

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-061

基于合成生物学的唾液酸乳糖合成方法及其应用研究进展

赖霞¹, 张燕梅², 张洪涛^{1,5}, 杜昱光³, 詹晓北¹, 柴文刚⁴

(¹ 江南大学生物工程学院, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; ² 广西壮族自治区钦州市灵山县陆屋欧亚糖业公司; ³ 中国科学院过程工程研究所, 生物制药制备与递送国家重点实验室, 北京 100190; ⁴ 伦敦帝国理工学院医学院, 糖科学实验室, 英国 伦敦; ⁵ 内蒙古自治区微生物代谢与绿色发酵工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010000)

摘要: 母乳低聚糖 (Human Milk Oligosaccharides, HMOs) 是母乳中仅次于乳糖和脂肪的第三大固体成分, 其含量可达到5–15g/L, 对婴儿的生长发育有着至关重要的作用。HMOs 不仅能促进婴儿肠道中有益菌群 (如双歧杆菌) 的定植, 抑制病原体附着, 还能直接调节免疫系统发育, 增强抗感染能力。根据其化学结构, HMOs 可分为中性低聚糖 (如2'-岩藻糖基乳糖) 和酸性低聚糖两大类, 唾液酸化的HMOs 是其主要成分之一, 并且唾液酸化人乳低聚糖 (SHMOs) 是一类含有唾液酸残基的复杂碳水化合物, 在母乳中含量丰富, 尤其在初乳中占比更高。常见的SHMOs 包括结构相对简单的3'-唾液酸乳糖 (3'-sialyllactose, 3'-SL) 和6'-唾液酸乳糖 (6'-sialyllactose, 6'-SL), 以及更复杂的人乳寡糖LSTc、唾液酸乳糖-N-四糖 a (LSTa)、双唾液酸乳糖-N-四糖 (DLSNT) 等。其中3'-SL和6'-SL是唾液酸乳糖 (sialyllactose, SL) 中研究最多且功能较为明确的两种形式, 目前已经获得了美国食品和药物管理局 (FDA) 的公认安全 (GRAS) 批准, 可以添加到婴儿配方奶粉或者其它膳食中。本文重点介绍了HMOs 的分类、SL的合成方法、功能与应用, 并鉴于目前SL合成以及应用情况, 提出了当前所面临的挑战和未来方向。SL不仅能够调节肠道菌群平衡, 还具有抗炎、抗病毒及促进神经发育等作用, 因此在医药、食品和营养补充剂等领域展现出巨大潜力。然而, SL的大规模生产仍面临诸多挑战, 如合成效率低、纯化工艺复杂等。未来, 随着合成生物学和代谢工程技术的发展, 优化SHMOs的生物合成途径、提高产量并降低成本将成为重要研究方向, 以推动其在婴幼儿营养、功能性食品及药物开发中的广泛应用。

关键词: 合成生物学; 3'-唾液酸乳糖; 生物合成; 唾液酸乳糖; 6'-唾液酸乳糖

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A

收稿日期: 2025-06-16 修回日期: 2025-09-01

引用本文: 赖霞, 张燕梅, 张洪涛, 杜昱光, 詹晓北, 柴文刚. 基于合成生物学的唾液酸乳糖合成方法及其应用研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-061

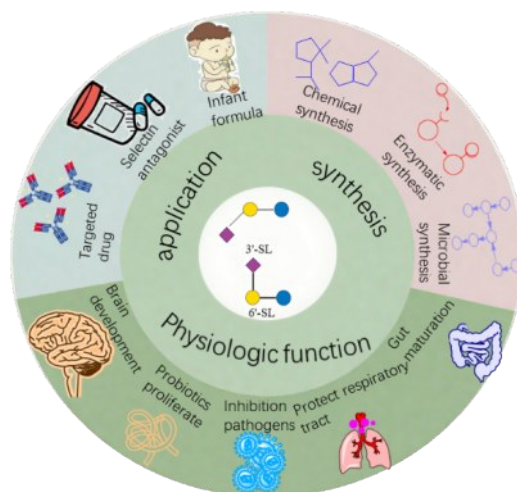
Citation: LAI Xia, ZHANG Yanmei, ZHANG Hongtao, DU Yuguang, ZHAN Xiaobei, CHAI Wengang. Progress on synthetic methods and applications of sialyllactose based on synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-061

Progress on synthetic methods and applications of sialyllactose based on synthetic biology

LAI Xia¹, ZHANG Yanmei², ZHANG Hongtao^{1, 5}, DU Yuguang³, ZHAN Xiaobei¹, CHAI Wengang⁴

¹Jiangnan University, School of Biotechnology, Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Ministry of Education, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ²Luwu Eurasia Sugar Industry Co., Ltd., Lingshan County, Qin Zhou City, Guangxi; ³State Key Laboratory of Biopharmaceutical Preparation and Delivery, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; ⁴Glycosciences Laboratory, Faculty of Medicine, Imperial College London, Hammersmith Campus, London, W12 0NN, United Kingdom; ⁵Inner Mongolia Key Laboratory of Microbial Metabolism and Green Fermentation Engineering, Huhehaote 010000, Neimenggu China)

Abstract: Human Milk Oligosaccharides (HMOs) stand as a pivotal bioactive component in human milk, playing an irreplaceable role in infant health. As the third most abundant solid constituent, they range from 5 to 15 g/L, trailing only lactose and fat. Their multifaceted functions form a robust defense system for infants: by fostering the colonization of beneficial bacteria like bifidobacteria, they maintain a healthy intestinal microecology, while simultaneously inhibiting pathogen adhesion to safeguard the gut barrier. Beyond the gut, HMOs directly modulate immune system development, significantly boosting infants' anti-infection capabilities. Chemically, HMOs are categorized into neutral and acidic oligosaccharides, with sialylated human milk oligosaccharides (SHMOs) emerging as a standout subgroup. These complex carbohydrates, rich in sialic acid residues, are particularly concentrated in colostrum, underscoring their critical role in early infant development. Among SHMOs, 3'-sialyllactose (3'-SL) and 6'-sialyllactose (6'-SL) have garnered extensive research attention, in addition to more complex human milk oligosaccharides, such as LSTc, sialic acid lactose-N-tetrasaccharide a (LSTa), and disialic acid lactose-N-tetrasaccharide (DLSNT), among others.. Notably, 3'-SL and 6'-SL have achieved GRAS status from the FDA, enabling their inclusion in infant formulas and dietary supplements. The synthesis of SL involves diverse approaches, including chemical synthesis, enzymatic catalysis, and microbial fermentation. Chemical methods, while straightforward, often face challenges like low specificity and environmental concerns. Enzymatic synthesis, leveraging sialyltransferases, offers higher selectivity but struggles with cost and scalability. Microbial fermentation, powered by metabolic engineering, shows promise for large-scale production but requires optimization of biosynthetic pathways to enhance efficiency. In terms of applications, SL's versatility shines across multiple domains. In infant nutrition, it mimics the natural benefits of breast milk, supporting gut health and immune development. In pharmaceuticals, its antiviral properties—by blocking pathogen entry into host cells—and anti-inflammatory effects position it as a potential therapeutic agent. Additionally, emerging research highlights its role in neurodevelopment, as sialic acid residues contribute to brain growth and cognitive function. Despite these advancements, large-scale SL production



faces hurdles: low synthesis yields, complex purification processes, and high production costs. Future breakthroughs are expected to stem from synthetic biology and metabolic engineering, with efforts focused on optimizing microbial strains, streamlining pathways, and developing cost-effective purification techniques. These innovations will pave the way for SL's broader application in infant nutrition, functional foods, and pharmaceutical development, unlocking its full potential as a transformative bioactive molecule.

Keywords: synthetic biology; 3'-sialyllactose; sialyllactose; biosynthesis; 6'-sialyllactose

母乳低聚糖 (Human Milk Oligosaccharides, HMOs) 是母乳中含有的聚合度超过2的聚糖, 结构超过200余种^[1]。最新研究显示: 包括母乳低聚糖在内的母乳组分在整个哺乳期随着时间的不同、以及母亲地域不同和种群不同均存在差异^[2]。母乳由必需营养素如乳糖、脂肪酸和蛋白质等^[3], 以及微量营养素如核苷酸、维生素和矿物质等多种生物活性分子, 如免疫球蛋白、乳铁蛋白和溶菌酶等抗菌剂以及母乳低聚糖组成^[4-7]。HMOs是母乳中仅次于乳糖和脂肪的第三大固体成分, 对婴儿肠道菌群定植、免疫系统发育及抗感染具有关键作用^[8]。HMOs的合成具有明显的时空特异性——它们只在乳腺中生成, 而且仅在哺乳期才会产生^[9]。研究表明, 母乳HMOs具有益生元作用^[10-11]、作为先天抗粘附剂发挥作用^[12-14], 通过防止病原体附着来保护母乳喂养的儿童^[15-17]、减少病菌引起的胃肠道^[18-20]、泌尿生殖道和呼吸道感染的风险^[21-23], 甚至防止人类免疫缺陷病毒(HIV)母婴传播^[24-25] (图1)。在婴儿配方奶粉“母乳化”开发的指导思想下, HMOs作为婴儿配方奶粉中的重要组份显得更加关键和重要^[26]。

HMOs提供大脑发育和认知所需的潜在必需营养素^[27-28], 特别是唾液酸基乳糖部分, 以含唾液酸(Sialic acid, Neu5Ac, SA)的神经节苷脂形式大量存在于大脑中组织中^[29]。研究发现, 6'-SL是早期母乳中SHMO的主要形式, 而3'-SL在牛奶中含量更高^[30]。SHMO由于其独特的生物活性^[31], 包括抗菌抗病毒、维持肠道菌群、支持免疫系统等作用, 使其成为在婴儿配方奶粉、膳食补充剂中的宝贵成分^[32]。目前已经获得乳品添加许可证的7种母乳寡糖中包括6'-SL和3'-SL。3'-SL钠盐允许作为婴儿配方奶粉(适用于0至12个月大的婴



图1 母乳寡糖的功能

Fig. 1 The functions of human milk oligosaccharides

儿)和幼儿配方奶粉中的食品成分, 浓度高达0.28g/L, 6'-SL及其钠盐用于非豁免足月婴儿配方奶粉中的含量高达0.4g/L。此外, 3'-SL用于代餐棒和特殊饮食用途的食品, 含量高达0.5 g/L或5 g/kg, 在乳制品类似物、牛奶(全脂和脱脂)、奶制品、谷物产品、饮料和糖替代品中浓度范围为每公斤(固体)或每升(液体)121毫克至12,934毫克, 幼儿饮料、液态奶、代餐棒和谷物棒, 6'-SL的浓度范围为0.3至10 g/kg。然而, 天然母乳的供应量有限, 且无法满足所有婴幼儿的需求。因此, 如何高效、可持续地合成SL, 以满足日益增长的市场需求, 成为科研人员亟待解决的问题。本文从母乳寡糖的分类、唾液酸乳糖的合成及应用进行综述, 并讨论了唾液酸乳糖合成的挑战及未来方向。

1 母乳寡糖的分类

HMOs是由以下五种单糖单元构成: D-葡萄糖

(D-glucose, Glc)、D-半乳糖 (D-galactose, Gal)、N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetylglucosamine, GlcNAc)、L-岩藻糖 (L-fucose, Fuc) 以及以 N-乙酰神经氨酸 (N-acetylneuraminic, Neu5Ac)^[33-37] (图 2)。所有 HMOs 的特征是其还原端含有乳糖 (Lac, Gal β 1, 4Glc)^[38-39], 其骨架可以通过唾液酸化或岩藻糖基化修饰^[40]。乳糖通过岩藻糖基转移酶或唾液酸转移酶的催化作用, 形成典型的人乳三糖结构, 例如 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyllactose, 2'-FL)^[41-42]、3-岩藻糖基乳糖 (3-fucosyllactose, 3-FL)^[43-44]、3'-唾液酸乳糖 (3'-SL) 和 6'-唾液酸乳糖 (6'-SL), 或者在糖基转移酶的作用下可以通过 β 1,3 和 β 1,6 键与乳糖-N-生物糖 (乳糖-N-二糖 I (Lacto-N-biose I, LNB, Gal β 1, 3GlcNAc)) 或 N-乙酰乳糖胺 (LacNAc, Gal β 1, 4GlcNAc) 进一步伸长, 以产生 HMOs 结构的组成部分^[45]。HMOs 的分子组成

及其相对丰度存在显著的个体差异, 这种变异主要取决于乳腺上皮细胞中两种关键糖基转移酶的表达水平: α 1-2-岩藻糖基转移酶 (FUT2) 和 α 1-3/4-岩藻糖基转移酶 (FUT3)^[45-46], 常见的 HMOs 信息见表 1。

1.1 中性母乳寡糖

中性非岩藻糖基化 HMOs 的核心结构由乳糖 (Gal β 1-4Glc) 延伸而成, 一般含有重复的 β 1-3/6 连接 GalGlcNAc 单元, 没有 Fuc 修饰^[47]。代表性分子有乳糖-N-四糖 (LNT, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)^[48]、乳糖-N-新四糖 (LNnT, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)^[49-50] (图 3)。其多样性由糖基转移酶 (如 β 3-GalT、 β 4-GalT) 的底物特异性差异及分支结构决定。

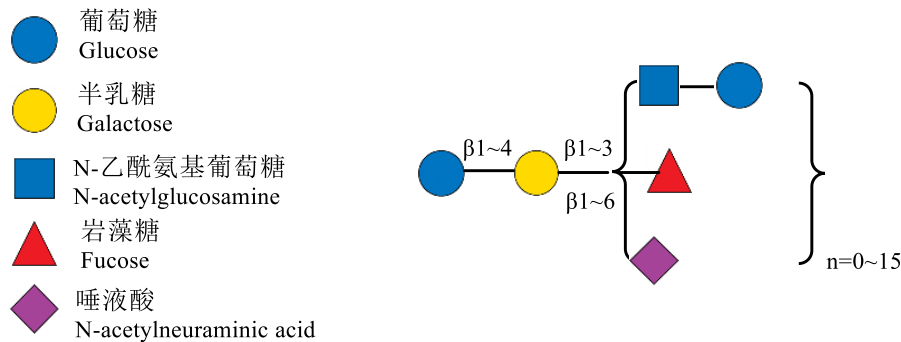


图 2 母乳寡糖的结构组成

Fig. 2 The structural composition of human milk oligosaccharides

表 1 常见的母乳寡糖主要信息

Table 1 Main information of common human milk oligosaccharides

中文名称	简称	英文名称	结构	分子量
2'-岩藻糖基乳糖	2'-FL	2'-fucosyllactose	Fuca1-2Gal β 1-4Glc	488.44
3-岩藻糖基乳糖	3-FL	3-fucosyllactose	Gal β 1-4(Fuca1-3)Glc	488.44
二岩藻糖基乳糖	LDFT	lactodifucotetraose	Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)Glc	634.58
乳-N-岩藻五糖-I	LNFP-I	lacto-N fucopentaose I	Fuc- α 1,2-Gal- β 1,3-GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc	853.77
乳-N-岩藻五糖-II	LNFP-II	lacto-N difucotetraose II	Gal- β 1,3-(Fuc- α 1,4-)GlcNAc β 1,3Gal- β 1,4-Glc	853.77
乳-N-岩藻五糖-III	LNFP-III	lacto-N fucopentaose III	Gal- β 1,4-(Fuc- α 1,3-)GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc	853.77
3'-唾液酸乳糖	3'-SL	3'-sialyllactose	Neu5Aca2-3Gal β 1-4Glc	633.53
6'-唾液酸乳糖	6'-SL	6'-sialyllactose	Neu5Aca2-6Gal β 1-4Glc	633.53
乳-N-四糖	LNT	Lacto-N-tetraose	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	707.63
乳-N-新四糖	LNnT	lacto-N-neotetraose	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	707.63
乳-N-六糖	LNH	lacto-N-hexaose	Gal- β 1,3-GlcNAc- β 1,3-(Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,6-)Gal- β 1,4-Glc	1072.96

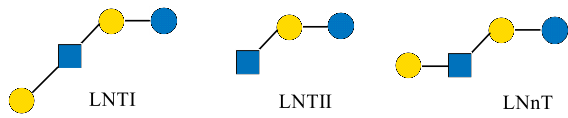


图3 中性母乳寡糖结构示意图

Fig. 3 The structural schematic diagram of neutral human milk oligosaccharides

1.2 岩藻糖基化母乳寡糖

HMOs中岩藻糖基化修饰类型在生物活性调控中发挥重要作用。这类特殊糖链以Gal β 1-4Glc为基础结构单元，经糖基化延伸形成核心骨架，标志性特征是岩藻糖经 α -糖苷键连接至Gal或GlcNAc单元^[51-52]。根据连接位点可分为 α 1-2-岩藻糖基化（如2'-FL, Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc）、 α 1-3/4-岩藻糖基化（如LNFP I, Gal β 1-3 [Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc）和双岩藻糖基化（如DFLNH, 含多个岩藻糖分支）三类^[53-54]（图4）。糖链合成过程受岩藻糖基转移酶家族关键成员调控，其中以FUT2和FUT3基因多态性影响最为显著。研究表明，携带FUT2失活突变的非分泌型个体，其母乳中 α 1-2-岩藻糖基化HMOs检测不到；而具有Lewis阴性表型的FUT3缺陷人群，乳汁中 α 1-4-岩藻糖基化修饰产物水平明显降低^[55-56]。

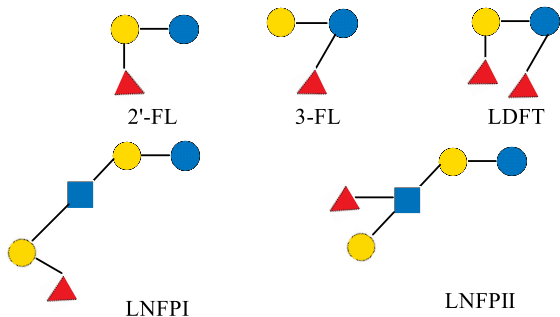


图4 岩藻糖基化母乳寡糖结构示意图

Fig. 4 The structure diagram of fucosylated human milk oligosaccharides

1.3 酸性母乳寡糖

酸性母乳寡糖（Acidic HMOs）因其分子结构中携带Neu5Ac基团而具备负电荷属性，这类成分在HMOs总量中所占比例约为10%-20%^[57]。SL的结构由三个糖苷键连接构成，其乳糖残基的非还原端通过 α ,2-3或 α ,2-6键与单个唾液酸残基相连，

主要存在3'-SL和6'-SL两种异构体形式^[58]（图5）。这类寡糖在婴儿神经发育、免疫防御及肠道菌群调控中发挥独特作用^[59]，近年来成为糖生物学与营养学交叉领域的研究焦点。而四糖骨架LNT和LNnT可以在不同位点进一步唾液酸化，形成一系列唾液酸化衍生物。LNT衍生物经唾液酸化后可形成LSTa、LSTb、DSLNT，而LNnT衍生物经唾液酸化可以形成LSTc、LSTd、DSLNNt。

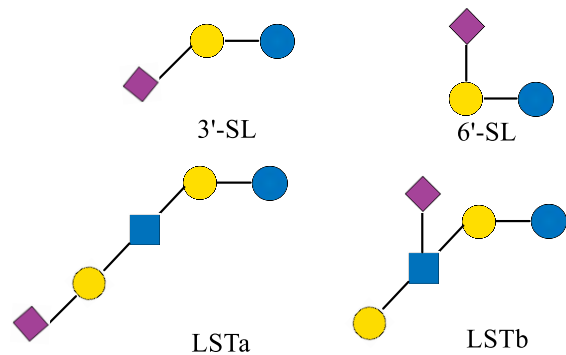


图5 酸性母乳寡糖结构示意图

Fig. 5 The Structure diagram of acidic human milk oligosaccharides

2 唾液酸乳糖合成的策略

2.1 合成方法

唾液酸乳糖在婴儿配方奶粉和特殊膳食食品中可作为一种功能性补充剂，在治疗炎症性疾病或转移性癌症时可作为潜在的选择素拮抗剂在靶向药物递送中发挥积极作用。目前SL的获取方法多种多样，（1）直接从天然乳源中提取，虽然获取的物质最为天然，但其低含量导致提取过程复杂、成本高昂，难以大规模应用^[60]；（2）化学合成方法则在精确性上具有优势，能够精准地构建出目标分子结构，但复杂的合成步骤、苛刻的反应条件以及由此产生的大量废弃物，不仅增加了生产成本，也对环境造成了潜在威胁^[61-63]；（3）酶法合成，利用酶的高效催化特性，在一定程度上提高了合成效率，但酶的来源、成本以及稳定性等因素，限制了其大规模工业生产的可行性^[64]；（4）发酵生产，微生物合成法的出现，为SL的合成带来了新的曙光。通过基因工程手段改造微生

物,使其能够高效地将简单的碳水化合物转化为SL,这种方法不仅具有较高的合成效率,而且环境友好,适合大规模生产,有望成为未来SL合成的主流方向^[65-68]。

2.1.1 化学合成法

从天然来源分离大量均相SL存在困难,促使人们开发相应化学合成方法。这些方法可提供可接受的纯度、产量和数量的SL^[69]。SL作为重要的生物活性寡糖,其化学合成关键是立体选择性构建Neu5Ac与乳糖(Gal β 1-4Glc)间的 α -2,3或 α -2,6糖苷键^[70-71]。通过供体设计^[72]、活化方法创新^[73-74]及受体工程^[72]可以显著提高合成效率。化学法合成唾液酸采用合成的 α -或 β -2-糖基化SA供体,这些供体含有活化离去基团,有时还包含羧基等辅助基团^[73-74]。化学-酶法联用策略则通常通过化学构建复杂寡糖骨架与酶法添加末端SA基团的结合来提高合成效率。最新技术进展包括采用保护基策略和新型糖基供体来增强立体选择性和产率,从而有效构建生物化学与免疫学研究所需的复杂唾液酸化结构。例如Chen等证实,在MPEP糖基化策略中,1-吡啶甲基-5-叠氮硫代唾液酸苷可作为高效的 α 选择性糖基供体用于复杂N-聚糖结构的合成^[72]。

2.1.2 酶催化合成法

酶法合成唾液酸化寡糖的核心机制依赖唾液酸酶和唾液酸转移酶(sialyltransferase, SiaT)的协同作用^[75]。唾液酸酶的催化活性源于微生物分泌的外源酶,通过逆向催化过程实现唾液酸基团的转移,该过程涉及 β -唾液酸酶共价中间体的形成,并以此介导糖苷键的重组^[76]。SiaT在系统分类学中隶属于GT4、GT38、GT42、GT52及GT80家族。其中,细菌来源的GT80家族 α 2,6-SiaT因兼具高催化效率与结构稳定性,是合成应用中的优选工具酶^[77]。典型的双酶级联反应体系包含两个关键步骤:其一,CMP-唾液酸合成酶催化三磷酸胞苷(cytidine triphosphate, CTP)与Neu5Ac反应,生成活化供体胞苷三磷酸-N-乙酰神经氨酸(cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid, CMP-Neu5Ac);其二,特异性SiaT介导CMP-Neu5Ac中的唾液酸基向乳糖受体转移(图6)。Guo等人从脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)中鉴

定出一种SiaT,表现出严格的 α 2-6区域选择性,将SA从SA二聚体或低聚物转移到乳糖中,从而产生转化率超过20%的6'-SL^[78]。又从多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)中鉴定出一种PmST双功能酶,其酶活性口袋可同时容纳Gal β 1-4Glc的C3/C6羟基,显示出双重反式唾液酸酶活性(α 2,3和 α 2,6特异性),以糖巨肽(cGMP)和乳糖为底物,PmST催化不同比例的3'-SL和6'-SL的形成^[79]。酶法合成SL时需要将SA活化为CMP-Neu5Ac,该过程需要消耗大量CTP和Neu5Ac^[80-81]。传统酶法因高价底物带来的经济性限制,不利于商业化的大规模生产因此以微生物合成SL显得尤为重要。

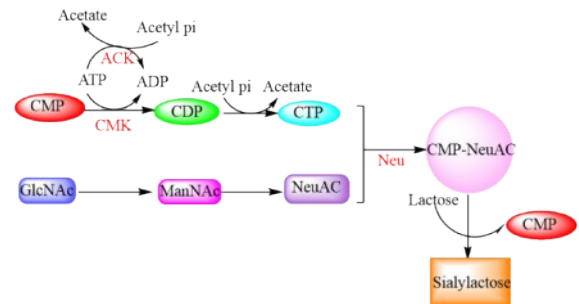


图6 酶催化合成唾液酸乳糖示意图

Fig. 6 The schematic diagram of sialyllactose synthesis by enzymatic catalysis

注:化合物缩写: CMP: 胞苷单磷酸; CMK: 胞苷酸激酶; ACK: 乙酸激酶; CDP: 胞苷二磷酸; CTP: 胞苷三磷酸; GlcNAc: N-乙酰葡萄糖胺; ManNAc: N-乙酰甘露糖胺; Neu5Ac: 唾液酸; CMP-Neu5Ac: 胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸; Sialyllactose: 唾液酸

2.1.3 微生物细胞合成法

微生物法合成SL分为单细胞合成和多细胞耦合两种方法^[82]。单细胞合成是将所需的所有基因克隆进同一个宿主中,通过基因工程改造和代谢途径优化等手段来实现异源从头合成。SL的生物合成依赖微生物细胞内完整代谢网络的构建,核心在于SA活化与转移过程的协同调控。通过系统代谢工程改造,研究者在单一宿主中重构了从糖前体到终产物的合成通路:以N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸或外源性SA为起始物,经SA合成酶、激酶及胞苷酸转移酶的级联催化生成活化CMP-唾液酸,最终由特异性糖基转移酶完成对乳糖分子的修饰^[83]。为提高SL的生物合成效率,研究者采用了多层次的代谢调控策略。如姚建铭团队通过系

统代谢工程引入模块化工程策略来有效表达前体库基因，并增强辅助因子的再生，同时阻断了关键的前体竞争途径，动态调控 *pfkA* 以平衡代谢网络中碳通量的分布，并筛选出具有积极作用的转运蛋白，在 5-L 发酵罐的规模下，*BS4P54* 菌株的 3'-SL 滴度为 56.8 g/L^[83]。该团队还通过 *neuB*、*neuC*、*neuA* 和 α 2,6-SiaT 的协调表达，建立了大肠杆菌 *DH5 α* 异源 6'-SL 生物合成途径，在使用低成本葡萄糖/甘油底物的 5L 生物反应器中，在 85 小时内实现了 30.18 g/L 的 6'-SL 滴度^[84]。在基因操作层面，通过协同表达 SA 合成途径关键酶与特异性糖基转移酶，同时消除代谢旁路竞争^[85-88]。如张涛团队开发了一种新的微生物细胞工厂，利用菌株 *BZAPK14* 实现高效的 α 2,3-SiaT 取代筛选，并通过设计包括 RBS 和蛋白质标记在内的多级组合策略，最终在摇瓶中产生 9.04 g/L 3'-SL。在 3L 生物反应器中，补料分批发酵产生 44.2g/L 3'-SL^[85]。近来，沐万孟团队利用来自 *Simonsiella muelleri* ATCC 29453 (AUX62520.1) 的 α 2,6-SiaT 在工程化大肠杆菌中高效产生 6'-SL，通过竞争性基因缺失、质粒组合优化和 RBS 工程手段，在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中生产 6'-SL 达到 21.020 g/L，在大肠杆菌 *MG1655* 中通过关键途径基因的多拷贝整合和 UDP-GlcNAc 供应增强，实现 6'-SL 为 17.220 g/L^[89] 在能量代谢方面，建立了高效的核苷酸循环再生机制。典型研究案例显示，黄传超和邓阳通过在 *E. coli* *MG1655* 中整合 *neuC*、*neuB*、*neuA* 和 *Vs16/nst* 基因，采取优化合成途径，阻断前体代谢途径，增加前体供应等策略，使 3'-SL 在 3L 发酵罐中的产量达到 14.85 g/L，生产强度为 0.13 g/L/h^[90]。单细胞发酵合成 SL 存在产量低的缺陷。而多细胞耦合则是将所需基因克隆进两种及以上微生物中，通过外源添加底物实现 SL 的合成。在单细胞合成中，外源途径引入导致代谢负担加重、能量失衡及生长受限，从而降低 SL 产量^[60]。2000 年，Endo 等研究者开发了一种多菌耦合的反应系统，通过在大肠杆菌中重组表达 α -2,6-唾液酸转移酶和 CMP-唾液酸合成酶，利用产氨棒状杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) 表达 CTP 合成酶和两株大肠杆菌分别高表达 CMP-Neu5Ac 合成酶和唾液酸基转移酶，外源添加乳清酸、Neu5Ac 和乳糖作为底物，

反应 11 h 后 3'-SL 产量达到 33 g/L^[66]。张洪涛团队采用多菌种协同催化策略，用工程菌 *JM109* (*DE3*) 表达含有 CMP-Neu5Ac 合成酶基因 (*neuA*) 和唾液酸转移酶基因 (*nst*)，利用啤酒酵母实现 CTP 的循环再生构建体外合成体系 (图 7)。以 CMP、唾液酸和乳糖为混合底物，实现了 3'-SL 的 3 菌株全细胞耦合催化合成^[60]。该团队还创新性地开发了五菌株两步法耦合合成 3'-SL 的工艺体系：首先通过双菌株 (*BT0453/NanA*) 将 GlcNAc 高效转化为 Neu5Ac (产量 20.41 g/L，转化率 65.98%)，再经三菌株 (*NeuA/Nst/酵母*) 催化合成 3'-SL。经底物浓度、酵母添加量和 Mg^{2+} 等参数优化，最终在发酵体系中实现 55.04 g/L 的 3'-SL 产量，较一步法提升 11.7 倍，GlcNAc 转化率提升至 43.47%^[91]。最近，开发了一种以大肠杆菌 *JM109* (*DE3*) 为宿主，丙酮酸、N-乙酰氨基葡萄糖、乳糖和胞苷-5'-单磷酸作为底物，啤酒酵母与大肠杆菌 *JM109* (*DE3*) 相耦合的三模块四基因合成法，成功在 5L 生物反应器中实现 3'-SL 的最大滴度达到 78.03g/L^[92]。

2.2 底物驱动的合成路径优化

在 SL 的合成过程中，最重要的是考虑生产成本，在微生物发酵方法上考虑底物的优化。而根据底物来源的不同，SL 的合成途径分为补救途径和从头合成途径 (图 8a)。在补救途径中 SA 和乳糖是 SL 合成的直接前体，也是最早被选用的底物。在合成过程中，先由胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸合成酶 (CMP-NeuAc synthetase) 催化 Neu5Ac 生成关键中间体 CMP-Neu5Ac，再经 α -2,3-唾液酸转移酶 (α -2,3-sialyltransferase, α -2,3-ST) 与 α -2,6-唾液酸转移酶 (α -2,6-sialyltransferase, α -2,6-ST) 分别介导 CMP-Neu5Ac 的唾液酸基团转移反应：前者催化乳糖分子的 C-3 羟基位点发生唾液酸化，生成 3'-SL；后者则通过识别乳糖的 C-6 羟基位点，催化形成 6'-SL^[66]。但此方法合成 3'-SL 需要外源添加 SA，研究者们在大肠杆菌中发现了从头合成途径，通过廉价碳源如甘油和葡萄糖等就能实现 SL 的高效合成。例如沐万孟团队在大肠杆菌中构建了 SA 的合成通路，优化碳源，采用甘油为碳源，在摇瓶中生产了 7.02 g/L 的 SA^[93]，同

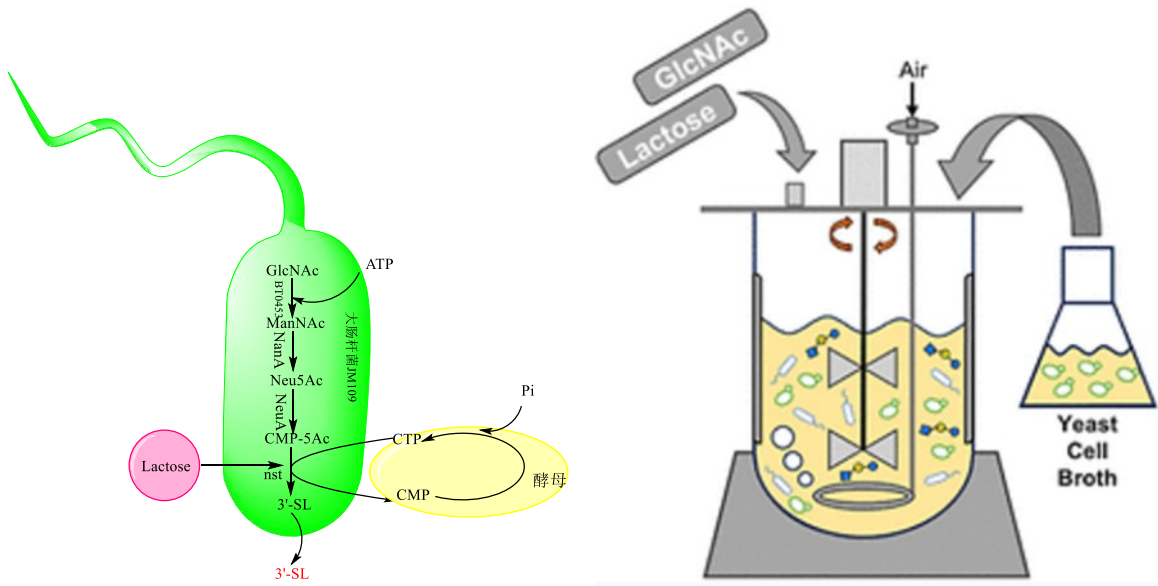


图7 多细胞两步法耦合合成唾液酸乳糖路线

Fig. 7 Multicellular two-step coupled route to the synthesis of sialyllactose

注:GlcNAc:N-乙酰葡萄糖;ATP:腺嘌呤核苷三磷酸;ManNAc:N-乙酰甘露糖胺;Neu5Ac:N-乙酰神经氨酸;CMP-Neu5Ac:胞苷-5'-单磷酸-N-乙酰神经氨酸;CTP:胞苷三磷酸;CMP:胞嘧啶核苷酸;Lactose:乳糖;nanA:N-乙酰神经氨酸裂解酶;neuA:编码 CMP-Neu5Ac 合成酶的基因;3'-SL:3'-唾液酸乳糖

时通过代谢工程改造大肠杆菌 *BL21 (DE3)*, 引入糖基化及 CMP-Neu5Ac 合成通路, 优化 SA 供体供应并敲除竞争基因, 以甘油为底物成功实现 LST-a 的高效合成^[53]。又引入 $\beta 1, 3/\beta 1, 4/\alpha 2, 6$ 糖基转移酶及优化 CMP-Neu5Ac 供应, 筛选高效酶组合, 实现 LSTc 高效合成, 摇瓶和发酵产量分别达 1.718 和 9.745 g/L^[94] (图 8b)。该团队以甘油和乳糖为底物, 通过过表达 α -2,3-唾液酸转移酶、N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸差向异构酶 (*NeuC*)、SA 合酶 (*NeuB*) 和 CMP-NeuAc 合成酶 (*NeuA*) 并敲除 NeuAc 醛缩酶、ManNAc 激酶和 β -半乳糖苷酶的编码基因, 3'-SL 滴度可以达到 25 g/L。以同样的生产策略合成 6'-SL, 可以使 6'-SL 的滴度达到 30 g/L^[95]。然而在从头合成途径中, 廉价成本的底物葡萄糖直接发酵生产 SL 是更有吸引力的替代方案。例如刘龙团队在 3'-SL 的合成中, 在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中成功构建了从头合成途径, 成功以葡萄糖和乳糖为底物合成 3'-SL, 通过优化后, 最终的最初的 3'-SL 滴度为 1252.1 mg/L^[82]。同时, 在枯草芽孢杆菌中也设计了 6'-SL 的从头合成路径, 在底盘细胞 *B.subtilis* 基因组上整合表达了来源于脑膜炎奈瑟菌 (*Nisseria meningitides*) 的 *neuC* 和

neuB、来源于 *N.meningitides* 的 *neuA* 以及来源于发光菌属 *JT-ISH-224 (Photobacterium sp. JT-ISH-224)* 的 *pst6*。将葡萄糖以糖酵解和氨基酸代谢过程转化为 UDP-GlcNAc, 最终 6'-SL 的产量达到 15.0 g/L^[96]。张洪涛团队以 GlcNAc 和乳糖作为底物, 利用酵母将 CMP 转化为 CTP 提供辅因子, 采用多菌耦合的方法发酵生成 SL, 最终底物转化率 43.47%^[91]。

3 唾液酸乳糖的功能与应用

研究表明, SL 是一种关键的 HMO, 可以促进益生菌增殖, 优化大脑中的新陈代谢, 促进婴儿的肝脏和肌肉发育, 并可以诱导人肠上皮细胞等分化^[59], 小鼠实验表明, SL 可以改善肠道菌群并减少焦虑^[97]。SL 具有抗感染和免疫调节作用, 并防止铜绿假单胞菌粘附在人肺细胞上。基于 Neu5Ac 和 SL 的有益效果。SL 在促进双歧杆菌的增殖和塑造肠道微生物群方面表现出良好的益生特性^[98], 目前, 3'-SL 与 6'-SL 已经通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 的安全性评估, 被正式纳入“公认安全”(GRAS) 物质清单; 同时, 二

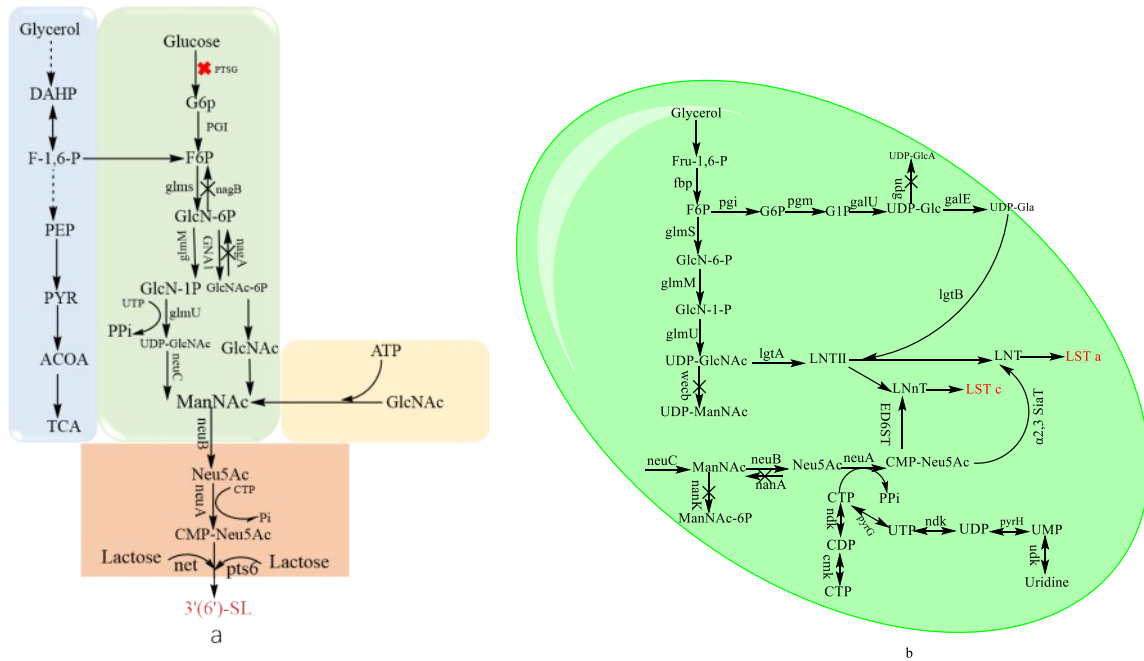


图8 底物转化路径对比图

Fig. 8 The comparison of substrate transformation pathways

注:Glycerol:甘油;DAHP:二羟丙酮磷酸;F-1,6-P:果糖 1,6 二磷酸;PEP:磷酸烯醇式丙酮酸;PYR:丙酮酸;Glucose:葡萄糖;G6P:葡萄糖 6 磷酸;F6P:果糖 6 磷酸;GlcN-6P:葡萄糖胺-6-磷酸;GlcN-1-P:葡萄糖胺-1-磷酸;UDP-GlcNAc:尿苷-5'-二磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖;ManNAc:N-乙酰甘露糖胺;Neu5Ac:N-乙酰神经氨酸; CMP-Neu5Ac:胞苷-5'-单磷酸-N-乙酰神经氨酸;GlcNAc-6-P:N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸;ManNAc-6-P:N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸;FBP:果糖-1,6-二磷酸酶;glmS:编码谷氨酰胺-果糖-6-磷酸氨基转移酶的基因;glmM:编码磷酸葡萄糖胺变位酶的基因;glmU:编码尿苷转移酶/葡萄糖胺-1-磷酸乙酰转移酶的基因;neuC:编码 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖 2-差向异构酶的基因;neuB:编码 N-乙酰神经氨酸合酶的基因;neuA:编码 CMP-Neu5Ac 合成酶的基因;pts6:编码 α 2,6-唾液酸转移酶的基因; nana:编码 N-乙酰神经氨酸裂解酶的基因; nagB:编码葡萄糖胺-6-磷酸脱氢酶的基因;nagA:编码 N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸脱乙酰酶的基因;nanE:编码 N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸 2-差向异构酶的基因;nank:编码 N-乙酰甘露糖胺激酶的基因;nanT:编码 nanT 通透酶的基因;PTSG:编码葡萄糖转运酶基因;PGI:编码葡萄糖异构酶基因;GNA1:编码氨基葡萄糖-6-磷酸 N-乙酰转移酶 1;pgm:编码磷酸葡萄糖变位酶基因;galU:葡萄糖-1-磷酸核苷酸基转移酶;galE:UDP-葡萄糖 4-差向异构酶;udg:UDP-葡萄糖 6-脱氢酶;lgtB:脑膜炎奈瑟菌 β -1,4-半乳糖基转移酶;lgtA:脑膜炎奈瑟菌 β 1,3-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶;Webc:Udp-- N-乙酰葡萄糖胺 2-差向异构酶;ndk:核苷二磷酸激酶;cmk:4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶

者也被欧洲食品安全局 (EFSA) 依据法规 (EU) 2015/2283 认定为“新型食品”^[99], 这一双重认证体系为其在婴幼儿配方食品、功能性食品等领域

的合规应用提供了坚实的法规支撑。3'-SL 和 6'-SL 实现了商业化应用, 并与其它 HMOs 混合添加在婴儿配方奶粉中^[100], 具体添加情况见表 2。

表2 3'-SL 与 6'-SL 及其它母乳寡糖在配方奶粉中的添加情况^[95]

Table 2 Addition of 3'-SL, 6'-SL, and other human milk oligosaccharides to enriched formulas

配方奶粉品牌	阶段	3'-SL 含量 (mg/100mL)	6'-SL 含量 (mg/100mL)	其他 HMOs 成分
雀巢 BEBA®Supreme	第1阶段	4	20	2'-FL、LNT、DFL
	第2阶段	1	5	2'-FL、LNT、DFL
	第3阶段	1	4	2'-FL、LNT、DFL
	第4阶段	5	5	2'-FL、LNT、DFL
惠氏 Illuma®LUXA 启赋未来	第1阶段	10	18	2'-FL、LNT、LNnT、DFL
	第2阶段	4.9	4.6	2'-FL、LNT、LNnT、DFL
	第3阶段	4.9	4.6	2'-FL、LNT、LNnT、DFL
	第4阶段	5	4.6	2'-FL、LNT、LNnT、DFL

3.1 益生元作用

唾液酸乳糖在婴儿的成长发育过程中,是有益肠道细菌的重要能量来源,有利于塑造婴儿肠道微生物的组成。研究表明HMOs可致婴儿肠道中61.5%的微生物群发生变化,主要与双歧杆菌属、拟杆菌属和乳杆菌属有关^[101]。当母乳喂养的婴儿食用母乳时,大多数HMOs不会在小肠内被消化和吸收,因此会到达婴儿的结肠,作为益生元被肠道菌群吸收。给哺乳期的中国母亲补充SA和益生菌(Pro)混合物会增加她们乳汁中的SHMO水平,从而增强双歧杆菌和乳酸杆菌在婴儿肠道中的定植^[102]。同样,临床研究了个体HMO及其混合物对儿童和成人肠道菌群的影响^[103]。结果表明,补充HMOs可促进成年肠道菌群的多样性,3'-SL增加叶酸水平,SHMO(尤其是6'-SL)显著影响幼儿肠道菌群,促进双歧杆菌等的增殖。动物模型(包括小鼠、大鼠和猪)的开发也导致了对SHMO益生元特性和肠道菌群能力的有力解释。

3.2 促进大脑发育

HMOs在胃肠道和大脑发育以及预防致病事件中起着至关重要的作用^[4]。SL能影响新生儿的大脑发育,而人类新生儿合成SA的能力较低,可能无法满足其用作大脑及神经发育的高需求,因此在早期神经发育过程中需要外源性膳食SA以实现最佳和快速的大脑生长。小鼠实验证明,3'-SL显著改善了小鼠的认知和记忆能力,以及显著增加了海马体中的SA水平与认知学习相关的基因水平^[104]。通过向婴儿配方奶粉添加3'-SL和6'-SL,可以弥补传统配方奶与母乳的营养差距,促进婴幼儿肠道健康、免疫发育和认知能力^[105]。GRN 921明确允许3'-SL钠盐添加于0-12月龄婴儿及幼儿配方奶粉,设定0.28 g/L的安全剂量阈值;而GRN 881(2020)与922(2021)文件则为6'-SL及其钠盐在足月婴儿配方奶粉中划定0.4 g/L的添加上限。

3.3 作为选择素拮抗剂发挥抗炎作用

唾液酸乳糖在制药领域也有着巨大的潜力,

展现出了多重应用价值,例如作为选择素拮抗剂可用于类风湿性关节炎、克罗恩病等炎症性疾病治疗^[106-107]。3'-SL和6'-SL能通过受体介导的内吞作用和吞噬作用有效促进铜绿假单胞菌K感染小鼠的细菌清除,表明它们在治疗病原体诱导的炎症方面的治疗潜力^[108]。在特应性皮炎小鼠模型中,3'-SL通过增加双歧杆菌种群并通过调节T细胞分化抑制皮肤炎症,作为p65磷酸化的有效抑制剂,并通过降低炎症细胞因子的血清水平和自身抗体的产生来显著降低小鼠胶原蛋白诱导关节炎的严重程度,表明其治疗类风湿性关节炎的治疗潜力^[109]。通过小鼠实验证明,SL通过阻断NF- κ B信号通路显著减轻了类风湿性关节炎的发病几率^[110]。此外,膳食来源的SL在机体内可被有效代谢利用,并能显著抑制软骨退变过程中的关键调控因子——基质金属蛋白酶(MMPs)的基因表达水平,从而发挥保护关节软骨的作用^[111]。这一发现为其作为骨关节炎的潜在营养干预剂提供了重要依据。

3.4 抗病毒作用

SA是病毒的良好靶标,因为它在几乎所有细胞中都具有很高的保守性和丰度。流感病毒表面含有血凝素(HA)糖蛋白,可识别并结合人类红细胞表面和上呼吸道细胞膜上的SA结构,SL通过与HA刺突糖蛋白结合来抵抗流感感染^[112]。基于抗病毒特性,对流感、HIV等病毒感染具有潜在疗效,其中扎那米韦、奥司他韦等SA前体药物已证实抗流感活性^[113]。还可作为抗黏附剂用于微生物感染防治及肿瘤疫苗开发^[114]。

4 结论与展望

由于SL是一类具有不同功能的HMOs,且在婴儿成长过程中扮演着重要的角色,越来越多的食品开发商将会更广泛的将其应用在各类配方奶粉、医疗食品中。然而,并非所有的SL都能大规模或低成本生产。通过改进合成方法的经济性可以显著降低生产成本。酶促合成以其区域选择性和立体选择性,结合级联生物催化和化学方法,

使它能够生产结构多样的SL并提高产量。在半合成中,级联生物催化有效地提供关键中间体或完成最终生产步骤,凸显了其在该领域的多功能性和重要性。由于代谢工程和合成生物学策略的重大进步,使用低成本底物成功开发了工程菌株合成3'-SL和6'-SL的方法。但目前,生物合成方面仍存在许多亟待解决的问题。(1)唾液酸转移酶(SiaT)效率低。高性能SiaT对于通过代谢工程策略有效合成3'-SL或6'-SL至关重要。虽然目前已对多种细菌SiaT进行了深入研究并全面表征其功能参数,但它们在3'-SL或6'-SL中的应用仍然不足^[115]。SL的合成依赖于SiaT(如 α 2,3-或 α 2,6-SiaT),但这些酶通常存在催化效率低、底物特异性不足等问题。例如,部分SiaT对乳糖的 K_m 值较高,导致SL合成速率受限。此外,酶的热稳定性差、易失活等问题也制约了工业化生产。未来应选择性能优异的SiaT用于SL的生产。此外,应通过合理或非合理设计进行分子修饰,以增强SiaT的性能并改善SL的合成效率。对于SiaT的筛选,可以开发高通量筛选系统,可以从定向进化文库中筛选活性最高的SiaT变体。应开发蛋白质工程策略,以提高SiaTs的底物特异性和催化活性,有利于SL生产效率。(2)前体供应不足是SL大量合成的限制因素之一。SL的合成依赖于乳糖和SA两种关键前体,然而在大肠杆菌或枯草芽孢杆菌中通常缺乏高效的乳糖转运系统,因此对底盘细胞引入高效的乳糖转运系统显得尤为重要。此外,由于Neu5Ac的合成途径分为NAGE、NeuC和NanE三种不同途径,可以通过工程化不同的单个途径或组合多重途径改善SL的高效合成;然而,对SL合成代谢工程策略的研究仍然不足,使用工程菌株生产Neu5Ac仍面临挑战。Neu5Ac的前体,如GlcNAc和ManNAc,很容易输出到宿主中,导致Neu5Ac的生产效率低下。因此,关键途径酶可能具有底物亲和力和催化活性不足,导致向Neu5Ac的转化率低。参与中枢碳代谢的其他关键前体,如丙酮酸和PEP,可能会因供应不足而出现Neu5Ac和细胞生长之间的不平衡。这些挑战也应在SL的合成中得到解决,该解决方案应作为SL生产的参考。其他方面,如宿主菌株的选择、竞争途径的缺失、辅助因子的再生、转运因子的调控

以及关键代谢网络的微调,也应综合考虑。(3)下游分离纯化成本高。SL的发酵液通常成分复杂,含有大量培养基成分、细胞碎片及代谢副产物(如乳酸、乙酸等),使得分离纯化过程成本高昂。传统的层析、结晶等方法效率较低,且难以实现大规模生产,采用工业纯化通常涉及多个分离和精制步骤,例如纳滤和色谱,这会增加成本和能源消耗,并可能导致产品损失。如何开发高效、低成本的分选纯化技术,是SL商业化面临的重要挑战。(4)潜在生物学功能的开发。SL表现出多种异构体和链长结构,其在益生元活性和抗炎作用等功能中的具体作用仍不确定。高通量表征与功能验证模型相结合,有助于阐明SL的结构-功能关系。

在显着的技術挑战的同时也具有巨大的潜力。计算工具、分子生物学和化学技术的进步为酶促、化学酶和微生物方法提供了充满希望的机会。这些创新有望以更高效、更精简的方式大规模生产结构定义的SL。此外,下游发展需要建立全面的产品纯化策略,与上游生物催化有效结合,确保高质量产品的可持续生产和应用。

参 考 文 献

- [1] Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am*. 2016; 43(3): 279-288.
- [2] Faijes M, Castejón-Vilatersana M, Val-Cid C, Planas A. Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides. *Biotechnol Adv*. 2019; 37(5): 667-697.
- [3] Borewicz K, Gu F, Saccenti E, et al. Correlating Infant Fecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of 1-Month-Old Breastfed Infants. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(13):e1801214.
- [4] Sato K, Nakamura Y, Fujiyama K, et al. Absolute quantification of eight human milk oligosaccharides in breast milk to evaluate their concentration profiles and associations with infants' neurodevelopmental outcomes. *J Food Sci*. 2024; 89(12):10152-10170.
- [5] Garrido D, Dallas DC, Mills DA. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology (Reading)*. 2013; 159(Pt 4):649-664.

- [6] Meredith-Dennis L, Xu G, Goonatileke E, Lebrilla CB, Underwood MA, Smilowitz JT. Composition and Variation of Macronutrients, Immune Proteins, and Human Milk Oligosaccharides in Human Milk From Nonprofit and Commercial Milk Banks. *J Hum Lact*. 2018;34(1):120-129.
- [7] Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:143-169.
- [8] Nguyen TLL, Nguyen DV, Heo KS. Potential biological functions and future perspectives of sialylated milk oligosaccharides. *Arch Pharm Res*. 2024;47(4):325-340.
- [9] Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012;22(9):1147-1162.
- [10] Okburan G, Kızıler S. Human milk oligosaccharides as prebiotics. *Pediatr Neonatol*. 2023;64(3):231-238.
- [11] Bode L, Contractor N, Barile D, et al. Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: challenges and opportunities for research and application. *Nutr Rev*. 2016;74(10):635-644. .
- [12] Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, et al. A strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem*. 2006;54(20):7471-7480.
- [13] Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:37-58.
- [14] Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr*. 2004;145(3):297-303.
- [15] Coppa GV, 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 flexneri*. *Pediatr Res*. 2006;59(3):377-382.
- [16] Tonon KM, Chutipongtanate S, Morrow AL, Newburg DS. Human Milk Oligosaccharides and Respiratory Syncytial Virus Infection in Infants. *Adv Nutr*. 2024;15(6):100218..
- [17] Ben Hamed S, Tavares Ranzani-Paiva MJ, Tachibana L, de Carla Dias D, Ishikawa CM, Esteban MA. Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish Shellfish Immunol*. 2018;80:550-562.
- [18] Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. *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 Biol Chem*. 2003;278(16):14112-14120.
- [19] Nilsen M, Madelen Saunders C, Leena Angell I, et al. Butyrate Levels in the Transition from an Infant- to an Adult-Like Gut Microbiota Correlate with Bacterial Networks Associated with *Eubacterium Rectale* and *Ruminococcus Gnavus*. *Genes* (Basel). 2020;11(11):1245. Published 2020 Oct 22.
- [20] Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011;469(7331):543-547.
- [21] Albrecht S, Lane JA, Mariño K, et al. A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals. *Br J Nutr*. 2014;111(7):1313-1328.
- [22] Craft KM, Townsend SD. The Human Milk Glycome as a Defense Against Infectious Diseases: Rationale, Challenges, and Opportunities. *ACS Infect Dis*. 2018;4(2):77-83.
- [23] Antunes KH, Fachi JL, de Paula R, et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nat Commun*. 2019;10(1):3273. Published 2019 Jul 22.
- [24] Yu ZT, Chen C, Kling DE, et al. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology*. 2013;23(2):169-177.
- [25] Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients*. 2018;10(8):1038..
- [26] Zhang S, Li T, Xie J, et al. Correction to: Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota. *Microb Cell Fact*. 2021;20(1):140.
- [27] Fan Y, McMath AL, Donovan SM. Review on the Impact of Milk Oligosaccharides on the Brain and Neurocognitive Development in Early Life. *Nutrients*. 2023;15(17):3743.
- [28] Hauser J, Pisa E, Arias Vásquez A, et al. Sialylated human milk oligosaccharides program cognitive development through a non-genomic transmission mode. *Mol Psychiatry*. 2021;26(7):2854-2871.
- [29] Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr*. 2009;29:177-222.
- [30] Thum C, Wall CR, Weiss GA, Wang W, Szeto IM-Y, Day L. Changes in HMO Concentrations throughout Lactation: Influencing Factors, Health Effects and Opportunities. *Nutrients*. 2021;13(7):2272..
- [31] Craft KM, Townsend SD. Mother Knows Best: Deciphering the Antibacterial Properties of Human Milk Oligosaccharides. *Acc Chem Res*. 2019;52(3):760-768.
- [32] Lis-Kuberka J, Orczyk-Pawłowicz M. Sialylated Oligosaccharides and Glycoconjugates of Human Milk. The Impact on Infant and Newborn Protection, Development and Well-Being. *Nutrients*. 2019;11(2):306.
- [33] Kobata A. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(7):731-747.
- [34] Puccio G, Alliet P, Cajozzo C, et al. Effects of Infant Formula With Human Milk Oligosaccharides on Growth and Morbidity:

- A Randomized Multicenter Trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64(4):624-631..
- [35] Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, et al. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics.* 2011;128(6):e1520-e1531.
- [36] Corona L, Lussu A, Bosco A, et al. Human Milk Oligosaccharides: A Comprehensive Review towards Metabolomics. *Children (Basel).* 2021;8(9):804.
- [37] Jiao R, Peng X, Wang B, Du Y, Qian EW, Li J. Highly efficient and economical one-pot two-step multienzymatic synthesis of 6'/3'-sialyllactosamine from in situ-produced N-acetyllactosamine. *J Agric Food Chem.* 2025; 73(23): 14444-14452.
- [38] Laursen MF, Pekmez CT, Larsson MW, et al. Maternal milk microbiota and oligosaccharides contribute to the infant gut microbiota assembly. *ISME Commun.* 2021;1(1):21..
- [39] 刘雯娟,彭晶,程海娜,等. 母乳低聚糖的生物合成研究进展[J]. *中国食品学报*,2024,24(11):388-398.
- Liu WX, Peng J, Cheng HN, et al. Research progress on the biosynthesis of human milk oligosaccharides. *J Chin Inst Food Sci Technol.* 2024;24(11):388-398..
- [40] 王司琪,张宇,彭小雨,等. 母乳中的活性成分——HMOs对机体的益处及应用现状[J]. *食品研究与开发*,2025,46(06): 191-196.
- Wang SQ, Zhang Y, Peng XY, et al. Active components in human milk—benefits and applications of human milk oligosaccharides (HMOs). *Food Res Dev.* 2025;46(6):191-196.
- [41] Xiao M, Tang L, Fu X, et al. Structural characterization of bacterial fucose-containing tetrasaccharide and its potential enhancement on intestinal barrier function. *Food Biosci.* 2025; 66:106256.
- [42] Wang M, Monaco MH, Daniels VC, et al. Individual and Combined Effects of 2'-Fucosyllactose and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* on the Gut Microbiota Composition of Piglets. *J Nutr.* 2025;155(2):509-522.
- [43] An P, Lan D, Feng D, et al. Quantitative nuclear magnetic analysis of human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose in complicated food matrices. *Food Chem.* 2025;473:142821.
- [44] Pitt J, Bond J, Roper J, et al. A 21-day safety evaluation of biotechnologically produced 3-fucosyllactose (3-FL) in neonatal farm piglets to support use in infant formulas. *Food Chem Toxicol.* 2024;187:114592.
- [45] Cheng L, Akkerman R, Kong C, Walvoort MTC, de Vos P. More than sugar in the milk: human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021;61(7):1184-1200.
- [46] Bode L. Human Milk Oligosaccharides: Next-Generation Functions and Questions. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2019; 90:191-201.
- [47] Wu S, Tao N, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J Proteome Res.* 2010;9(8):4138-4151.
- [48] Qian Q, Yang L, Zhao C, et al. Highly efficient production of lacto-N-tetraose in plasmid-free *Escherichia coli* through chromosomal integration of multicopy key glycosyltransferase genes. *Int J Biol Macromol.* 2025;284(Pt 1):137987.
- [49] Slater AS, McDonald AG, Hickey RM, Davey GP. Glycosyltransferases: glycoengineers in human milk oligosaccharide synthesis and manufacturing. *Front Mol Biosci.* 2025;12:1587602.
- [50] Conze DB, Kruger CL, Symonds JM, et al. Weighted analysis of 2'-fucosyllactose, 3-fucosyllactose, lacto-N-tetraose, 3'-sialyllactose, and 6'-sialyllactose concentrations in human milk. *Food Chem Toxicol.* 2022;163:112877.
- [51] Orczyk-Pawilowicz M, Lis-Kuberka J. The Impact of Dietary Fucosylated Oligosaccharides and Glycoproteins of Human Milk on Infant Well-Being. *Nutrients.* 2020;12(4):1105.
- [52] Li Y, Du G, Chen J, Lv X, Liu L. Glycosyltransferases in human milk oligosaccharide synthesis: structural mechanisms and rational design. *Curr Opin Biotechnol.* 2025;93:103315.
- [53] Sheng M, Liu Y, Zhu Y, Wang R, Zhang W, Mu W. Efficient biosynthesis of sialyllacto-N-tetraose a by a metabolically engineered *Escherichia coli* BL21(DE3) strain. *J Agric Food Chem.* 2025;73(11):6820-6827.
- [54] 张新景. 石家庄地区乳母乳汁中低聚糖含量检测及其影响因素分析[D]. 河北医科大学,2020
- Zhang X J. Detection of oligosaccharide content in breast milk of lactating women in Shijiazhuang area and analysis of influencing factors[D]. Hebei Medical University, 2020.
- [55] 周钰,姜珊,王淑霞,等. 母乳低聚糖水平与6月龄内婴儿体格生长的关系[J]. *卫生研究*,2025,54(03):358-365
- Zhou Y, Jiang S, Wang SX, et al. Relationship between human milk oligosaccharide levels and physical growth of infants within 6 months of age. *J Hyg Res.* 2025;54(3):358-365.
- [56] Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr.* 2012;3(3):383S-91S.
- [57] Wu S, Grimm R, German JB, Lebrilla CB. Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *J Proteome Res.* 2011;10(2):856-868..
- [58] Duman H, Bechelany M, Karav S. Human Milk Oligosaccharides: Decoding Their Structural Variability, Health Benefits, and the Evolution of Infant Nutrition. *Nutrients.* 2024;17(1):118.
- [59] Zhou Q, Lu S, Feng K, et al. Comparative effect of sialic acid and 3'-sialyllactose on fecal microbiota fermentation and prebiotic activity in ETEC-challenged IPEC-J2 cells. *J Sci*

- Food Agric. 2025;105(12):6615-6629. .
- [60] 游星,郭进,张洪涛,等. 基于混菌耦合发酵策略合成3'-唾液酸乳糖[J]. 食品与发酵工业,2021,47(17):8-14
You X, Guo J, Zhang HT, et al. Biosynthesis of 3'-sialyllactose using a mixed-culture coupling fermentation strategy. Food Ferment Ind. 2021;47(17):8-14.
- [61] Weishaupt M, Eller S, Seeberger PH. Solid phase synthesis of oligosaccharides. Methods Enzymol. 2010;478:463-484.
- [62] Seeberger PH, Werz DB. Automated synthesis of oligosaccharides as a basis for drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(9):751-763.
- [63] Routenberg Love K, Seeberger PH. Automated solid-phase synthesis of protected tumor-associated antigen and blood group determinant oligosaccharides. Angew Chem Int Ed Engl. 2004;43(5):602-605.
- [64] Gilbert M, Bayer R, Cunningham AM, et al. The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion. Nat Biotechnol. 1998;16(8):769-772.
- [65] 靳文斌,张潇潇,李玉,等. 合成唾液酸乳糖重组大肠杆菌的构建[J]. 生物技术通报, 2014, 10:201-206.
Jin WB, Zhang XX, Li Y, et al. Construction of recombinant Escherichia coli for sialyllactose synthesis. Biotechnol Bull. 2014, 10:201-206.
- [66] Endo T, Koizumi S, Tabata K, Ozaki A. Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling. Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 53(3): 257-261..
- [67] 杨双红. 利用微生物合成唾液酸寡糖的研究进展[J]. 齐鲁渔业, 2015, 32(5): 51-52.
Yang SH. Research advances in microbial synthesis of sialyloligosaccharides. J Shandong Fish. 2015;32(5):51-52.
- [68] Lee SG, Lee JO, Yi JK, Kim BG. Production of cytidine 5' -monophosphate N-acetylneuraminic acid using recombinant Escherichia coli as a biocatalyst. Biotechnol Bioeng. 2002; 80(5):516-524.
- [69] Han NS, Kim TJ, Park YC, Kim J, Seo JH. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. Biotechnol Adv. 2012;30(6):1268-1278.
- [70] Vibhute AM, Komura N, Tanaka HN, Imamura A, Ando H. Advanced Chemical Methods for Stereoselective Sialylation and Their Applications in Sialoglycan Syntheses. Chem Rec. 2021;21(11):3194-3223.
- [71] Adak AK, Yu CC, Liang CF, Lin CC. Synthesis of sialic acid-containing saccharides. Curr Opin Chem Biol. 2013; 17(6): 1030-1038.
- [72] Chen J, Hansen T, Zhang QJ, et al. 1-Picolinyl-5-azido Thiosialosides: Versatile Donors for the Stereoselective Construction of Sialyl Linkages. Angew Chem Int Ed Engl. 2019;58(47):17000-17008.
- [73] Cao H, Chen X. General consideration on sialic acid chemistry. Methods Mol Biol. 2012;808:31-56..
- [74] Nielsen MM, Pedersen CM. Catalytic Glycosylations in Oligosaccharide Synthesis. Chem Rev. 2018; 118(17): 8285-8358..
- [75] Li C, Liu Z, Li M, Miao M, Zhang T. Review on bioproduction of sialylated human milk oligosaccharides: synthesis methods, physiologic functions, and applications. Carbohydr Polym. 2025;352:123177.
- [76] Juge N, Tailford L, Owen CD. Sialidases from gut bacteria: a mini-review. Biochem Soc Trans. 2016;44(1):166-175.
- [77] 孟欣. 双唾液酸化四糖抗原表位的化学酶法合成研究[D]. 山东:山东大学,2014.
Meng X. Chemoenzymatic synthesis of disialylated tetrasaccharide antigen epitopes [D]. Jinan: Shandong University; 2014..
- [78] Tanaka H, Ito F, Iwasaki T. A system for sialic acid transfer by colomonic acid and a sialidase that preferentially hydrolyzes sialyl alpha-2,8 linkages. Biosci Biotechnol Biochem. 1995;59(4):638-643.
- [79] Guo Y, Jers C, Meyer AS, et al. A Pasteurella multocida sialyltransferase displaying dual trans-sialidase activities for production of 3'-sialyl and 6'-sialyl glycans. J Biotechnol. 2014; 170:60-67.
- [80] 韩乐闪,于潇頔,栾庆民,等. 唾液酸乳糖的功能及制备研究进展[J]. 中国食品添加剂,2024,35(12):242-250.
Han LS, Yu XD, Luan QM, et al. Research progress on the functionality and preparation of sialyllactose. China Food Addit. 2024;35(12):242-250.
- [81] Westers L, Westers H, Quax WJ. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochim Biophys Acta. 2004;1694(1-3):299-310.
- [82] 朱咏莲. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌合成3'-唾液酸乳糖[D]. 江南大学,2023.
Zhu Y L. Metabolic engineering of Bacillus subtilis for 3'-sialyllactose production[D]. Jiangnan University, 2023.
- [83] Efficient production of 3'-sialyllactose using escherichia coli | journal of agricultural and food chemistry. Accessed August 16, 2025.
- [84] Liu Y, Chen X, Lv X, Yuan L, Wu J, Yao J. Engineered Escherichia coli as a Microbial Cell Factory for De Novo 6'-Sialyllactose Biosynthesis. J Agric Food Chem. 2025;73(25): 15880-15888.
- [85] Li C, Li M, Hu M, Miao M, Zhang T. Metabolic engineering of escherichia coli for high-titer biosynthesis of 3'-sialyllactose. J Agric Food Chem. 2024;72(10):5379-5390.
- [86] Priem B, Gilbert M, Wakarchuk WW, Heyraud A, Samain E. A new fermentation process allows large-scale production of

- human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology*. 2002;12(4):235-240.
- [87] Fierfort N, Samain E. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. *J Biotechnol*. 2008;134(3-4):261-265.
- [88] Zhang J, Zhu Y, Zhang W, Mu W. Efficient Production of a Functional Human Milk Oligosaccharide 3'-Sialyllactose in Genetically Engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*. 2022;11(8):2837-2845.
- [89] Liu Y, Zhu Y, Qiao L, et al. *Simonsiella muelleri* α 2, 6-sialyltransferase enables efficient biosynthesis of 6'-sialyllactose in both plasmid-dependent and plasmid-free engineered *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol*. 2025;320(Pt 1):145718.
- [90] 黄传超,邓阳. 代谢工程改造大肠杆菌合成3'-唾液酸乳糖[J/OL]. *食品与发酵工业*,1-11[2025-05-29].
Huang CC, Deng Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 3'-sialyllactose synthesis [J/OL]. *Food Ferment Ind*. 2025:1-11 [2025-05-29].
- [91] 周文,游星,张洪涛,等. 多细胞耦合转化N-乙酰氨基葡萄糖和乳糖生产唾液酸乳糖[J]. *生物工程学报*,2023,39(11):4621-4634.
Zhou W, You X, Zhang HT, et al. Multi-cell coupling conversion of N-acetylglucosamine and lactose for sialyllactose production [J]. *Chin J Biotechnol*. 2023;39(11):4621-4634.
- [92] Zhang Z, Zhang H, Wang Z, et al. A Cellular Coupling Strategy Leveraging Pathway Modularization and Cofactor Regeneration for the Biosynthesis of 3'-Sialyllactose. *J Agric Food Chem*. 2025;73(29):18380-18389.
- [93] Zhao M, Zhu Y, Wang H, Zhang J, Xu W, Mu W. Efficient Production of N-Acetylneuraminic Acid in *Escherichia coli* Based on the UDP-N-Acetylglucosamine Biosynthetic Pathway. *J Agric Food Chem*. 2023;71(28):10701-10709.
- [94] Liu Y, 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 Agric Food Chem*. 2025;73(9):5376-5384.
- [95] Zhu Y, Zhang J, Zhang W, Mu W. Recent progress on health effects and biosynthesis of two key sialylated human milk oligosaccharides, 3'-sialyllactose and 6'-sialyllactose. *Biotechnol Adv*. 2023;62:108058.
- [96] 陈奇. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效合成6'-唾液酸乳糖[D]. 江南大学,2024.
Chen Q. High-efficiency biosynthesis of 6'-sialyllactose through metabolic engineering of *Bacillus subtilis*[D]. Jiangnan University, 2024.
- [97] Mao S, Zhao A, Jiang H, et al. Patterns of Human Milk Oligosaccharides in Mature Milk Are Associated with Certain Gut Microbiota in Infants. *Nutrients*. 2024;16(9):1287..
- [98] Kang J, Gu P, Wang Y, et al. Engineering of an N-acetylneuraminic acid synthetic pathway in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2012;14(6):623-629..
- [99] EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck D, Bohn T, et al. Safety of 3'-sialyllactose (3'-SL) sodium salt produced by a derivative strain (*Escherichia coli* NEO3) of *E. coli* W (ATCC 9637) as a Novel Food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J*. 2023;21(9):e08224
- [100] Bénet T, Frei N, Spichtig V, Cuany D, Austin S. Determination of Seven Human Milk Oligosaccharides (HMOs) in Infant Formula and Adult Nutritionals: First Action 2022.07. *J AOAC Int*. 2024;107(2):286-302.
- [101] Yang M, Jiang Z, Zhou L, et al. 3'-Sialyllactose and *B. infantis* synergistically alleviate gut inflammation and barrier dysfunction by enriching cross-feeding bacteria for short-chain fatty acid biosynthesis. *Gut Microbes*. 2025;17(1):248651.
- [102] Ding J, Ouyang R, Zheng S, et al. Effect of Breastmilk Microbiota and Sialylated Oligosaccharides on the Colonization of Infant Gut Microbial Community and Fecal Metabolome. *Metabolites*. 2022;12(11):1136.
- [103] Bajic D, Wiens F, Wintergerst E, Deyaert S, Baudot A, Van den Abbeele P. HMOs Exert Marked Bifidogenic Effects on Children's Gut Microbiota Ex Vivo, Due to Age-Related Bifidobacterium Species Composition. *Nutrients*. 2023;15(7):1701.
- [104] Zhu L, Wang M, Li H, et al. Supplementation of 3'-Sialyllactose During the Growth Period Improves Learning and Memory Development in Mice. *J Agric Food Chem*. 2024;72(44):24518-24529.
- [105] Golden RK, Sutkus LT, Donovan SM, Dilger RN. Dietary supplementation of 3'-sialyllactose or 6'-sialyllactose elicits minimal influence on cognitive and brain development in growing pigs. *Front Behav Neurosci*. 2024;17:1337897.
- [106] Thomson P, Medina DA, Garrido D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiol*. 2018;75:37-46.
- [107] Bauer J, Osborn HM. Sialic acids in biological and therapeutic processes: opportunities and challenges. *Future Med Chem*. 2015;7(16):2285-2299.
- [108] Kim J, Kim YJ, Kim JW. Bacterial Clearance Is Enhanced by α 2,3- and α 2,6-Sialyllactose via Receptor-Mediated Endocytosis and Phagocytosis. *Infect Immun*. 2018;87(1):e00694-18.
- [109] Kang LJ, Kwon ES, Lee KM, et al. 3'-Sialyllactose as an inhibitor of p65 phosphorylation ameliorates the progression of experimental rheumatoid arthritis. *Br J Pharmacol*. 2018;175(23):4295-4309.
- [110] Duan Q, Yu B, Huang Z, et al. Sialyllactose Attenuates Inflammation and Injury of Intestinal Epithelial Cells upon

- Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection. *Int J Mol Sci.* 2025; 26(8):3860.
- [111] Park DB, Kim L, Hwang JH, et al. Temporal quantitative profiling of sialyllactoses and sialic acids after oral administration of sialyllactose to mini-pigs with osteoarthritis. *RSC Adv.* 2023;13(2):1115-1124.
- [112] Yamabe M, Kaihatsu K, Ebara Y. Binding inhibition of various influenza viruses by sialyllactose-modified trimer DNAs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29(5):744-748.
- [113] Cooper P, Bolton KD, Velaphi S, et al. Early Benefits of a Starter Formula Enriched in Prebiotics and Probiotics on the Gut Microbiota of Healthy Infants Born to HIV+ Mothers: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Clin Med Insights Pediatr.* 2017;10:119-130.
- [114] Lim B, Kim KS, Ahn JY, Na K. Overcoming antibiotic resistance caused by genetic mutations of *Helicobacter pylori* with mucin adhesive polymer-based therapeutics. *Biomaterials.* 2024;308:122541.
- [115] Schelch S, Zhong C, Petschacher B, Nidetzky B. Bacterial sialyltransferases and their use in biocatalytic cascades for

sialo-oligosaccharide production. *Biotechnol Adv.* 2020; 44: 107613.



通讯作者: 张洪涛(1979—),男,博士,副教授,博士生导师,研究方向为功能糖的生物合成及其与益生菌的协同效应研究。

E-mail: htzhang@jiangnan.edu.cn



第一作者: 赖霞(2001—),女,硕士研究生。研究方向为以廉价碳源为底物合成功能寡糖链。

E-mail: 1265518031@qq.com