

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-052

人乳寡糖的体外生物转化合成研究进展

李毅, 李因双, 李爽, 凌沛学, 房俊强

(山东大学, 国家糖工程技术研究中心, 山东 青岛 266237)

摘要: 人乳寡糖是存在于人乳中的天然活性寡糖, 对新生儿健康至关重要。人乳寡糖具有多种健康益处, 如益生元活性、抗炎和抗菌特性、抗病毒以及促进新生儿认知发展作用等, 已经成为婴儿配方奶粉、临床婴儿营养品、膳食补充剂或功能食品的重要组成部分。随着越来越多人乳寡糖获批应用于婴儿配方奶粉, 其在商业领域的价值愈发凸显, 人乳寡糖规模化制备技术也成为研究热点。鉴于人乳寡糖广阔的应用前景与市场需求, 以及体外生物转化 (ivBT) 在大宗糖类产品生产中所展现的高效、绿色、可规模化放大等显著优势, 本文综述了人乳寡糖的结构组成、功能特性和合成方法, 尤其是体外生物转化在人乳寡糖规模制备领域的研究进展, 为相关基础研究与产业转化提供理论依据与技术参考。未来ivBT将向原料绿色化、酶元件改造智能化、过程连续化纵深发展, 进一步降低人乳寡糖高效规模化生产的综合成本, 为产业化注入新动能。

关键词: 人乳寡糖; 生物活性; 合成方法; 体外生物转化

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Recent Progress on the *in vitro* Bio-transformation Synthesis of Human Milk Oligosaccharides

LI Yi, LI Yinshuang, LI Shuang, LING Peixue, FANG Junqiang

(National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China)

Abstract: Human milk oligosaccharides (HMOs) are naturally occurring bioactive oligosaccharides existed in human milk, playing a critical role in neonatal health. These oligosaccharides confer multiple health benefits, including prebiotic activity, anti-inflammatory effects, antimicrobial activity, and antiviral properties, as well as the promotion of cognitive development in newborns. Consequently, HMOs have emerged as essential components in infant formula, clinical nutrition products, dietary supplements, and functional foods. The escalating commercial value of HMOs has driven intensive research into scalable production technologies. Traditional extraction and chemical synthesis methods for HMOs face challenges such as low efficiency, high costs, and limited yields. Accordingly, biotechnological approaches leveraging metabolic engineering and enzyme catalysis have become mainstream strategies for HMOs

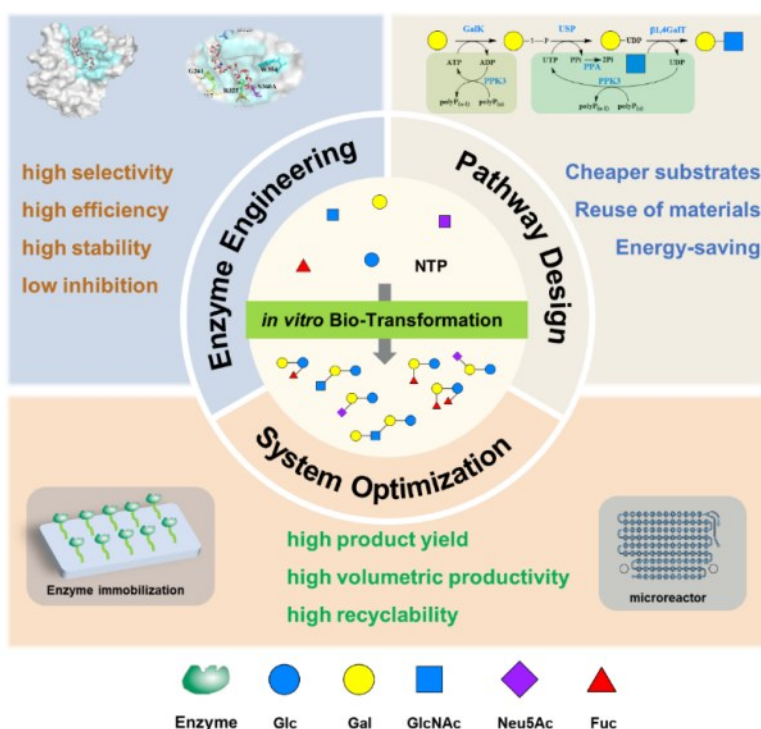
收稿日期: 2025-05-29 修回日期: 2025-07-29

基金项目: 国家重点研发项目 (2021YFC2103100); 山东省重点研发计划 (2022SFRC0103)

引用本文: 李毅, 李因双, 李爽, 凌沛学, 房俊强. 人乳寡糖的体外生物转化合成研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-052

Citation: LI Yi, LI Yinshuang, LI Shuang, LING Peixue, FANG Junqiang. Recent Progress on the *in vitro* Bio-transformation Synthesis of Human Milk Oligosaccharides[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-052

production. Although metabolic engineering of microbial strains improves HMOs yields and lowers production costs, challenges including inefficient substrate transport, byproduct accumulation, and product purification hurdles remain unresolved. *In vitro* Bio-Transformation (ivBT) integrates the advantages of enzymatic catalysis and microbial fermentation, enabling efficient extracellular biosynthesis and has emerged as an innovative biomanufacturing strategy. This approach addresses bottlenecks in traditional microbial synthesis, including low substrate utilization efficiency and byproduct formation—through enzyme discovery, pathway reconstruction, and optimization of reaction systems. Through enzyme engineering for novel substrate specificity and de novo multienzyme pathway design, ivBT enhances both product purity and yield while reducing complexity and costs, thereby providing novel methodologies for scalable HMOs synthesis. This paper reviews the structure, functional properties, and synthesis methods of human milk oligosaccharides, with a focus on the research progress of ivBT in the large-scale preparation of HMOs. It highlights the recent advances in ivBT technology, particularly in enzyme discovery and engineering, the construction of *in vitro* multi-enzyme catalytic pathways, and the scaling up of reaction systems. Furthermore, it analyzes the challenges and future trends of ivBT in the industrial production of HMOs, aiming to provide a theoretical basis and technical reference for related basic research and industrial transformation.



Keywords: human milk oligosaccharides; biological activities; synthesis method; *in vitro* Bio-Transformation

人乳寡糖 (Human milk oligosaccharides, HMOs) 是母乳中一类以游离形式存在的寡糖组分, 作为母乳中的第三大成分, 含量仅次于乳糖和脂质。HMOs 的含量在不同哺乳阶段存在显著变化, 成熟乳中的含量为 12-14 g/L, 而初乳中的含量为 20-24 g/L^[1]。HMOs 在婴幼儿早期肠道菌群的建立、

免疫系统调节、预防病原微生物感染和神经系统发育等方面发挥了重要作用^[2]。研究表明, 传统配方奶粉喂养的新生儿患坏死性结肠炎 (Necrotising enterocolitis, NEC) 的概率显著高于母乳喂养婴儿^[1], 而使用含 HMOs 配方奶粉喂养的婴儿, 其肠道菌群组成与母乳喂养婴儿更为相

似^[3]，主要原因在于传统配方奶粉中的低聚半乳糖 (galacto-oligosaccharides, GOS)、低聚果糖 (fructo-oligosaccharides, FOS) 和果胶低聚糖 (pectin-oligosaccharides, POS) 等添加组分无法替代 HMOs 的全部生物学功能^[4]。母乳是新生儿营养的“金标准”^[5]，对于无法母乳喂养的婴幼儿，添加 HMOs 的配方奶粉有助于婴幼儿在生命早期及时且持续地获得 HMOs 带来的健康益处。

基于 HMOs 的重要生理功能和在配方奶粉添加等领域的应用潜力，规模化制备策略已经成为科学研究的热点。传统的 HMOs 提取和化学合成方法面临效率低、成本高和产量有限等挑战，采用代谢工程和酶催化的生物技术手段已经成为 HMOs 生产的主流策略。利用基因工程菌株能够有效提高 HMOs 产量并降低生产成本，但依然面临底物转运效率低、副产物积累及产物分离纯化困难等挑战^[6]。

体外生物转化 (*in vitro* Bio-Transformation, ivBT) 作为一种新颖的生物制造方式，能够在细胞外环境中实现目标化合物的高效生物合成。在 HMOs 制备领域，ivBT 策略通过重构生化途径，优化酶的使用和反应体系，降低生物转化的成本同时提高产物的纯度和产率，并解决传统微生物合成中底物利用率低和副产物生成等瓶颈问题，为 HMOs 的合成提供了新的思路和方法^[7]。

本综述系统梳理了 HMOs 的生物功能、结构特征以及现有合成技术瓶颈，重点聚焦 ivBT 技术在体外多酶催化路径构建、酶元件挖掘与酶工程改造及反应体系放大等方面的研究进展，以期为推动 HMOs 的产业化应用提供理论支撑与技术路

径参考。

1 人乳寡糖的结构和功能

1.1 人乳寡糖的结构

HMOs 是由 D-葡萄糖 (Glc)、D-半乳糖 (Gal)、N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc)、L-岩藻糖 (Fuc) 和唾液酸 (Neu5Ac) 五种单糖构成的系列寡糖。糖链的还原端以乳糖 (Lactose, Gal β 1, 4Glc) 为起始，随后以 lacto-N-biose (LNB, Gal β 1, 3GlcNAc, type I) 或 N-acetyllactosamine (LacNAc, Gal β 1, 4GlcNAc, type II) 二糖结构单元延伸组成 HMOs 的糖链结构骨架；GlcNAc 与 Gal 通过 β 1,3 键或 β 1,6 键连接分别形成线性 HMOs 和分支 HMOs (图 1)^[8]。

乳糖或 HMOs 糖链骨架结构可进一步被岩藻糖或唾液酸修饰，根据糖链结构可以将 HMOs 分为三大类：岩藻糖基化的中性 HMOs (Fucosylated neutral HMOs)，唾液酸化的酸性 HMOs (Sialylated acidic HMOs) 以及非岩藻糖基化的中性 HMOs (Non-fucosylated neutral HMOs)^[8, 9]。通常，GlcNAc 上存在 α 1,3 或 α 1,4 岩藻糖基化修饰，糖链末端 Gal 上存在 α 1,2 岩藻糖基化修饰；此外，唾液酸化修饰通常发生在 HMOs 糖链末端，在末端 Gal 上存在 α 2,3 和 α 2,6 唾液酸化修饰，而在 GlcNAc 上仅存在 α 2,6 唾液酸化修饰^[10]。糖苷键的多样化连接方式和单糖组成共同导致了 HMOs 的结构多样性和种类复杂性，这也是 HMOs 多样化生物学功能的结构基础^[11]。

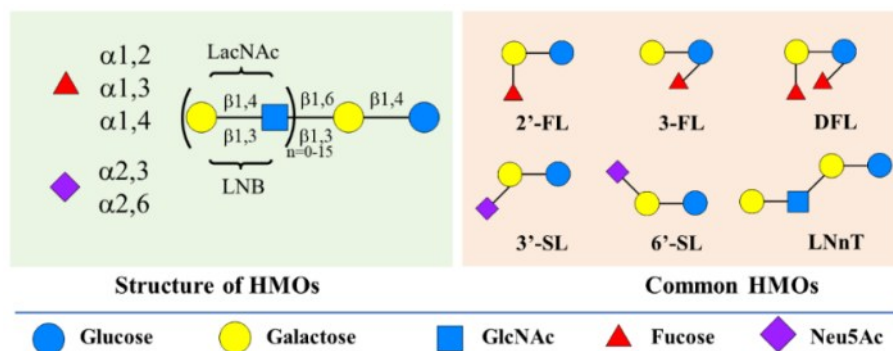


图1 HMOs 的结构特征与常见类型

Fig. 1 Structural Characteristics and Common Types of HMOs

1.2 人乳寡糖的功能

1.2.1 益生元活性

肠道是人体内微生物群最为丰富的区域，肠道菌群的平衡对宿主健康起着至关重要的作用^[12]。极少数HMOs能够被人体消化酶水解，约99%的HMOs能够完整到达肠道^[13, 14]，部分HMOs可以作为特定肠道微生物的发酵底物，例如厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium spp*)^[15, 16]等，作为一种天然的益生元促进婴幼儿肠道菌群的生长。双歧杆菌是婴儿肠道菌群中最主要的益生菌，能够增强肠上皮屏障功能，促进肠道成熟，减少自身免疫病和代谢疾病的发生。双歧杆菌以两种策略利用HMOs：一种通过转运蛋白将HMOs转运到细胞质中，由细胞内糖苷酶水解成单糖，参与细菌代谢；另一种是通过胞外锚定的分泌型糖苷酶降解HMOs，随后将水解的单糖或寡糖组分转运到胞内参与代谢过程^[17]。

1.2.2 免疫调节功能

HMOs通过与免疫细胞相互作用，调节细胞因子的产生和免疫细胞的激活，从而发挥免疫调节作用^[18]。母乳中分离的HMOs混合物能够诱导人类单核细胞来源的树突状细胞半成熟化，提高白细胞介素(interleukin, IL) IL-10、IL-27和IL-6等的分泌水平；还能促进来自初始CD4⁺T细胞的调节性T细胞(Treg)生成，调节婴幼儿免疫系统的正常发育^[19]。3'-Sialyllactose (3'-SL)能够特异性结合TLR4受体，刺激肠道CD11c⁺树突状细胞，增加干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)、TNF- α 、IL-12和转化生长因子- β 1 (Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的产生，促进Th1和Th17细胞的增殖，发挥免疫激活特性^[20]。HMOs还能够通过调节肠道菌群的组成，促进双歧杆菌在肠道内的定植，调节T细胞^[21]、树突状细胞和巨噬细胞的活性，参与维持肠道屏障功能^[22]。

1.2.3 抵抗病原体的侵袭

HMOs不仅有助于益生菌的定植，还可充当“可溶性诱饵受体”，降低病原微生物与细胞表面受体的亲和力，表现出较好的抗粘附和抗菌特性^[23]。部分细菌、真菌和病毒通过附着于上皮细

胞表面的糖萼入侵宿主，由于病原体附着识别的糖链具有与HMOs类似的结构，HMOs可以作为诱饵竞争性结合病原体，防止病原体附着和入侵宿主，从而降低婴儿的死亡率^[24]。研究表明，HMOs可以减少肠道致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)^[25, 26]、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和沙门氏菌(*Salmonella*)等病原菌的附着^[27]。同时诸多研究表明，HMOs可以提高婴幼儿对胃肠相关病毒的抵抗力^[28, 29]。非洲绿猴肾上皮MA104细胞感染性实验结果显示2'-岩藻糖基乳糖(2'-Fucosyllactose, 2'-FL)能够显著抑制G1P[8]型轮状病毒感染，3'-唾液酸乳糖(3'-Sialyllactose, 3'-SL)和6'-唾液酸乳糖(6'-Sialyllactose, 6'-SL)混合使用则能有效抑制G2P[4]型轮状病毒的感染^[30]。富含 α -岩藻糖的HMOs还能够与诸如病毒竞争性结合^[31]，降低母乳喂养婴儿的感染率。

1.2.4 调节肠道上皮细胞

HMOs能够直接作用于肠上皮细胞并增强肠道屏障，还能通过调节肠道微生物生态间接改善上皮细胞的屏障功能^[32]。研究表明，2'-FL、6'-SL和Lacto-N-neotetraose (LNnT)能够促进人类肠细胞系HT-29和Caco-2Bbe细胞的增殖和分化，有助于肠道屏障发育成熟^[33]。肠上皮糖萼在保护肠道屏障、调节微生物定植以及维持肠道免疫功能等方面具有重要作用。2'-FL和3'-岩藻糖基乳糖(3'-Fucosyllactose, 3'-FL)能够以结构依赖的方式刺激的糖萼发育，增强肠道的屏障作用^[34]。此外，将Caco-2细胞和HT-29细胞分别与以HMOs或乳糖作为唯一碳源培养的两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)孵育，相对于乳糖培养，以HMOs为碳源培养的*B. bifidum*孵育时，Caco-2细胞和HT-29细胞表现出更高的连接粘附分子和紧密连接蛋白表达水平，表明HMOs可以间接通过肠道益生菌增强肠道上皮的选择性通透屏障，减少有害微生物和化合物的吸收，进一步保护肠道屏障功能^[35]。

1.2.5 促进神经系统的发育

唾液酸对神经节苷脂的形成至关重要，婴儿发育早期大脑生长最为迅速，大脑中神经节苷脂的唾液酸含量迅速增加，哺乳期及时补充唾液酸

有助于婴儿大脑发育^[36]。动物实验表明,喂食仔猪唾液酸化乳糖3'-SL和6'-SL可增加其大脑中神经节苷脂结构中唾液酸的积累,有助于神经系统的发育^[37]。喂食3'-SL和6'-SL的大鼠和小鼠幼崽在认知任务上的表现优于对照组,补充6'-SL的大鼠,海马体和前额叶皮质长期增益效应(long-term potentiation, LTP)明显增强,神经元之间突触连接发生可塑性变化,学习和记忆能力明显提升^[38-40]。此外,一些岩藻糖基化HMOs也能够影响婴幼儿的认知发展^[41]。一项为期1年的小鼠行为测试实验表明,口服补充2'-FL的小鼠在新物体识别和Y迷宫测试中具有更好的表现^[42]。

2 人乳寡糖的商业化应用

2015年, Glycom A/S 申报的化学合成2'-FL和LNnT成为首先获得美国食品药品监督管理局(FDA)的GRAS认证的HMOs。随着HMOs生产工艺的成熟和生物活性研究的深入,目前已有多种HMOs陆续通过美国FDA的GRAS认证以及被欧盟食品安全局(EFSA)批准应用于新型食品添加剂,包括2'-FL^[43]、3-Fucosyllactose (3-FL)^[44]、Lacto-N-tetraose (LNT)^[45]、LNnT^[46]、3'-SL^[47]、6'-SL^[48]、Difucosyllactose (DFL)^[49]和Lacto-N-Fucopentaose I (LNFP I)等^[50]。HMOs已在全球100多个国家和地区批准上市使用,2016年雅培公司上市了添加2'-FL的婴幼儿配方奶粉,随后雀巢、惠氏、美赞臣等公司也相继推出了含有HMOs的配方奶粉。例如,惠氏的启赋配方奶粉在1、2、3和4阶段中,分别添加了0.5、0.13、0.11和0.11 g/L的LNnT。2024年中国国家卫生健康委员会批准了2'-FL和LNnT作为食品营养强化剂应用于婴幼儿配方奶粉,目前中国各头部乳企也已推出系列HMOs新品。

HMOs的市场潜力巨大,随着消费者对婴幼儿健康的关注度持续提升,推动了市场对高品质、高附加值的HMOs婴幼儿配方奶粉产品的需求。随着科学研究的深入及技术的不断革新,HMOs的应用范围可能进一步拓展,从婴幼儿配方奶粉到功能性食品等多个领域均有广阔的市场前景。

3 人乳寡糖的传统合成方法

3.1 化学法

化学合成是糖链制备的重要策略,通过精确控制糖苷化反应来实现糖苷键的形成和复杂糖链的制备。糖苷化反应的立体选择性和区域选择性是糖化学合成中的关键问题,同时也是面临的主要挑战。为了成功合成目标HMOs,需要选择合适的保护基团,并通过多轮保护和脱保护步骤确保实现糖链的精准合成。这不仅增加了合成过程的复杂性,还对合成策略和反应条件的优化提出了更高要求^[51]。尽管如此,目前已有多种化学合成策略用于HMOs的制备。在2'-FL的合成中,岩藻糖供体(1-S-phenyl供体)通过四步反应从商业L-岩藻糖制备,乳糖受体则经两步反应获得;最终通过糖苷化和去保护处理,2'-FL可达到千克级的制备规模^[52]。如图2所示,通过逆合成分析,Alexei V. Demchenko课题组选择了受保护的乳糖胺供体A1与区域选择性保护的乳糖受体A2作为关键中间体合成LNnT,并使用苄基作为保护基以避免乙酰基迁移产生副产物。通过筛选适当的离去基团,实现了以半乳糖三氯乙酰亚胺酯供体A3与葡萄糖胺受体A4高效偶联获得乳糖胺供体A1;通过正交保护的半乳糖供体A5与四苄基化葡萄糖4-OH受体A6偶联,再脱除Fmoc基团获得乳糖受体A2;最终采用收敛性2+2合成策略实现通过乳糖胺供体A1与乳糖受体A2合成LNnT^[53]。除此之外,多种线性HMOs例如LNT、LNFP I、3'-SL、*para*-lacto-N-neohexaose (pLNnH)、*para*-lacto-N-hexaose (pLNH)等均已实现化学法制备^[54-57]。

3.2 酶法合成

酶法合成具有环境友好、反应条件温和以及副产物少等优点,近年来酶法合成HMOs发展迅速,糖基转移酶(glycotransferase, GTs)和糖苷酶(glycosidase, GHs)是HMOs合成中常用的两类酶元件。糖基转移酶能够精确控制糖苷键的形成位点及空间构型,实现高区域选择性和立体选择性的糖苷化反应。目前用于HMOs合成的糖基转移酶主要分为: β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶

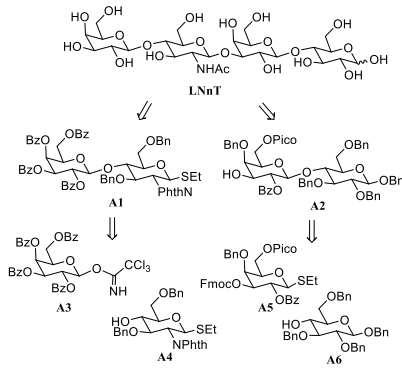


图2 LNT II的逆合成分析

Fig.2 Retrosynthesis analysis of LNT II

(β -N-acetylglucosaminyltransferases)、 β -半乳糖基转移酶 (β -galactosyltransferases)、 α -岩藻糖基转移酶 (α -fucosyltransferases) 和 α -唾液酸转移酶 (α -sialyltransferases) 等^[58-60]。CAZy 数据库中糖基转移酶分为 116 个不同的家族, 根据结构域的不同, 糖基转移酶分为 GT-A、GT-B 和 GT-C 三种类型, 其中 GT-A 和 GT-B 需使用糖核苷酸作为供体。GT-A 的活性位点通常具有保守的 DXD 基序 (天冬氨酸-任何残基-天冬氨酸), DXD 基序能够与协调酶催化活性所需的二价阳离子 (通常为 Mn^{2+} 或 Mg^{2+}) 结合^[61]。GT-B 缺乏 GT-A 中的保守 DXD 基序, 其催化活性不依赖 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 。GT-B 具有双结构域结构, 在蛋白 N 端和 C 端结构域之间具有深且灵活的间隙, 允许容纳更广泛的底物, 如多肽和脂质甚至聚糖。与 GT-B 相比, GT-A 通常具有为特定结构糖类或蛋白质底物量身定制的保守受体结合口袋。GT-C 糖基转移酶是具有多个跨膜结构域的膜蛋白, 主要利用脂质连接的糖作为供体, 受限于可溶性表达障碍以及糖基供体难以获得, 尚未能应用于 HMOs 的酶法合成^[62]。根据是否利用糖核苷酸作为糖基供体, 可将糖基转移酶分为 Leloir 型 GTs 和 non-Leloir 型 GTs。Leloir 型 GTs 能够利用糖核苷酸作为糖基供体, 参与糖链及糖缀合物的生物合成, 是 HMOs 酶法合成最常用的 GTs^[63]。Non-Leloir 型 GTs 则可利用磷酸活化的糖供体或非活化的糖供体 (如蔗糖、麦芽糖和淀粉等), 同时具有更广泛的受体底物灵活性, 在 HMOs 的酶法合成上具有良好的经济可行性。Mamoru Nishimoto 使用价格低廉的蔗糖和 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc), 通过蔗糖磷酸化酶生成葡

萄糖-1-磷酸 (Glc1P), 再利用 UDP-葡萄糖-己糖-1-磷酸尿苷转移酶 (GalT) 和 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶 (GalE) 将 Glc1P 转化为 Gal1P, 最后在糖磷酸化酶 GLNBP 的作用下合成 LNB, 在 10 L 规模成功制备了 1.7 千克 LNB 晶体, 纯度达到 99%^[64]。

糖苷酶同样能避免使用价格昂贵的糖核苷酸, 利用廉价的底物参与糖基化反应, 大大降低了 HMOs 酶法合成成本^[65]。 β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶 (β -N-acetylhexosaminidase)、 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)、唾液酸酶 (sialidases) 和 α -L-岩藻糖苷酶 (fucosidases) 都可用于 HMOs 的合成与修饰。如 *Tyzzrella nexilis* 来源的 β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶 TnHex189 能够利用 pNP-NAG 作为糖基供体, 以 57.2% 的转化率实现 4.7 g/L 的 Lacto-N-Triose II (LNT II) 高效合成; 进一步利用来源于 *Bacillus circulans* 的 β -半乳糖苷酶 BgaD-D, 以 Lactose 为糖基供体, 将 LNT II 转化为 LNT II, 展示了糖苷酶在食品工业领域的应用潜力^[66]。

3.3 全细胞生物催化

全细胞生物催化 (Whole-cell biocatalysis) 是一种新兴的生物技术, 它利用工程化的细胞作为微型反应器, 实现复杂分子的合成, 随着研究的深入, 全细胞生物催化在 HMOs 生产中的应用也得到了广泛关注^[6, 67]。为了构建稳定性强、高产的微生物细胞工厂, 基因表达调控通常涉及提高酶元件活性、优化代谢途径和减小代谢压力等环节^[68]。此外, 微生物细胞工厂还能够通过 ABC (ATP-binding cassette)^[69]、MFS (major facilitator superfamily)^[70]、PTS (PEP-dependent phosphotransferase system)^[71] 等转运系统将外源物质转运到细胞内用于代谢和目标化合物的合成, 并及时将代谢产物排出胞外, 避免代谢产物的过量积累, 减轻细胞的代谢负担, 确保代谢网络的平衡。以重组大肠杆菌生产 LNT II 和 LNT 为例, Tomotoshi Sugita 等人应用转运工程策略, 过表达转运蛋白基因 (*setA*、*setB*、*ydeA* 和 *mdfA*) 显著增加了胞外 LNT II 产量, 其中转运蛋白 SetA 在促进 LNT II 外排中表现出最优异的活性, LNT II 产量提高了 1.61 倍; 在 LNT 的生产中,

LNT II作为中间体, 敲除 *setA* 基因显著减少了胞外 LNT II 的积累, LNT 的产量从 2.19 g/L 提高至 2.96 g/L^[72]。受限于人源糖基转移酶 GCNT2 的重组表达, 分支 HMOs 的生物合成一直面临挑战。本课题组通过代谢工程改造大肠杆菌 SHuffle T7 实现了分支人乳寡糖 Lacto-*N*-neohexaose (LNnH) 的全细胞生物合成。通过设计并构建双质粒系统, 整合 LNnH 生物合成途径的关键基因, 实现了催化分支结构形成的关键酶 GCNT2 的可溶性表达, 利用 CRISPR/Cas9 敲除 *lacZ*、*nagB* 和 *wecB* 基因, 以调节乳糖和 UDP-GlcNAc 的代谢通量, 实现全细胞生物催化合成 LNnH。在 5 L 生物反应器中, LNnH 产量从摇瓶培养的 1.04 mg/L 显著提高至 173.21 mg/L, 增幅达到 166.5 倍^[73]。代谢工程和合成生物学技术的快速发展推动了全细胞生物催化合成 HMOs 的产业化进程, 目前, 中国国家卫生健康委员会批准作为食品营养强化剂应用于婴幼儿配方奶粉的两种代表性人乳寡糖 2'-FL 和 LNnT 全细胞生

物催化产量均已达到 100 g/L 以上^[74, 75], 3-FL^[76]、LNT^[77]、3'-SL^[78]、6'-SL^[79]、Difucosyllactose (DFL)^[80]、LNFP I^[81] 等 HMOs 均能在工程化大肠杆菌中高效生产 (表 1)。为了避免大肠杆菌作为底盘细胞可能带来的内毒素和噬菌体污染问题, 降低底盘细胞代谢负担, 提高发酵产率和降低成本, 酿酒酵母^[82]、毕赤酵母^[83]、枯草芽孢杆菌^[84] 和谷氨酸棒杆菌^[85] 等底盘细胞也被用于 HMOs 的全细胞生物催化合成。

4 人乳寡糖的体外生物转化 (ivBT)

体外生物转化 (ivBT) 是一种介于全细胞生物催化和酶法合成的新兴生物制造平台, 通过在无细胞体系中重构人工酶促反应网络, 实现对目标产物的定向合成^[103]。该技术整合天然酶、人工改造酶及辅酶再生系统, 突破了活细胞代谢调控 (如细胞周期限制、代谢通路竞争、产物毒性反馈

表 1 HMOs 主要合成方法对比

Table 1 Comparison of Major Synthesis Methods for HMOs

合成方法	产物	技术路线的特点	产量/产率	参考文献
酶法合成	3'-SL	酶工程改造 <i>Trypanosoma rangeli</i> sialidase, 以 CGMP 为糖基供体, 以乳糖为受体合成 3'-SL	31%	[86]
	6'-SL	<i>Bacteroides fragilis</i> sialidase 以多聚 <i>N</i> -乙酰基神经氨酸为糖基供体, 以乳糖为受体合成 6'-SL	22%	[87]
	2-FL	<i>Fusarium graminearum</i> fucosidase 以木葡聚糖为糖基供体, 以乳糖为受体合成 2-FL	14%	[88]
	3-FL	重组表达岩藻糖基转移酶 α 1,3-HpFucT, 以 GDP-Fucose 为糖基供体, 以乳糖为糖基受体催化合成 3-FL	96%	[89]
	LNFP I	重组表达岩藻糖基转移酶 α 1,2-Te2FT, 以一锅多酶合成的 GDP-Fucose 为糖基供体, 以 LNT 为糖基受体催化合成 LNFP I	95%	[90]
全细胞生物催化	LNnT	<i>E. coli</i> K12 MG1655 为工程菌, 敲除 <i>lacZ</i> 、 <i>wcaJ</i> 、 <i>ugd</i> ; 过表达 <i>galE</i> 、 <i>CpsIaJ</i> 、 <i>IgtA</i>	20.33 g/L	[91]
	3'-SL	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 为工程菌, 敲除 <i>lacZ</i> 、 <i>nanA</i> 、 <i>nanK</i> ; 过表达 <i>neuC</i> 、 <i>neuB</i> 、 <i>neuA</i> 、 α 2,3- <i>SiaT</i>	31.4 g/L	[92]
	6'-SL	<i>E. coli</i> DH1 为工程菌, 敲除 <i>lacZ</i> 、 <i>lacA</i> 、 <i>nanK</i> 、 <i>nanE</i> 、 <i>nanT</i> 、 <i>nanA</i> ; 过表达 <i>neuB</i> 、 <i>neuC</i> 、 <i>neuA</i> 、 <i>ST6</i>	30 g/L	[93]
	2'-FL	<i>E. coli</i> C41 (DE3) 为工程菌, 敲除 <i>lacZ</i> 、 <i>wcaJ</i> 、 <i>nudD</i> ; 过表达 <i>manB</i> 、 <i>manC</i> 、 <i>gmd</i> 、 <i>wcaG</i> 、 <i>wbgL</i> 、 <i>rcaA</i> 、 <i>rcaB</i>	79.23 g/L	[94]
ivBT	LacNAc	构建多磷酸激酶 (PPK)/多磷酸盐 (polyP _n) 的 NTP 再生催化系统	>90%	[95]
	LNT II	筛选新型酶元件 HaHex74 并进行酶元件定向进化和改造	15.0 g/L	[96]
	LNT	筛选新型 β -半乳糖苷酶 LzBgal35A 并在 <i>E. coli</i> 中实现可溶性表达	6.4 g/L	[97]
	LNnT	多酶级联催化反应体系	93%	[98]
	6'-SL	多层级多孔材料用于共固定化 CMP-唾液酸合成酶和 α -2,6-唾液酸转移酶	>80%	[99]
	DSLNNnT	多酶级联催化反应体系	96%	[100]
	2'-FL	体外多酶级联催化实现 ATP 和 GTP 的循环利用; 筛选高效的 α -1,2-岩藻糖基转移酶 TeFucT	27.07 g/L	[101]
	LNFP I	新型酶元件的筛选	91%	[102]

抑制)、生物能量供给(ATP/NADPH再生效率)及底物转运屏障的限制,在大宗生化产品制造中展现出独特优势^[104]。

相对于传统的酶法合成和全细胞生物催化,ivBT系统的显著技术优势体现在三个维度:(1)反应网络的精准可控性,通过模块化组装糖基转移酶、磷酸化酶、异构酶等功能酶组件,可灵活设计非天然酶促反应路径;(2)产物分离的高便捷性,无细胞体系避免了菌体碎片、细胞代谢副产物的干扰,显著降低下游纯化成本;(3)环境友好与可持续性,反应条件温和(pH 6.0-8.5,温度 25-40 °C),可通过酶固定化技术实现催化剂重复利用,配合微流控反应器可精准控制传质效率,时空产率较传统方法显著提升^[7]。

随着多种HMOs陆续通过审批,其在婴幼儿配方奶粉等领域的应用前景广阔,市场潜力巨大。ivBT技术在大宗产品生产展现出反应条件温和、可避免细胞代谢限制、产物分离纯化简便等的独特优势,吸引了众多科学家将其应用于HMOs的生产(表1)。目前,利用ivBT技术合成HMOs已取得一系列重要突破,在新型酶元件的挖掘、酶工程改造、辅酶再生系统优化以及反应体系设计等方面均实现跨越式进展,为HMOs的大规模生产奠定了坚实基础。

4.1 体外多酶催化路径构建

利用GTs进行ivBT合成HMOs具有良好的底物特异性和立体选择性,然而GTs通常依赖价格昂贵的糖核苷酸作为供体,极大限制了ivBT技术在HMOs合成领域的产业化应用。开发经济高效的方法以保障反应所需糖核苷酸供体底物的稳定供应是利用糖基转移酶合成HMOs的关键^[105]。使用多种酶在同一体系级联催化的一锅多酶反应(One-Pot Multienzyme, OPME)技术成为了一种降低成本的手段。乳糖或HMOs的每一步延伸和修饰都可以通过整合糖核苷酸的酶法级联合成以及糖基转移酶催化反应的OPME模块实现。包含Hp2FucT和GDP-Fuc模块的OPME系统可以高效合成2'-FL^[101];结合CMP-Neu5Ac多酶合成和唾液酸糖基转移酶PmST1^[106]或Pd2,6ST^[107]的OPME

模块已被应用于唾液化乳糖3'-SL或6'-SL的合成。

糖核苷酸的酶法级联合成需要消耗大量价格昂贵的核苷三磷酸(NTP),是限制糖基转移酶在HMOs大规模合成中应用的另一限制因素,科学家针对NTP的循环再生开展了大量研究,以进一步降低ivBT在HMOs合成中的成本。*N*-乙酰乳糖胺(LacNAc)是生物合成HMOs的重要中间体,杜显光团队建立了包含多磷酸激酶/多磷酸盐的NTP再生系统,实现了LacNAc酶法合成中三磷酸腺苷(ATP)和尿苷-5'-三磷酸(UTP)的再生,在100 mM的底物浓度下,LacNAc收率达到90%以上,5 L反应器中进行了放大生产,最终得到138.6 g的LacNAc^[95]。如图3所示,在此基础上,利用多酶级联低成本合成的LacNAc为前体,以唾液酸为原料,引入胞苷单磷酸激酶(CMK)和多聚磷酸激酶3(PPK3),在polyP₆的存在下构建CTP再生循环。整合CMP-Neu5Ac合成酶(CSS)、焦磷酸酶(PPA)、 α -2,3/6-唾液酸转移酶,在5 L规模下分别以96.1%和92.3%的收率获得259.2 g 6'-唾液酸化-*N*-乙酰乳糖胺(6'-SLN)和248.7 g 3'-唾液酸化-*N*-乙酰乳糖胺(3'-SLN)^[108]。

4.2 酶元件的挖掘与理性设计

提高HMOs合成相关酶元件的可溶性表达水平及进行稳定性改造,是降低生产成本的关键策略。同时,针对不同类型酶元件进行理性设计时,需考虑其独特的催化特性。GTs在HMOs合成中通常表现出较高的转化率和较强的底物特异性,但其反应效率相对较低。因此,当前研究重点主要集中于提升糖基转移酶的酶活性和拓展其底物谱。相对而言,GHs虽具有更高的反应效率和更广泛的底物谱,但其催化过程中常伴随水解反应,导致底物转化率受限。针对这一问题,大量研究致力于抑制糖苷酶的水解活性,以期显著提高底物转化率。这两种酶的不同特性及其相应的优化方向,共同构成了HMOs酶法合成研究中酶工程改造的核心内容。

野生型幽门螺杆菌 α 1,3-岩藻糖基转移酶可溶性表达差,用于3-FL合成时催化效率较低。Choi等人通过删除 α 1,3-岩藻糖基转移酶C端52个残基

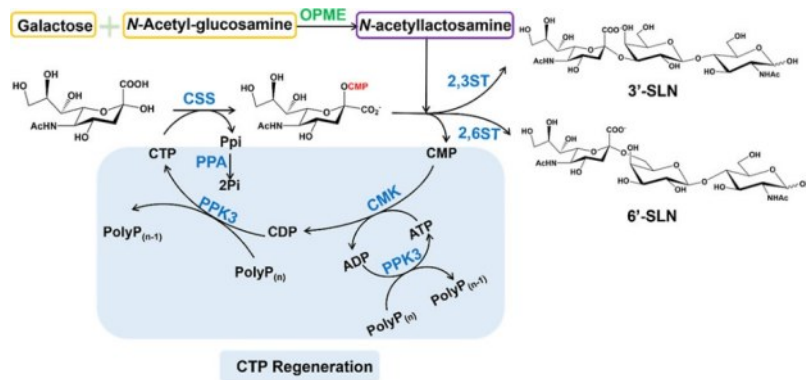


图3 一锅两步多酶法合成6'/3'-唾液酸化乳糖^[108]

Fig.3 One-Pot Two-Step Multi-Enzymatic Synthesis of 6'/3'-Sialyllactosamine^[108]

并整合迭代饱和诱变策略，显著提高了在大肠杆菌体系中的表达水平，3-FL产率提高了18倍以上^[89]。Birgitte Zeuner利用分子对接技术筛选得到5种 α -1,3/4-岩藻糖苷酶，能够催化LNT和3-FL经转糖基化反应生成Lacto-*N*-Fucopentaose II (LNFP II)，其中SpGH29C和CpAfc2酶催化合成LNFP II的产量分别达到91%和65%，是迄今为止报道的最高LNFP II产量^[102]。为了提高幽门螺杆菌 α 1,3-岩藻糖基转移酶合成3-FL的催化效率，谭玉萌等人设计了基于荧光激活细胞分选的定向进化筛选系统。利用乳糖渗透酶LacY可以转运荧光标记乳糖而无法转运荧光标记3-FL的特性，根据 α 1,3-岩藻糖基转移酶催化造成细胞内荧光强度增高的特点，通过荧光激活细胞分选高效地从大量突变体库中筛选具有高催化活性的酶突变体。该研究整合易错PCR、有序重组诱变(ORM)、组合活性位点饱和以及流式细胞仪筛选，获得了最佳的7位点突变体，3-FL合成催化效率提高了14倍^[109]。

挖掘并筛选具有高立体选择性的新型GHs，可以避免利用价格昂贵的糖核苷酸，降低ivBT合成HMOs的成本。2023年，杨绍青团队从*Haloferula sp*中鉴定了一种具有较高催化活性的 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶HaHex74。通过定向进化和位点饱和诱变进行酶元件改造，在5 L反应器中进行三酶级联反应，实现了以价格低廉的几丁质为原料合成LNT II和LNnT，产量分别达到15 g/L和9 g/L^[96]。李婷等人报道了一种新的 β -半乳糖苷酶(LzBgal35A)，以邻硝基苯基- β -半乳糖吡喃糖苷为供体底物，将半乳糖转化到LNT II催化合成LNT，2 h内转化率达到45.4%，产量为6.4 g/L，是迄今

为止通过 β -半乳糖苷酶介导的转糖基化反应合成LNT的最高收率^[97]。

4.3 反应器设计与优化

反应器设计与优化是确保高效、经济且可持续生产的关键环节。精准控制反应环境、提升传质效率、解决放大难题及降低综合成本，是利用ivBT合成HMOs规模化放大的核心^[110]。酶固定化技术是一种成熟而广泛应用的技术，能大大提高酶的稳定性和回收率。李建军等人开发了图4所示的层级多孔材料MIL-53用于共固定化CMP-唾液酸合成酶(NmCSS)和 α -2,6-唾液酸转移酶(Pd2, 6ST)，级联生物反应器展现了高酶载量、高催化效率和出色的酶稳定性。固定化酶经过13次循环使用后，6'-SL的产率仍然保持在80%以上^[99]。此外，酶固定化可能会改变酶的催化活性、特异性或选择性。双歧杆菌 β -*N*-乙酰氨基己糖苷酶可以利用*N*-乙酰氨基葡萄糖恶唑啉(GlcNAc-oxa)和乳糖合成LNT II，研究发现，当采用Cu²⁺-琼脂糖对酶进行固定化后，固定化酶活性达到了游离酶活性的2倍^[111]。

自动化合成使非专业人员能够轻松制备多肽和寡核苷酸序列，推动了蛋白质组学和基因组学革命。自动化合成技术在复杂生物分子合成上展现的可编程性以及易于操作的优势，促使研究人员开发了多种寡糖或聚糖的自动化化学合成平台，但依赖于化学法的自动化合成通常需要繁琐的全局脱保护步骤，并且缺乏通用的化学糖基化方案。基于ivBT策略进行复杂寡糖组装的自动化合成平

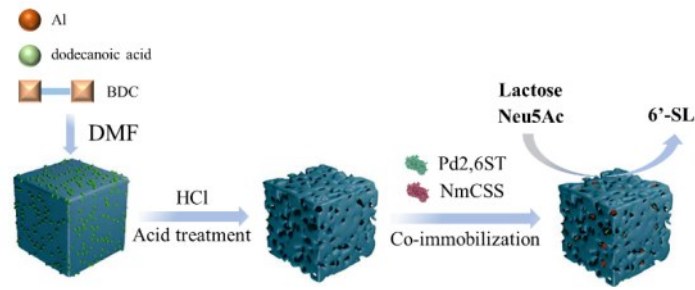


图4 双酶固定化MIL-53高效合成6'-SL

Fig.4 Co-immobilized Dual-Enzyme in MIL-53 for Efficient 6'-SL Synthesis

台能够避免繁琐、耗时的合成中间体纯化流程，成为化学法自动化合成寡糖的有效替代方案。数字微流控（DMF）平台在复杂结构HMOs的酶促合成上具有良好的应用潜力，李建军等人将基于磁珠的自动化控制与模块化化学酶促合成相结合，成功在DMF平台上实现了11种HMOs的化学酶促模块化顺序合成（图5），其中2'-FL产率达到63%，6'-SL总产率达90%以上^[112]。

李铁海等人开发了一种基于捕获-释放策略的寡糖自动化合成平台，使用磺酸盐标签实现高效固相萃取和产物释放，无需冻干或缓冲液置换，最多可自动进行15个反应循环。该自动化合成平台适用于多聚-N-乙酰乳糖胺（poly-LacNAc）、HMOs等多种复杂结构寡糖的高效制备，大大加快了聚糖组装速度，减少了纯化步骤。如图6所示，利用此平台，以标记的乳糖**9**为起始物，通过B3GNT2和B4GalT1催化的反应循环，将其延伸为四糖**11**；进一步使用GCNT2引入分支，形成双天线聚糖**12**；用ST6Gal1将 β 3-天线末端半乳糖苷修饰为唾液酸得到**13**；随后使用B4GalT1和FUT5的反应循环，合成了 β 6-天线具有Lewis^x表位的**15**，每个酶促步骤的平均收率达到85%以上。采用类似策略，实现了 β 6-天线具有Lewis^y表位的**19**的高

效合成，每个酶促步骤平均收率为82%^[113]。

5 总结和展望

HMOs作为母乳中关键的生物活性成分，在婴幼儿肠道菌群建立、免疫防御、神经发育等方面展现出不可替代的功能特性。随着商业化应用范围从婴幼儿配方奶粉逐步扩展至功能性食品和医疗营养领域，HMOs的高效、低成本规模化生产成为学术界与产业界共同关注的焦点。化学合成、酶法合成和全细胞合成等传统合成方法虽取得一定进展，但仍面临成本高、副产物干扰及下游纯化复杂等瓶颈。ivBT技术结合了酶催化 and 微生物发酵的优势，能够在细胞外环境中实现高效的生物合成；近年来，该技术凭借其精准可控的反应网络、简化的产物分离流程以及环境友好特性，为HMOs的工业化生产开辟了新路径。

ivBT技术通过模块化酶系统的设计与辅酶再生策略的优化以及高性能反应器的研发，显著提升HMOs的合成效率并降低了转化成本。通过体外多酶催化路径构建，整合一锅多酶体系与糖核苷酸再生系统，有效降低了糖基转移酶对昂贵供

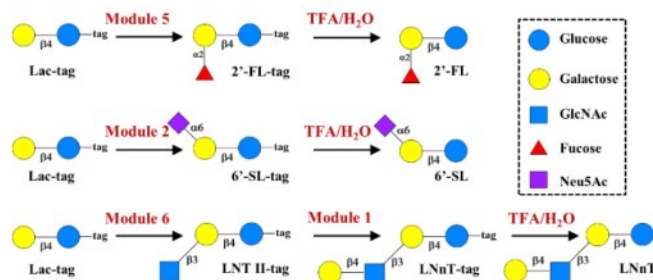


图5 基于数字微流控平台化学酶法模块化自动合成HMOs

Fig.5 Automated chemoenzymatic modular synthesis of HMOs on a digital microfluidic platform

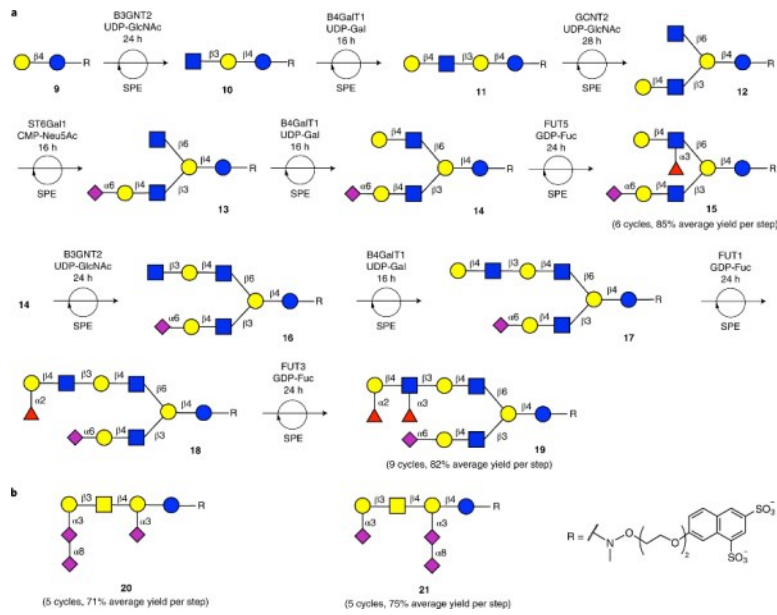


图6 HMOs和神经节苷脂的自动合成^[113]

Fig.6 Automated synthesis of HMOs and gangliosides^[113]

体的依赖，显著提高了HMOs生产的经济可行性。酶元件的理性设计和定向进化技术结合高通量筛选手段，极大提高了酶的异源表达水平、稳定性及催化活性。开展反应器设计与优化，通过精准控制反应环境、提升传质效率、解决放大难题及降低综合成本，最终打通HMOs高效、经济且可持续生产的关键环节。

然而，ivBT技术在HMOs产业化应用上仍面临多重挑战：

其一，原料成本与可持续性尚未完全解决，目前，HMOs的ivBT合成通常依赖于昂贵的糖核苷酸作为糖基供体，导致HMOs的生产成本居高不下，建立以可再生底物（如甲壳素、木质纤维素）为替代糖基供体的高效转化路径将成为降低生产成本的关键方向。现有知识库的局限性使得很多目标产物的相关酶和代谢途径仍然未知，随着生物大数据（如基因组、蛋白质组、代谢组数据）的爆炸式增长，人工智能（AI）在人工合成途径设计中的应用日益突出，利用AI算法分析复杂代谢途径，识别关键限速步骤，提出新的HMOs人工合成途径并预测效果，对于发现和利用现有知识库中未知的HMOs合成途径至关重要。

其二，酶的经济可行性和可用性是需要解决的关键障碍。参与HMOs合成的糖基转移酶在异

源系统中往往表达效率低、稳定性差，在工业生产条件如高温、极端pH值等条件下容易变性，限制了其在大规模生产中的应用。另外，酶的固有选择性意味着虽然可以高效地生产特定的HMOs，但在结构上的灵活性不如化学合成。例如用于合成分支HMOs的糖基转移酶GCNT2以LNnT为糖基受体时具有良好的转糖基活性，以LNT为受体时催化效率则显著下降。目前，尚未有研究筛选获得GCNT2的同工酶以拓宽其底物谱，这使得针对分支HMOs的酶法合成面临巨大挑战。因此，针对复杂结构HMOs的合成，仍需通过理性设计、定向进化及人工智能辅助预测，开发兼具高活性、高稳定性的新型糖基转移酶或糖苷酶，拓宽底物谱并减少副反应。

其三，规模化反应器的传质与转化效率是亟待解决的关键技术瓶颈。尽管实验室规模反应器已成功实现多种HMOs的合成，但将此技术有效放大至工业化生产规模仍面临挑战。现有研究虽已关注到规模放大过程中诸如酶失活、底物浓度分布不均等突出问题，但未来的研究应进一步深化，并着重整合在线监测系统以及膜反应器系统等先进手段。通过应用这些技术，有望实现酶的动态组装与局域化富集，显著提高反应区域的底物浓度及酶的催化效率。同时，膜反应器系统等

技术的引入, 能够促进产物的连续分离, 在此基础上整合高值底物(如NTP)的反应器内循环再生, 为HMOs基于规模化反应器ivBT生产的动态过程调控与资源循环利用奠定基础, 进而提升整体生产效率和经济效益。

综上所述, ivBT技术由于其反应网络可控性、产物纯度及环境友好等方面的优势, 有望取代传统合成方法成为下一代生物制造的核心平台, 为HMOs的规模化生产提供兼具高效性与可持续性的解决方案。未来, 随着关键技术的持续突破与产业链的协同创新, 酶催化效率、底物经济性及规模化生产等ivBT技术瓶颈将逐步突破, ivBT将引领HMOs制造进入工业化新时代, 为全球婴幼儿营养健康与功能性食品开发注入新动能。

参 考 文 献

- [1] AUTRAN C A, KELLMAN B P, KIM J H, et al. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants [J]. *Gut*, 2018, 67: 1064-70.
- [2] DINLEYICI M, BARBIEUR J, DINLEYICI E C, et al. Functional effects of human milk oligosaccharides (HMOs) [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2186115.
- [3] ESTORNINOS E, LAWENKO R B, PALESTROQUE E, et al. Term infant formula supplemented with milk-derived oligosaccharides shifts the gut microbiota closer to that of human milk-fed infants and improves intestinal immune defense: a randomized controlled trial [J]. *The American journal of clinical nutrition*, 2022, 115(1): 142-53.
- [4] AKKERMAN R, FAAS M M, DE VOS P. Non-digestible carbohydrates in infant formula as substitution for human milk oligosaccharide functions: Effects on microbiota and gut maturation [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(9): 1486-97.
- [5] WALKER A. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients [J]. *The Journal of Pediatrics*, 2010, 156(2, Suppl): S3-S7.
- [6] ZHU Y Y, CAO H Z, 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.
- [7] ZHANG Y H, ZHU Z G, YOU C, et al. In Vitro BioTransformation (ivBT): Definitions, Opportunities, and Challenges [J]. *Synthetic Biology and Engineering*, 2023, 1(2): 10013.
- [8] CHEN X. Human Milk Oligosaccharides (HMOs): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis [J]. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2015, 72: 113-90.
- [9] JIN W J, LU Y, LI C, et al. Improved Glycoqueuing Strategy Reveals Novel α 2,3-Linked Di-/Tri-Sialylated Oligosaccharide Isomers in Human Milk [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(43): 13996-4004.
- [10] WU S, TAO N, GERMAN J B, et al. Development of an Annotated Library of Neutral Human Milk Oligosaccharides [J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(8): 4138-51.
- [11] BODE L. Human Milk Oligosaccharides: Structure and Functions [J]. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 2020, 94: 115-23.
- [12] NATHAN N N, PHILPOTT D J, GIRARDIN S E. The intestinal microbiota: from health to disease, and back [J]. *Microbes Infect*, 2021, 23(6-7): 104849.
- [13] GOEHRING K C, KENNEDY A D, PRIETO P A, et al. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101692.
- [14] DOTZ V, RUDLOFF S, MEYER C, et al. Metabolic fate of neutral human milk oligosaccharides in exclusively breast-fed infants [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59(2): 355-64.
- [15] LIU Z M, SUBBARAJ A, FRASER K, et al. Human milk and infant formula differentially alters the microbiota composition and functional gene relative abundance in the small and large intestines in weanling rats [J]. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(5): 2131-43.
- [16] UNDERWOOD M A, GAERLAN S, DE LEOZ M L, et al. Human milk oligosaccharides in premature infants: absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota [J]. *Pediatric research*, 2015, 78(6): 670-7.
- [17] KITAOKA M. *Bifidobacterial* enzymes involved in the metabolism of human milk oligosaccharides [J]. *Advances in Nutrition*, 2012, 3(3): 422S-9S.
- [18] SINGH R P, NIHARIKA J, KONDEPUDI K K, et al. Recent understanding of human milk oligosaccharides in establishing infant gut microbiome and roles in immune system [J]. *Food Research International*, 2022, 151: 110884.
- [19] XIAO L, VAN DE WORP W R, STASSEN R, et al. Human milk oligosaccharides promote immune tolerance via direct interactions with human dendritic cells [J]. *European Journal of Immunology* 2019, 49(7): 1001-14.
- [20] KURAKEVICH E, HENNET T, HAUSMANN M, et al. Milk oligosaccharide sialyl(α 2,3)lactose activates intestinal CD11c⁺ cells through TLR4 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(43): 17444-9.
- [21] VERMA R, LEE C, JEUN E J, et al. Cell surface polysaccharides of *Bifidobacterium bifidum* induce the

- generation of Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Science Immunology*, 2018, 3(28): eaat6975.
- [22] GUO S S, GILLINGHAM T, GUO Y M, et al. Secretions of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* Protect Intestinal Epithelial Barrier Function [J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2017, 64(3): 404-12.
- [23] CHUTIPONGTANATE S, MORROW A L, NEWBURG D S. Human Milk Oligosaccharides: Potential Applications in COVID-19 [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 346.
- [24] COSTERTON J W, IRVIN R T, CHENG K J. The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1981, 35: 299-324.
- [25] RUIZ-PALACIOS G M, CERVANTES L E, RAMOS P, et al. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278(16): 14112-20.
- [26] YU Z T, NANTHAKUMAR N N, NEWBURG D S. The Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose Quenches *Campylobacter jejuni*-Induced Inflammation in Human Epithelial Cells HEp-2 and HT-29 and in Mouse Intestinal Mucosa [J]. *The Journal of nutrition*, 2016, 146(10): 1980-90.
- [27] COPPA G V, ZAMPINI L, GALEAZZI T, et al. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella ftyris* [J]. *Pediatric research*, 2006, 59(3): 377-82.
- [28] RAMANI S, STEWART C J, LAUCIRICA D R, et al. Human milk oligosaccharides, milk microbiome and infant gut microbiome modulate neonatal rotavirus infection [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5010.
- [29] KOROMYSLOVA A, TRIPATHI S, MOROZOV V, et al. Human norovirus inhibition by a human milk oligosaccharide [J]. *Virology*, 2017, 508: 81-9.
- [30] LAUCIRICA D R, TRIANTIS V, SCHOEMAKER R, et al. Milk Oligosaccharides Inhibit Human Rotavirus Infectivity in MA104 Cells [J]. *The Journal of nutrition*, 2017, 147(9): 1709-14.
- [31] HANISCH F G, HANSMAN G S, MOROZOV V, et al. Avidity of α -fucose on human milk oligosaccharides and blood group-unrelated oligo/polyfucoses is essential for potent norovirus-binding targets [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2018, 293(30): 11955 - 65.
- [32] CARR L E, VIRMANI M D, ROSA F, et al. Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 604080.
- [33] HOLSCHER H D, DAVIS S R, TAPPENDEN K A. Human milk oligosaccharides influence maturation of human intestinal Caco-2Bbe and HT-29 cell lines [J]. *The Journal of nutrition*, 2014, 144(5): 586-91.
- [34] KONG C L, ELDERMAN M, CHENG L H, 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.
- [35] CHICHLAWSKI M, DE LARTIGUE G, GERMAN J B, et al. *Bifidobacteria* isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function [J]. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2012, 55(3): 321-7.
- [36] LIU F, SIMPSON A B, D'COSTA E, et al. Sialic acid, the secret gift for the brain [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 63(29): 9875-94.
- [37] COMSTOCK S S, LI M, WANG M, et al. Dietary Human Milk Oligosaccharides but Not Prebiotic Oligosaccharides Increase Circulating Natural Killer Cell and Mesenteric Lymph Node Memory T Cell Populations in Noninfected and Rotavirus-Infected Neonatal Piglets [J]. *The Journal of nutrition*, 2017, 147(6): 1041-7.
- [38] PISA E, MARTIRE A, CHIODI V, et al. Exposure to 3'Sialyllactose-Poor Milk during Lactation Impairs Cognitive Capabilities in Adulthood [J]. *Nutrients*, 2021, 13(12): 4191-211.
- [39] OLIVEROS E, VAZQUEZ E, BARRANCO A, et al. Sialic Acid and Sialylated Oligosaccharide Supplementation during Lactation Improves Learning and Memory in Rats [J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1519.
- [40] BERGER P K, ONG M L, BODE L, et al. Human Milk Oligosaccharides and Infant Neurodevelopment: A Narrative Review [J]. *Nutrients*, 2023, 15(3): 719.
- [41] WILLEMSSEN Y, BEIJERS R, GU F J, et al. Fucosylated Human Milk Oligosaccharides during the First 12 Postnatal Weeks Are Associated with Better Executive Functions in Toddlers [J]. *Nutrients*, 2023, 15(6): 1463.
- [42] OLIVEROS E, RAMIREZ M, VAZQUEZ E, et al. Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 31: 20-7.
- [43] EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS N A A. Safety of 2'-O - fucosyllactose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) No 258/97 [J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(7): 4184.
- [44] EFSA PANEL ON NUTRITION N F, FOOD A, TURCK D, et al. Safety of 3-FL (3-Fucosyllactose) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal*, 2021, 19(6): 6662.
- [45] EFSA PANEL ON NUTRITION N F, FOOD A, TURCK D, et al. Safety of lacto-N-tetraose (LNT) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal*, 2019, 17(12): 5907.

- [46] EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS N, ALLERGIES. Safety of lacto-N-neotetraose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) No 258/97 [J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(7): 4183.
- [47] EFSA PANEL ON NUTRITION N F, FOOD A, TURCK D, et al. Safety of 3'-Sialyllactose (3'-SL) sodium salt as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal*, 2020, 18(5): 6098.
- [48] EFSA PANEL ON NUTRITION N F, FOOD A, TURCK D, et al. Safety of 6'-Sialyllactose (6'-SL) sodium salt as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal*, 2020, 18(5): 6097.
- [49] EFSA PANEL ON NUTRITION N F, FOOD A, TURCK D, et al. Safety of 2'-fucosyllactose/difucosyllactose mixture as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal*, 2019, 17(6): 5717.
- [50] TURCK D, BOHN T, CASTENMILLER J, et al. Safety of lacto-N-fucopentaose 1/2'-fucosyllactose (LNFP-1/2'-FL) mixture as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 [J]. *EFSA Journal*, 2023, 21(12): 8412.
- [51] WANG S Y, YANG Y, ZHU Q, et al. Chemical synthesis of polysaccharides [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2022, 69: 102154.
- [52] AGOSTON K, HEDEROS M J, BAJZA I, et al. Kilogram scale chemical synthesis of 2'-fucosyllactose [J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 476: 71-7.
- [53] BANDARA M D, STINE K J, DEMCHENKO A V. The chemical synthesis of human milk oligosaccharides: Lacto-N-neotetraose (Galbeta1-->4GlcNAc beta1-->3Galbeta1-->4Glc) [J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 483: 107743.
- [54] ESPOSITO D, HUREVICH M, CASTAGNER B, et al. Automated synthesis of sialylated oligosaccharides [J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2012, 8: 1601-9.
- [55] ARBOE JENNUM C, HAUCH FENGER T, BRUUN L M, et al. One-Pot Glycosylations in the Synthesis of Human Milk Oligosaccharides [J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014, 2014(15): 3232-41.
- [56] XU L L, TOWNSEND S D. Synthesis as an Expanding Resource in Human Milk Science [J]. *Journal of the American Chemical Society* 2021, 143(30): 11277-90.
- [57] SINGH Y, ESCOPY S, SHADRICK M, et al. Chemical Synthesis of Human Milk Oligosaccharides: para-Lacto-N-hexaose and para-Lacto-N-neohexaose [J]. *Chemistry*, 2023, 29(64): e202302288.
- [58] ZHAO M L, ZHU Y 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): 12390-402.
- [59] ZHENG J, XU H, FANG J Q, et al. Enzymatic and chemoenzymatic synthesis of human milk oligosaccharides and derivatives [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 291: 119564.
- [60] MA S Z, GAO J H, TIAN Y P, et al. Recent progress in chemoenzymatic synthesis of human glycans [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2024, 22(38): 7767-85.
- [61] TAUJALE R, VENKAT A, HUANG L-C, et al. Deep evolutionary analysis reveals the design principles of fold A glycosyltransferases [J]. *eLife*, 2020, 9: e54532.
- [62] BAI L, LI H. Protein N-glycosylation and O-mannosylation are catalyzed by two evolutionarily related GT-C glycosyltransferases [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2021, 68: 66-73.
- [63] PEREZ C, SZYMANSKI C M. More than one way to add a sugar into bacterial polysaccharides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2024, 121(25): e2408556121
- [64] NISHIMOTO M. Large scale production of lacto-N-biose I, a building block of type I human milk oligosaccharides, using sugar phosphorylases [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(1): 17-24.
- [65] NEKVASILOVÁ P, HOVORKOVÁ M, MÉSZÁROS Z, et al. Engineered Glycosidases for the Synthesis of Analogs of Human Milk Oligosaccharides [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(8): 4106.
- [66] LIU Y H, WANG L, HUANG P, et al. Efficient sequential synthesis of lacto-N-triose II and lacto-N-neotetraose by a novel beta-N-acetylhexosaminidase from *Tyzzerella nexilis* [J]. *Food Chemistry*, 2020, 332: 127438.
- [67] BENSIMON J, LU X N. Human milk oligosaccharides produced by synthetic biology [J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2024, 18: 101361.
- [68] TENG Y X, JIANG T, YAN Y J. The expanded CRISPR toolbox for constructing microbial cell factories [J]. *Trends in Biotechnology*, 2024, 42(1): 104-18.
- [69] GUPTA R, GUPTA N, SHARMA R. ABC Transporters and Group Translocation [M]. *Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism*. Springer Singapore. 2021: 209-33.
- [70] DREW D, NORTH R A, NAGARATHINAM K, et al. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS) [J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(9): 5289-335.
- [71] JECKELMANN J M, ERNI B. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria [J]. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 2020, 472(9): 1129-53.
- [72] 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): 5106-14.
- [73] 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): 17814-23.
- [74] 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): 441-52.
- [75] 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): 5325-38.
- [76] HUANG H Y, YU W W, XU X H, et al. Combinatorial Engineering of *Escherichia coli* for Enhancing 3-Fucosyllactose Production [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(6): 1866-78.
- [77] 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(Pt 1): 137987.
- [78] LI C C, LI M L, HU M M, et al. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for High-Titer Biosynthesis of 3'-Sialyllactose [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(10): 5379-90.
- [79] LIU Y L, QIAO L P, YU L M, et al. Highly efficient biosynthesis of 6'-sialyllactose in a metabolically engineered plasmid-free *Escherichia coli* using a novel α 2,6-sialyltransferase from *Nicoletella semolina* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 284: 138151.
- [80] LIANG S Q, QUAN Q, LIU D, et al. Regulation of Metabolic Pathways to Enhance Difucosyllactose Biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(1): 727-34.
- [81] LI Z Y, ZHU Y Y, HUANG Z L, et al. Engineering *Escherichia coli* for high-level production of lacto-N-fucopentaose I by stepwise de novo pathway construction [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 315: 121028.
- [82] XU M Y, MENG X F, ZHANG W X, et al. Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a putative α -1, 2-fucosyltransferase from *Bacillus cereus* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 165-78.
- [83] LI Y, WANG X, CHEN K D, et al. Efficient production of 2'-fucosyllactose in *Pichia pastoris* through metabolic engineering and constructing an orthogonal energy supply system [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2025, 10(3): 807-15.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] JERS C, MICHALAK M, LARSEN D M, et al. Rational design of a new *Trypanosoma rangeli* trans-sialidase for efficient sialylation of glycans [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e83902.
- [87] GUO L C, CHEN X D, XU L, et al. Enzymatic Synthesis of 6'-Sialyllactose, a Dominant Sialylated Human Milk Oligosaccharide, by a Novel α -Sialidase from *Bacteroides fragilis* NCTC9343 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(13): e00071-18.
- [88] ZEUNER B, MUSCHIOLO J, HOLCK J, et al. Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29 α -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 41: 34-45.
- [89] CHOI Y H, KIM J H, PARK B S, et al. Solubilization and Iterative Saturation Mutagenesis of α 1, 3-fucosyltransferase from *Helicobacter pylori* to enhance its catalytic efficiency [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(8): 1666-75.
- [90] ZHAO C, WU Y J, YU H, et al. The one-pot multienzyme (OPME) synthesis of human blood group H antigens and a human milk oligosaccharide (HMOS) with highly active *Thermosynechococcus elongatus* α 1-2-fucosyltransferase [J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(20): 3899-902.
- [91] 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): 7179-86.
- [92] ZHANG J M, ZHU Y Y, ZHANG W L, et al. Efficient Production of a Functional Human Milk Oligosaccharide 3'-Sialyllactose in Genetically Engineered *Escherichia coli* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(8): 2837-45.
- [93] DROUILLARD S, MINE T, KAJIWARA H, et al. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 [J]. *Carbohydrate Research*, 2010, 345(10): 1394-9.
- [94] LIU Y L, ZHU Y Y, WAN L, et al. High-Level De Novo Biosynthesis of 2'-Fucosyllactose by Metabolically Engineered *Escherichia coli* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(29): 9017-25.
- [95] JIAO R, ZHANG L, YOU R, et al. Efficient and Cost-Effective Synthesis of N-Acetylglucosamine by Sequential Modular Enzymatic Cascade Reactions Involving NTP Regeneration [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 2024, 72(50): 28060-71.
- [96] LIU Y H, YAN Q J, MA J W, et al. Directed evolution of a beta-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.
- [97] LI T, LI J, YAN Q J, et al. Biochemical characterization of a novel beta-galactosidase from *Lacticaseibacillus zeae* and its application in synthesis of lacto-N-tetraose [J]. *Journal of Dairy Science*, 2023, 106(10): 6623-34.
- [98] 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): 7689-92.
- [99] PENG X, PEI C X, QIAN E W, et al. Co-immobilization of a bi-enzymatic cascade into hierarchically porous MIL-53 for efficient 6'-sialyllactose production [J]. *Nanoscale*, 2024, 16(31): 14932-9.
- [100] YU H, YAN X B, AUTRAN C A, et al. Enzymatic and Chemoenzymatic Syntheses of Disialyl Glycans and Their Necrotizing Enterocolitis Preventing Effects [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2017, 82(24): 13152-60.
- [101] 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): 10763-71.
- [102] YANG Y Y, THORHALLSSON A T, ROVIRA C, et al. Improved Enzymatic Production of the Fucosylated Human Milk Oligosaccharide LNFP II with GH29B alpha-1, 3/4-l-Fucosidases [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(19): 11013-28.
- [103] ZHANG Y H. Production of biofuels and biochemicals by in vitro synthetic biosystems: Opportunities and challenges [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1467-83.
- [104] ZHANG Y H P, SUN J B, MA Y H. Biomanufacturing: history and perspective [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, 44(4-5): 773-84.
- [105] MENG J W, ZHU Y 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): 2234-43.
- [106] YU H, CHOKHAWALA H, KARPEL R, et al. A Multifunctional *Pasteurella multocida* Sialyltransferase: A Powerful Tool for the Synthesis of Sialoside Libraries [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(50): 17618-9.
- [107] XU Y Y, FAN Y Y, YE J F, et al. Successfully Engineering a Bacterial Sialyltransferase for Regioselective α 2, 6-sialylation [J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(8): 7222-7.
- [108] JIAO R M, PENG X, WANG B, et al. Highly Efficient and Economical One-Pot Two-Step Multienzymatic Synthesis of 6'/3'-Sialyllactosamine from In Situ-Produced N-Acetyllactosamine [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(23): 14444-52.
- [109] TAN Y M, ZHANG Y, HAN Y B, et al. Directed evolution of an α 1, 3-fucosyltransferase using a single-cell ultrahigh-throughput screening method [J]. *Science Advances*, 2019, 5(10): eaaw8451.
- [110] BOTELHO V A, MATEUS M, PETRUS J C C, et al. Membrane Bioreactor for Simultaneous Synthesis and Fractionation of Oligosaccharides [J]. *Membranes (Basel)*, 2022, 12(2): 17397 - 405
- [111] RUZIC L, BOLIVAR J M, NIDETZKY B. Glycosynthase reaction meets the flow: Continuous synthesis of lacto-N-triose II by engineered beta-hexosaminidase immobilized on solid support [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(5): 1597-602.
- [112] WU Y R, SUN Y Z, PEI C X, et al. Automated chemoenzymatic modular synthesis of human milk oligosaccharides on a digital microfluidic platform [J]. *RSC Advances*, 2024, 14(25): 17397-405.
- [113] LI T H, LIU L, WEI N, et al. An automated platform for the enzyme-mediated assembly of complex oligosaccharides [J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(3): 229-36.



通讯作者: 房俊强(1979—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为糖核苷酸规模化制备和复杂寡糖的化学酶法合成及其应用。
E-mail: fangjunqiang@sdu.edu.cn



第一作者: 李毅(1996—),男,实验师。研究方向为分支人乳寡糖的多酶级联合成。
E-mail: liyi@sdu.edu.cn