定向筛选、晶体结构和催化机制解析以及蛋白质工程改造缓解这一问题;(2)微生物细胞工厂代谢通量失衡,如HMOs合成涉及的多步糖基化反应需平衡糖核苷酸供体的合成与消耗以及考虑辅因子/氧化还原的循环再生;(3)HMOs的结构多样性与精准检测。母乳中已鉴定超200种HMO结构,目前工业化量产不超过10种,因复杂结构难以在微生物中重构。此外,规模化生产的成本控制需要考虑廉价碳源的利用、副产物控制、菌株鲁棒性和发酵工艺优化以及下游分离纯化设备和工艺的创新优化等。未来研究将重点突破复杂支链HMOs的多酶级联催化合成,开发具有宽泛受体特异性的GTs工具箱,并建立跨膜转运蛋白的定向进化平台,最终实现HMOs结构多样性的精准可控生物合成。此外,植物合成生物学平台逐渐被关注,如利用烟草细胞的光合固碳能力,通过工程化改造实现二氧化碳到多种HMOs的直接转化,为绿色生物制造开辟了新路径。

参 考 文 献

- [1] MENG J, ZHU Y, WANG H, et al. Biosynthesis of human milk oligosaccharides: enzyme cascade and metabolic engineering approaches[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(5): 2234-2243.
- [2] 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.
- [3] ZHU Y, ZHANG W, MU W. Human Milk Oligosaccharides: The new gold standard for premium infant formula[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(7): 2061-2063.
- [4] ZHU L, LI H, LUO T, et al. Human milk oligosaccharides: a critical review on structure, preparation, their potential as a food bioactive component, and future perspectives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(43): 15908-15925.
- [5] LORDAN C, ROCHE A K, DELSING D, et al. Linking human milk oligosaccharide metabolism and early life gut microbiota: bifidobacteria and beyond[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 2024, 88(1): e0009423.
- [6] BODE L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama[J]. Glycobiology, 2012, 22(9): 1147-1162.
- [7] UNDERWOOD M A, GERMAN J B, LEBRILLA C B, et al. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut[J]. Pediatric Research, 2015, 77(1-2): 229-35.
- [8] ASAKUMA S, HATAKEYAMA E, URASHIMA T, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria[J]. The Journal of Biological chemistry, 2011, 286(40): 34583-34592.
- [9] JAMES K, MOTHERWAY M O, BOTTACINI F, et al. *Bifidobacterium breve* UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38560.
- [10] JARA S, SÁNCHEZ M, VERA R, et al. The inhibitory activity of *Lactobacillus spp.* isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin[J]. Anaerobe, 2011, 17(6): 474-477.
- [11] KONG C, ELDERMAN M, CHENG L, et al. Modulation of intestinal epithelial glycocalyx development by human milk oligosaccharides and non-digestible carbohydrates[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63(17): e1900303.
- [12] WU R Y, LI B, HORNE R G, et al. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides on the intestinal epithelial transcriptome in Caco-2 cells and a murine model of necrotizing enterocolitis[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2022, 66(4): e2100893.
- [13] KONG C, BEUKEMA M, WANG M, et al. Human milk oligosaccharides and non-digestible carbohydrates prevent adhesion of specific pathogens via modulating glycosylation or inflammatory genes in intestinal epithelial cells[J]. Food & Function, 2021, 12(17): 8100-19.
- [14] CHEN Y, WEN Y, ZHAO R, et al. Human milk oligosaccharides in preventing food allergy: A review through gut microbiota and immune regulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 278(Pt 2): 134868.
- [15] BUTTON J E, AUTRAN C A, REENS A L, et al. Dosing a synbiotic of human milk oligosaccharides and *B. infantis* leads to reversible engraftment in healthy adult microbiomes without antibiotics[J]. Cell Host & Microbe, 2022, 30(5): 712-725.e7.
- [16] BUTTON J E, COSETTA C M, REENS A L, et al. Precision modulation of dysbiotic adult microbiomes with a human-milk-derived synbiotic reshapes gut microbial composition and metabolites[J]. Cell Host & Microbe, 2023, 31(9): 1523-1538.e10.
- [17] LI Y, XUE M, SHENG X, et al. Donor substrate promiscuity of bacterial β 1-3-*N*-acetylglucosaminyltransferases and acceptor substrate flexibility of β 1-4-galactosyltransferases[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24(8): 1696-1705.
- [18] 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.
- [19] LUO G, HUANG Z, ZHU 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.
- [20] 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]. Carbohydrate Research, 2019, 480: 1-6.
- [21] XU Y, FAN Y, YE J, et al. Successfully engineering a bacterial sialyltransferase for regioselective α 2, 6-sialylation[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(8): 7222-7227.
- [22] ZHAO M, ZHU Y, WANG H, et al. An overview of sugar nucleotide-dependent glycosyltransferases for human milk oligosaccharide synthesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(33): 12390-123402.
- [23] LIN L Y C, RAKIC B, CHIU C P C, et al. Structure and mechanism of the lipooligosaccharide sialyltransferase from *Neisseria meningitidis**[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(43): 37237-37248.
- [24] SUN H-Y, LIN S-W, KO T-P, et al. Structure and mechanism of *Helicobacter pylori* fucosyltransferase: a basis for lipopolysaccharide variation and inhibitor design*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(13): 9973-9982.
- [25] NI L, CHOKHAWALA H A, CAO H, et al. Crystal structures of *Pasteurella multocida* sialyltransferase complexes with acceptor and donor analogues reveal substrate binding sites and catalytic mechanism[J]. Biochemistry, 2007, 46(21): 6288-6298.
- [26] KIM D-U, YOO J-H, LEE Y J, et al. Structural analysis of sialyltransferase PM0188 from *Pasteurella multocida* complexed with donor analogue and acceptor sugar[J]. BMB Reports, 2008, 41(1): 48-54.
- [27] KAKUTA Y, OKINO N, KAJIWARA H, et al. Crystal structure of *Vibrionaceae Photobacterium* sp. JT-ISH-224 α 2,6-

- sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: catalytic mechanism and substrate recognition[J]. *Glycobiology*, 2007, 18(1): 66-73.
- [28] 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.
- [29] LI C, WU M, GAO X, et al. Efficient biosynthesis of 2'-fucosyllactose using an in vitro multienzyme cascade[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(39): 10763-10771.
- [30] SCHELCH S, EIBINGER M, GROSS BELDUMA S. Engineering analysis of multienzyme cascade reactions for 3'-sialyllactose synthesis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(11): 4290-4304.
- [31] KHEDRI Z, LI Y, MUTHANA S, et al. Chemoenzymatic synthesis of sialosides containing C7-modified sialic acids and their application in sialidase substrate specificity studies[J]. *Carbohydrate Research*, 2014, 389: 100-111.
- [32] YU H, LI Y, ZENG J, et al. Sequential one-pot multienzyme chemoenzymatic synthesis of glycosphingolipid glycans[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2016, 81(22): 10809-10824.
- [33] TSAI T-W, FANG J-L, LIANG C-Y, et al. Exploring the synthetic application of *Helicobacter pylori* α 1, 3/4-fucosyltransferase FucTIII toward the syntheses of fucosylated human milk glycans and lewis antigens[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(12): 10712-10720.
- [34] LIAO Y, LAO C, WU J, 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): 5325-38.
- [35] YUE S, WANG N K, CHEN J P, et al. Enhanced biosynthesis of 6'-sialyllactose in *Escherichia coli* via systematic metabolic engineering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025. Doi: 10.1021/acs.jafc.5c02238.
- [36] LIU Y L, LIN Q, SHENG M, et al. Highly efficient in vivo production of sialyllacto-*N*-tetraose C via screening of beneficial β 1,4-galactosyltransferase and α 2,6-sialyltransferase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(9): 5376-5384.
- [37] LI N, YAN S F, XIA H Z, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21(DE3) for 2'-fucosyllactose synthesis in a higher productivity[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(2): 441-452.
- [38] LU S J, LAO C W, WANG J, et al. Multistrategy optimization for high-yield 3-fucosyllactose production in *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(9): 5385-5394.
- [39] ZHU Y, CHEN R, WANG H, et al. De Novo Biosynthesis of difucosyllactose by artificial pathway construction and α 1,3/4-fucosyltransferase rational design in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(16): 9247-9258.
- [40] LV X Y, CHEN X S, LIU Y F, et al. Efficient production of 3'-sialyllactose using *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(49): 27314-27325.
- [41] 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.
- [42] LI C C, LI M L, HAN M, et al. Multi-level metabolic engineering of 6'-sialyllactose in *Escherichia coli*[J]. *Food Bioscience*, 2025, 65: 106078.
- [43] ZHU Y, YANG L, ZHAO C, 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.
- [44] WANG N N, ZHU Y Y, WANG L, et al. Highly-efficient in vivo production of lacto-*N*-fucopentaose V by a regio-specific α 1, 3/4-fucosyltransferase from *Bacteroides fragilis* NCTC 9343[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 266(Pt 1): 130955.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] SHENG M, LIU Y L, ZHU Y Y, et al. Efficient biosynthesis of sialyllacto-*N*-tetraose a by a metabolically engineered *Escherichia coli* BL21(DE3) Strain[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(11): 6820-6827.
- [48] 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 1-3Gal linkages [J]. *Glycobiology*, 1999, 9(10): 1061-1071.
- [49] LIAO Y, WU J, LI Z, 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.
- [50] CHEN Y, ZHU Y, WANG H, et al. De novo biosynthesis of 2'-fucosyllactose in a metabolically engineered *Escherichia coli* using a novel α 1, 2-fucosyltransferase from *Azospirillum lipoferum*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 374: 128818.
- [51] ZHU Y, CHEN R, WANG H, et al. Elimination of Byproduct Generation and enhancement of 2'-fucosyllactose synthesis by

- expressing a novel α 1, 2-fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(12): 4915-4923.
- [52] LI C, LI M, HU M, et al. Engineering *Escherichia coli* for the efficient biosynthesis of 6'-sialyllactose[J]. Food Bioscience, 2023, 55: 103040.
- [53] TAO M, YANG L, ZHAO C, 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.
- [54] SCHMÖLZER K, CZABANY T, LULEY-GOEDL C, et al. Complete switch from α -2, 3- to α -2, 6-regioselectivity in *Pasteurella dagmatis* β -d-galactoside sialyltransferase by active-site redesign[J]. Chemical Communications, 2015, 51(15): 3083-3086.
- [55] YU J, SHIN J, PARK M, et al. Engineering of α -1, 3-fucosyltransferases for production of 3-fucosyllactose in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 269-278.
- [56] TAN Y, ZHANG Y, HAN Y, et al. Directed evolution of an α 1, 3-fucosyltransferase using a single-cell ultrahigh-throughput screening method[J]. Science Advances, 2019, 5: eaaw8451.
- [57] BIGGS B W, DE PAEPE B, SANTOS C N, et al. Multivariate modular metabolic engineering for pathway and strain optimization[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 29: 156-162.
- [58] JESCHEK M, GERNGROSS D, PANKE S. Combinatorial pathway optimization for streamlined metabolic engineering [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 47: 142-151.
- [59] LU H, VILLADA J C, LEE P K H. Modular metabolic engineering for biobased chemical production[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(2): 152-166.
- [60] AJIKUMAR P K, XIAO W H, TYO K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science (New York, NY), 2010, 330(6000): 70-74.
- [61] XU P, GU Q, WANG W, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1409.
- [62] LV X, GU J, WANG F, et al. Combinatorial pathway optimization in *Escherichia coli* by directed co-evolution of rate-limiting enzymes and modular pathway engineering[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(12): 2661-2669.
- [63] LIU Y, ZHU Y, LI J, et al. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved *N*-acetylglucosamine production [J]. Metabolic Engineering, 2014, 23: 42-52.
- [64] ZHAO J, LI Q, SUN T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production[J]. Metabolic Engineering, 2013, 17: 42-50.
- [65] ZHU Y, WAN L, MENG J, 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.
- [66] LI Z, ZHU 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.
- [67] ZHANG P, ZHU Y, LI Z, 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.
- [68] LI W, ZHU 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.
- [69] ZHANG J, ZHU Y, ZHANG W, et al. Efficient production of a functional human milk oligosaccharide 3'-sialyllactose in genetically engineered *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(8): 2837-2845.
- [70] 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, 2022, 15(5): 1561-1573.
- [71] 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.
- [72] ZHU Y, CAO H, WANG H, et al. Biosynthesis of human milk oligosaccharides via metabolic engineering approaches: current advances and challenges[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 78: 102841.
- [73] LIU Y, ZHU Y, WANG H, et al. Strategies for enhancing microbial production of 2'-fucosyllactose, the most abundant human milk oligosaccharide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(37): 11481 - 11499.
- [74] YU W W, JIN K, WU Y K, et al. A pathway independent multi-modular ordered control system based on thermosensors and CRISPRi improves bioproduction in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(11): 6587-6600.
- [75] TAO M, YANG L, ZHAO C, 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.
- [76] CONRADO R J, VARNER J D, DELISA M P. Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(5): 492-499.
- [77] DUEBER J E, WU G C, MALMIRCHEGINI G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(8): 753-759.
- [78] VÁZQUEZ-GONZÁLEZ M, WANG C, WILLNER I. Biocatalytic cascades operating on macromolecular scaffolds

- and in confined environments[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 256-273.
- [79] KÜCHLER A, YOSHIMOTO M, LUGINBÜHL S, et al. Enzymatic reactions in confined environments[J]. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11(5): 409-420.
- [80] WAN L, ZHU Y, CHEN G, et al. Efficient production of 2'-fucosyllactose from L-fucose via self-assembling multienzyme complexes in engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(10): 2488-2498.
- [81] WAN L, ZHU Y, ZHANG W, et al. Phase-separated synthetic organelles based on intrinsically disordered protein domain for metabolic pathway assembly in *Escherichia coli*[J]. *ACS nano*, 2023, 17(11): 10806-10816.
- [82] HUANG H, YU W, XU X, et al. Combinatorial engineering of *Escherichia coli* for enhancing 3-fucosyllactose production[J]. *ACS Synth Biol*, 2024, 13(6): 1866-1878.
- [83] YU W, JIN K, WANG D, et al. De novo engineering of programmable and multi-functional biomolecular condensates for controlled biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 7989.
- [84] WAN L, ZHU Y, KE J, 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.
- [85] WAN L, KE J, ZHU Y, et al. Intracellular Construction of organelle-like compartments facilitates metabolic flux in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(37): 20582-20591.
- [86] KE J, WAN L, CHEN M, et al. Design of a diblock-based membraneless organelle system for metabolic process control [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 506: 160239.
- [87] LEE Y G, JO H Y, LEE D H, et al. De novo biosynthesis of 2'-fucosyllactose by bioengineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Biotechnology Journal*, 2024, 19(1): e2300461.
- [88] LIU H, ZENG Q, ZHU C, 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.
- [89] ZHANG Y, LIU H, LIU M, et al. Investigation of mannitol as a potential substrate for production of 2'-fucosyllactose in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 430: 132583.
- [90] FANG H, GAO J, YU L, et al. Engineering *Pichia pastoris* for efficient de novo synthesis of 2'-fucosyllactose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(14): 8555-8566.
- [91] ZHANG Q, XU X, ZHANG W, et al. De novo 2'-fucosyllactose biosynthesis using glucose as the sole carbon source by multiple engineered *Bacillus subtilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2025, 88: 85-93.
- [92] BARNUM C R, PAVIANI B, COUTURE G, et al. Engineered plants provide a photosynthetic platform for the production of diverse human milk oligosaccharides[J]. *Nature Food*, 2024, 5(6): 480-490.
- [93] ZHU Y, ZHAO M, WANG H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21(DE3) cocultured with glucose and xylose for efficient production of 2'-fucosyllactose[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 419: 132062.
- [94] YOU R, WANG L, HU M, et al. Efficient production of 2'-fucosyllactose from fructose through metabolically engineered recombinant *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 38.
- [95] PARSCHEAT K, SCHREIBER S, WARTENBERG D, et al. High-titer de novo biosynthesis of the predominant human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose from sucrose in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(10): 2784-2796.



通讯作者: 沐万孟(1981—),男,博士生导师,教授,主要从事食品酶与食品酶工程、食品功能配料生物制造等应用基础和产业化研究,尤其围绕D-阿洛酮糖、人乳寡糖等功能糖的生物制备领域。主持国家自然科学基金、国家重点研发项目和课题等项目20余项,千万级横向3项。近5年,主编英文专著1部,在ACS Nano、Metab Eng、Chem Eng J、Biotechnol Adv、Bioresource Technol、Carbohydr Polym等期刊发表SCI论文160余篇。

E-mail: wmmu@jiangnan.edu.cn



第一作者: 万李(1996—),男,博士后,主要研究方向为母乳低聚糖生物制造。

E-mail: liwan@jiangnan.edu.cn