

· 综述 ·

# 利用大肠杆菌合成 3'-和 6'-唾液酸乳糖的研究进展

吕欣洋<sup>1,2,3</sup>, 陈祥松<sup>1,2,3</sup>, 姚建铭<sup>1,2,3</sup>, 吴金勇<sup>1,3\*</sup>, 袁丽霞<sup>3</sup>

1 淮南新能源研究中心 安徽 淮南 232000

2 中国科学技术大学 安徽 合肥 230000

3 中国科学院合肥物质科学研究院 安徽 合肥 230000

吕欣洋, 陈祥松, 姚建铭, 吴金勇, 袁丽霞. 利用大肠杆菌合成 3'-和 6'-唾液酸乳糖的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2846-2865.

LYU Xinyang, CHEN Xiangsong, YAO Jianming, WU Jinyong, YUAN Lixia. Research progress in the synthesis of 3'- and 6'-sialactose by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2846-2865.

**摘要:** 人乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是母乳中一类结构复杂的聚糖, 其作为母乳中的第三大固体成分, 在婴幼儿肠道健康和免疫系统发育中具有重要作用。其中, 唾液酸化的 HMOs 是主要成分之一, 主要包括 3'-唾液酸乳糖(3'-sialactose, 3'-SL)和 6'-唾液酸乳糖(6'-sialactose, 6'-SL), 这两者在免疫调节、抗炎以及促进益生菌生长等方面发挥着重要作用。因为唾液酸乳糖在婴幼儿食品中的营养价值和应用潜力, 利用廉价易得的原料通过微生物发酵制备高浓度唾液酸乳糖成为当前研究热点。本文综述了 3'-SL-和 6'-SL 的功能及其生物合成技术, 并详细介绍了利用大肠杆菌合成唾液酸乳糖的研究进展, 为未来实现相关工业生产提供了有益的启示。

**关键词:** 人乳低聚糖; 唾液酸乳糖; 生物制造; 微生物发酵

## Research progress in the synthesis of 3'- and 6'-sialactose by *Escherichia coli*

LYU Xinyang<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xiangsong<sup>1,2,3</sup>, YAO Jianming<sup>1,2,3</sup>, WU Jinyong<sup>1,3\*</sup>, YUAN Lixia<sup>3</sup>

1 Huainan New Energy Research Center, Huainan 232000, Anhui, China

2 University of Science and Technology of China, Hefei 230000, Anhui, China

3 Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230000, Anhui, China

**Abstract:** Human milk oligosaccharides (HMOs) are a structurally complex group of unbound polysaccharides, representing the third-largest solid component in breast milk. They play a

资助项目: 安徽省博士后研究人员科研活动资助经费(2020B440)

This work was supported by the Anhui Province Postdoctoral Researchers Scientific Research Activities Funding (2020B440).

\*Corresponding author. E-mail: jywu@ipp.ac.cn

Received: 2023-11-27; Accepted: 2024-04-19

crucial role in the intestinal health and immune system development of infants. Sialylated HMOs, including 3'-sialactose (3'-SL) and 6'-sialactose (6'-SL), are major components of HMOs, playing significant roles in immune regulation, anti-inflammatory processes, and promotion of probiotic growth. Currently, the cost-effective production of high-value sialactose by microbial fermentation with readily available raw materials has become a research hotspot due to the high nutritional value and potential applications of sialylated HMOs in infant food. This paper summarizes the functions and biosynthesis of 3'-SL and 6'-SL. Furthermore, it reviews the research progress in the synthesis of sialactose by *Escherichia coli*, offering valuable insights for future industrial production.

**Keywords:** human milk oligosaccharides; sialactose; bio-manufacturing; microbial fermentation

人乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是指存在于人乳中的一系列低分子量糖类化合物,是人乳中除乳糖、脂肪之外的第三大固形成分<sup>[1]</sup>,主要由 5 种单体,即 D-葡萄糖、D-半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、L-岩藻糖和 N-乙酰神经氨酸(唾液酸),以不同比例结合形成<sup>[2]</sup>。迄今已发现 200 多种不同的 HMOs,其浓度随着哺乳周期呈现递减趋势:初乳中 HMOs 的浓度约为 20–25 g/L,而哺乳后期的浓度会降至 5–20 g/L<sup>[3-4]</sup>。

目前,人乳低聚糖已被批准用于婴幼儿奶粉和功能性食品中,具有广泛的应用前景。根据不同的化学结构,HMOs 主要可分为以下 3 类:(1) 中性核心型 HMO,其中乳糖-N-四糖(lacto-N-tetraose, LNT)和乳糖-N-新四糖(lacto-N-neotetraose, LNnT)为核心基础结构;(2) 富含岩藻糖型 HMO,其基础结构在中性核心型 HMO 上连接岩藻糖残

基,如 2'-岩藻糖基乳糖(2'-sialactose, 2'-FL)、3-岩藻糖基乳糖(3-fucosyllactose, 3-FL)和二岩藻糖基乳糖(difucosyllactose, DFL)等;(3) 富含唾液酸型 HMO,如 3'-唾液酸乳糖(3'-sialactose, 3'-SL)和 6'-唾液酸乳糖(6'-sialactose, 6'-SL)等<sup>[5-6]</sup>。

在 HMOs 的研究中,唾液酸乳糖(sialactose, SL)逐渐受到了研究人员关注。SL 具有多种生物活性和功能,如免疫调节、抗炎、促进益生菌生长和抗肿瘤作用。它广泛分布于动物体内的多种组织液和体液中,包括唾液、乳汁、精液和血液等。根据唾液酸(sialic acid, Neu5Ac, SA)与乳糖结合糖苷键位置的不同,可将 SL 分为 3'-SL 和 6'-SL<sup>[7]</sup>,二者的结构式如图 1 所示。由于泌乳阶段的不同,HMOs 含量在 5–23 g/L 之间,酸性人乳低聚糖约占人乳低聚糖总量的 13%,其中,3'-SL 含量约为 2%,而 6'-SL 含量约为 6%<sup>[8]</sup>。

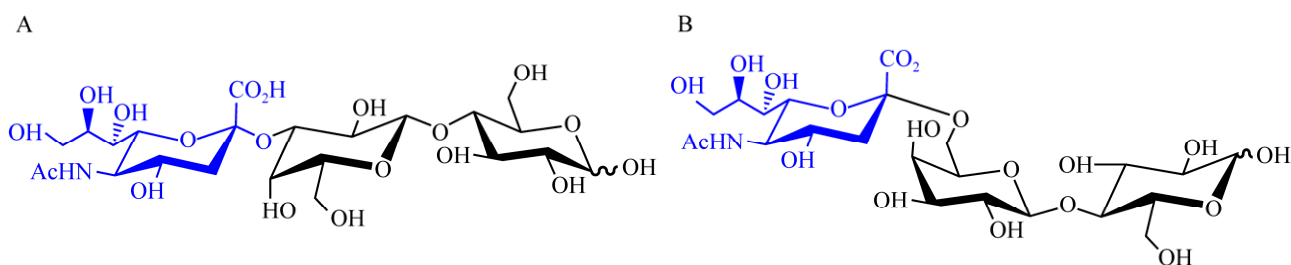


图 1 唾液酸乳糖结构式 A: 3'-唾液酸乳糖. B: 6'-唾液酸乳糖

Figure 1 Structural formula of sialactoses. A: 3'-sialactose. B: 6'-sialactose.

产量高、成本低以及绿色环保的 SL 合成研究路线对其商业化应用至关重要。早期研究人员尝试使用化学合成法, 然而其效率较低并且具有一定毒性, 不利于在食品领域应用。近年来, 将大肠杆菌作为工程宿主, 通过基因工程改造代谢通路的方法进行生物制备成为了研究重点。本文对利用大肠杆菌合成 3'-SL 和 6'-SL 的生物合成路线进行综述, 并深入讨论了合成路线的改良方法及未来发展趋势。

## 1 功能与应用

HMOs 在小肠中不被消化, 是刺激特定双歧杆菌菌群生长的重要益生元<sup>[9]</sup>, 并且完整的 HMOs 可被肠道微量吸收从而具有免疫调节作用<sup>[10]</sup>, 因此各界认为其对婴幼儿的健康发育起到重要作用。然而, 由于从人体体液中纯化、采用化学合成或通过酶催化合成获得大量 HMOs 较为困难<sup>[11]</sup>, 目前对于 HMOs 的深入研究仍存在一定挑战。3'-SL 和 6'-SL 作为唾液酸乳糖的两种形式, 在免疫调节、肠道菌群互作、抗病毒和抗肿瘤等方面展现出较高的生物活性和应用潜力, 对它们的深入研究有助于进一步理解其作用机制, 并推动其在人体健康领域的应用。

### 1.1 免疫调节功能

免疫学研究揭示了 3'-SL 和 6'-SL 在多种途径中对免疫系统的调节作用。具体而言, 这两种分子能够促进免疫细胞的激活和增殖, 包括增强自然杀伤细胞和巨噬细胞的活性以及促进 T 细胞的增殖和分化<sup>[12]</sup>。这些效应可能通过与细胞表面的唾液酸受体相互作用而实现, 进而对炎症反应进行调节。此外, 3'-SL 和 6'-SL 能够调节免疫细胞产生的细胞因子, 例如提高细胞内的干扰素水平, 同时抑制炎症介质的释放, 从而对炎症反应进行有效调控。在增强免疫应

答方面, 3'-SL 和 6'-SL 的免疫调节功能对于维持免疫平衡、预防过敏和自身免疫性疾病具有重要意义。例如, 3'-SL 和 6'-SL 因其抗氧化性质, 能够减轻由白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导的氧化应激以及对 SW1353 软骨细胞的不良影响, 从而保护这些细胞免受 IL-1 $\beta$  诱导的氧化应激和炎症刺激<sup>[13-14]</sup>。这表明 3'-SL 和 6'-SL 在治疗和预防骨关节炎等炎症性疾病中可能具有潜在的临床效益。3'-SL 和 6'-SL 通过多种机制参与免疫系统的调控, 对于维持机体免疫平衡和预防相关疾病具有重要作用。这些发现为 3'-SL 和 6'-SL 在医学领域的进一步研究和应用奠定了理论基础。

### 1.2 肠道保护作用

肠道菌群是人体肠道内共生的微生物群落, 与宿主的健康密切相关。3'-SL 和 6'-SL 在肠道内与肠道菌群密切互作, 对肠道菌群的组成和功能有重要影响。研究表明, 3'-SL 和 6'-SL 可以作为益生元, 促进如双歧杆菌和拟杆菌等有益菌的增长和繁殖, 并影响相关代谢产物的变化<sup>[15]</sup>。在模拟人体肠道微生物生态系统的体外消化模型中, 3'-SL 与克鲁迪克双歧杆菌(*Bifidobacterium crudilactis*) FR/62/b/3 协同作用, 促进双歧杆菌的增长, 从而对婴幼儿肠道菌群产生积极影响<sup>[16]</sup>。研究表明, 在婴儿营养不良模型中, 唾液酰化的 HMOs 可以促进微生物生长, 进而增强对多种营养物质的代谢合成能力<sup>[17]</sup>。同时, 3'-SL 和 6'-SL 还可以抑制有害菌的增殖, 例如大肠杆菌等。这种调节作用有助于维持肠道菌群的平衡, 促进肠道健康。因此, 3'-SL 和 6'-SL 对肠道菌群和宿主健康具有双重益处, 是极具应用潜力的功能性益生元, 其在功能食品和医学营养品中的开发利用, 有望成为肠道微生态调节和疾病防治的新策略。SA 和 LNT 结合形成的二唾液酸乳糖-N-四糖(disialyllacto-N-tetraose, DSLNT)与

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)的发病风险密切相关。美国的一项临床病例研究对 200 名母亲及其极低出生体重的婴儿进行了观察,发现在几乎所有坏死性小肠结肠炎(NEC)病例中,母乳中的 DSLNT 浓度显著低于健康对照组,这一发现表明,DSLNT 浓度的降低可以作为 NEC 发病前的一个重要生物标志物<sup>[18]</sup>。NEC 的一个关键病理特征是肠上皮紧密连接的损伤,而 ZO-1 蛋白被认为是 NEC 药物治疗的一个潜在靶点,DSLNT 通过调节肠上皮中 ZO-1 的表达以及紧密连接的完整性,对新生儿的肠道健康起到保护作用,因此被认为是一种天然的肠道屏障调节物质<sup>[19]</sup>。

### 1.3 抗病毒作用

3'-SL 和 6'-SL 被认为具有显著的抗病毒活性,能够有效抑制多种病毒的感染。它们通过多种机制发挥抗病毒作用,从而显示出潜在的应用前景。首先,3'-SL 和 6'-SL 可以通过竞争性结合病毒受体位点,阻止病毒与宿主细胞结合和入侵。这种竞争性结合病毒受体的机制已经在研究中得到证实。例如,研究发现唾液酸基的 HMOs 可以模拟细胞表面上的唾液酸,与病毒的唾液酸受体结合,从而阻止病毒进入宿主细胞;其次,3'-SL 和 6'-SL 可以增强宿主细胞的抗病毒免疫应答,包括增加干扰素的产生和抗病毒蛋白的表达,这种免疫应答的增强有助于宿主细胞更有效地对抗病毒感染;唾液酰化的 HMOs 能够激活免疫细胞,并诱导它们产生干扰素等抗病毒蛋白,以增强宿主细胞对抗病毒入侵的能力,这种免疫应答的增强有助于减轻病毒感染的严重性;同时 3'-SL 和 6'-SL 可以调节炎症反应,减轻病毒感染引起的炎症损伤,这种炎症调节作用有助于保护宿主组织免受病毒感染引发的炎症性损害<sup>[20]</sup>。值得注意的是,研究显示,冠状病毒病(COVID-19)是由严重急性

呼吸综合征冠状病毒-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)所引起,研究人员推测,宿主细胞表面的唾液酸可能是 SARS-CoV-2 的共同受体或附着因子<sup>[21]</sup>。因此,唾液酰化糖类物质可能对 SARS-CoV-2 病毒具有潜在的抗病毒活性。这进一步证明了 3'-SL 和 6'-SL 在预防和治疗病毒感染方面的重要性,特别是在婴幼儿保健和抗病毒药物研发领域。

### 1.4 抗肿瘤活性

3'-SL 和 6'-SL 被发现具有潜在的抗肿瘤活性,可以抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭,能够通过多种机制发挥抗肿瘤作用。首先,3'-SL 和 6'-SL 可以诱导肿瘤细胞凋亡,促使肿瘤细胞死亡。凋亡对于控制肿瘤细胞的生长和扩散至关重要,因此肿瘤细胞凋亡的增加有助于抑制肿瘤的进展。其次,3'-SL 和 6'-SL 能够抑制肿瘤细胞的增殖和迁移,从而减少肿瘤的侵袭和转移。这种抗增殖和抗迁移作用有助于减缓肿瘤的发展和蔓延。此外,3'-SL 和 6'-SL 还可以调节与肿瘤相关的信号通路,如 PI3K/Akt 和核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)等,通过干预这些信号通路,3'-SL 和 6'-SL 可以抑制肿瘤的生长和发展<sup>[22]</sup>。这种调节作用为开发新的抗肿瘤治疗策略提供了潜在的思路和可能。尽管 3'-SL 和 6'-SL 的抗肿瘤作用机制仍需进一步深入研究,但它们的潜在抗肿瘤活性已经引起了研究人员的广泛兴趣。这为开发抗肿瘤治疗策略提供了新的方向,并可能有助于改善肿瘤治疗的效果。

### 1.5 大脑发育

对于婴幼儿而言,及时供应唾液酸化糖类物质可能有助于在早期生命阶段预防一系列健康问题。一项研究通过向小鼠饮食中添加 3'-SL 和 2'-FL,并与未摄入这些物质的小鼠进行对比,发现未摄入 3'-SL 的小鼠在食物奖励区域的

大脑功能受到了影响,表现出食欲控制受损,导致了其饮食习惯改变,这一观察结果对于未来预防或治疗肥胖问题具有重要的启发和意义<sup>[23]</sup>。唾液酸乳糖在人的认知发展中扮演着重要角色,特别是与新生儿早期大脑发育密切相关。一项研究探讨了小鼠是否具备合成 6'-SL 的能力,并对某些行为参数进行了调查,研究结果显示,哺乳期失去唾液化糖苷的小鼠在中枢神经系统的执行能力上长期受到影响,进而导致认知功能障碍<sup>[24]</sup>。近期首例临床试验数据表明,3'-SL 的摄入含量与婴幼儿语言发展之间存在着正相关关系<sup>[25]</sup>。因此,唾液酸乳糖对婴幼儿大脑发育和认知功能的支持作用日益凸显,相关研究成果为唾液酸乳糖在婴幼儿配方食品中的应用提供了充分的科学依据。

## 2 生物合成法合成 3'-SL 和 6'-SL

目前,合成 3'-SL 和 6'-SL 的方法主要为化学合成法和生物合成法。其中,化学合成法由于其程序复杂等原因,仅适用于实验室规模研究,而生物合成法具备生产周期短、底物途径多样性等特点,为产业化制备提供了新的研究路线<sup>[26]</sup>。针对大规模合成的可能性,本文主要讨论了 3'-SL 和 6'-SL 的酶促合成法和微生物发酵法两种方案。

### 2.1 3'-SL 和 6'-SL 的酶促合成法

3'-SL 和 6'-SL 的酶促合成主要依赖两种策略。一种策略是利用唾液酸酶,其中包括外切- $\alpha$ -唾液酸酶(EC 3.2.1.18)和内切- $\alpha$ -唾液酸酶(EC 3.2.1.129)。外切- $\alpha$ -唾液酸酶具有反式唾液酸化的能力,以乳糖为受体,以唾液酸苷为供体,用于合成 3'-SL 和 6'-SL。由于唾液酸酶主要以水解的方式作用于唾液酸残基的糖苷键,在合成过程中,可能会限制那些涉及水解唾液酸残基的反应途径,目前,研究较多的另一种策略

是使用唾液酸转移酶(SiaTs, EC 2.4.99.-)。SiaTs 是一种广泛存在于哺乳动物、细菌和病毒中的酶,通常以可溶性蛋白质的形式分泌<sup>[27]</sup>,其能够利用胞苷 5'-单磷酸(cytidine 5'-monophosphate, CMP)激活的唾液酸作为供体底物与乳糖相结合,实现唾液酸的自然转移<sup>[28]</sup>。

#### 2.1.1 唾液酸酶合成法

1991年, Schenkman 等<sup>[29]</sup>从致病性寄生虫克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)中鉴定出一种独特的克氏锥虫唾液酸酶(*T. cruzi* trans-sialidase, TcTS),该酶可以直接催化外源高分子糖的唾液酸化,无需依赖 CMP-唾液酸(CMP-Neu5Ac)作为供体。在此基础上, Singh 等<sup>[30]</sup>发现 TcTS 可以有效催化  $\alpha$ -唾液酸残基从对硝基苯基唾液酸转移到含有  $\beta$ -半乳糖单元的受体,3'-SL 的产率达到了 87%。1993年 Pontes-de-Carvalho 等<sup>[31]</sup>发现了来自拉氏锥虫(*Trypanosoma rangeli*)的唾液酸酶(TrSA)是一种严格的水解酶,尽管其与 TcTS 显示出约 70%的氨基酸序列同源性,但其缺乏反式唾液酸酶活性。2014年, Michalak 等<sup>[32]</sup>将 TrSA 突变体进行催化反应提纯后获得了 3.6 g 的 3'-SL,摩尔产率约为 50%。除此之外,一些糖苷酶也被发现能在体外催化转糖基化反应,可用于寡糖合成。2018年 Guo 等<sup>[33]</sup>使用了来自脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*) NCTC9343 的一种具有较强的转糖基化活性和区域选择性的新型外切唾液酸酶,并利用成本较低的糖基供体来制备 6'-SL,其最大转化率高于 20%。这为目前利用酶促合成法获得 3'-SL 和 6'-SL 提供了一种有前景的替代方案。

#### 2.1.2 唾液酸转移酶合成法

早期的研究主要使用哺乳动物来源的 SiaTs 进行唾液酸化反应,随着研究的深入,细菌来源的 SiaTs 逐渐受到学者们的关注。以脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)为例,1997年

Gilbert 等<sup>[34]</sup>发现该细菌来源的  $\alpha$ 2,3-SiaT 在以 CMP-Neu5Ac 为供体时表现出很强的受体特异性。由于纯化的 *N. meningitidis* 来源的  $\alpha$ 2,3-SiaT 酶容易形成沉淀。相比之下, CMP-Neu5Ac 合成酶(EC 2.7.7.43)以可溶形式存在较为稳定。

为了提高  $\alpha$ 2,3-SiaT 酶的稳定性,降低供体 CMP-Neu5Ac 成本, Gilbert 等<sup>[35]</sup>进一步构建了  $\alpha$ 2,3-SiaT 和 CMP-Neu5Ac 合成酶的融合形式,这一融合酶比  $\alpha$ 2,3-SiaT 具有更高的溶解度和更低的成本,最终成功合成了 100 g 的 3'-SL。这种按顺序应用于合成复杂碳水化合物的多级酶联反应被称为一锅多酶(one pot of multiple enzymes, OPME)系统<sup>[36]</sup>。随着野生型酶和工程酶的可用性不断增加, OPME 方法的应用正在逐步普及。Yu 等<sup>[37]</sup>利用了来源于多杀巴斯德氏菌(*Photobacterium multocida*)的多功能唾液酸转移酶 tPm0188Ph, 在 OPME 系统中成功合成了 3'-SL, 其产率达到了 79%, 这一发现为唾液酸化合物的高效生产提供了新的途径。

1996 年, Yamamoto 等<sup>[38]</sup>首次发现了一种源自达姆塞尔巴斯德氏菌(*Photobacterium damsela*) JT0160 的唾液酸转移酶, 命名为 Pd2,6ST; 该酶能够在 CMP-Neu5Ac 分子的碳水化合物链上特异地将 Neu5Ac 添加到半乳糖残基的第 6 位; 尽管 Pd2,6ST 的催化活性相对较低, 但成功地利用乳糖和 Neu5Ac 合成了毫克级的 6'-SL。Choi 等<sup>[39]</sup>通过进行单点和双点突变, 研究获得了两种突变体: L433S/T 和 I411T/L433T; 这两种突变体的  $\alpha$ 2,6-SiaT 酶催化活性分别增加了 3 倍和 5 倍。

此外, 利用新兴技术对酶进行改造的方法也成为了新的突破口。2020 年, Mertsch 等<sup>[40]</sup>通过诱变法对来自出血败血性巴斯德菌(*Pasteurella multocida*) JT-ISH-467 的  $\alpha$ 2,3-SiaT 进行研究, 成功确定了 3 种变体, 其唾液酸转移催化效率提

高了 5 倍, 同时底物水解效率显著降低。这一重组酶能够在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中高效表达, 并可以通过亲和柱层析进行纯化, 还形成唾液酸偶联催化剂, 为改造和应用唾液酸转移酶提供了新的可能。2021 年, Schelch 等<sup>[41]</sup>基于数学建模策略, 开发了包含 Neu5Ac 合成酶和 CMP-Neu5Ac 合成酶催化活性的达可马巴斯德菌(*Pasteurella dagmatis*  $\alpha$ 2,3-SiaT, PdST)催化级联反应用于生产 3'-SL, 产量高达 10.4 g/L。

2022 年, Wang 等<sup>[42]</sup>通过蛋白工程手段提高了参与核苷酸代谢和三磷酸胞苷产生的关键酶胞苷单磷酸激酶(cytidine monophosphate kinase, CMK)的热稳定性; 同时, 对 CMK 进行定点突变, 构建了 CMK 的单点突变体和具有较高热稳定性的多点突变体, 以提高 3'-SL 的合成效率, 最终使产率提高了 33.6%。综上所述, 尽管源自细菌的 SiaTs 已经进行了一定的深入研究, 但它们在合成 3'-SL 和 6'-SL 的应用中仍然存在限制<sup>[43]</sup>。除了筛选出性状优良菌属的 SiaTs 至关重要以外, 对于如何通过基因工程手段进行设计改良以提高 SiaTs 的性能, 最终提高合成效率也是需要解决的一大问题。同时, 借助创新技术, 如采用一种单细胞超高通量筛选技术<sup>[44]</sup>, 有望提高 SiaTs 对底物的特异性和催化活性, 为提高生产效率提供新的思路。酶促合成 SLs 的生产技术方法如表 1 所示。利用突变体合成 3'-SL 和 6'-SL 具有巨大的发展潜力, 唾液酸转移酶合成 SLs 的路径如图 2 所示。

## 2.2 3'-SL 和 6'-SL 的微生物发酵法

酶促合成的成本昂贵, 仅适用于实验室规模的小批量生产, 不利于大规模产业化应用。因此, 引入关键酶改造底盘微生物同时利用廉价碳源如葡萄糖或者甘油直接发酵制备 3'-SL 和 6'-SL 变得尤为重要。微生物发酵法主要通过基因工程改造来构建合成途径, 优化合成策略<sup>[48]</sup>。

表 1 酶促合成 SLs 的生产技术方法

Table 1 Enzymatic synthesis techniques for the production of SLs

Enzymes	Substrates	Products	Yield	References
Sialidase	Sia-Sia dimer, Lac	6'-SL	20%–26%	[33]
Sialyltransferase	CMP-Sia (from mutant CMK), Lac	3'-SL	98%	[42]
Sialyltransferase	cGMP, Lac	3'-SL, 6'-SL	31%, 37%	[45]
Sialyltransferase	CMP-Sia, Lac	3'-SL, 6'-SL	72%, 75%	[46]
Transsialidase	GMP-Sia, Lac	3'-SL	28%–32%	[47]

cGMP: Casein glycomacropeptide; Lac: Lactose; CMP-Sia: CMP-sialic acid; GMP-Sia: GMP-sialic acid.

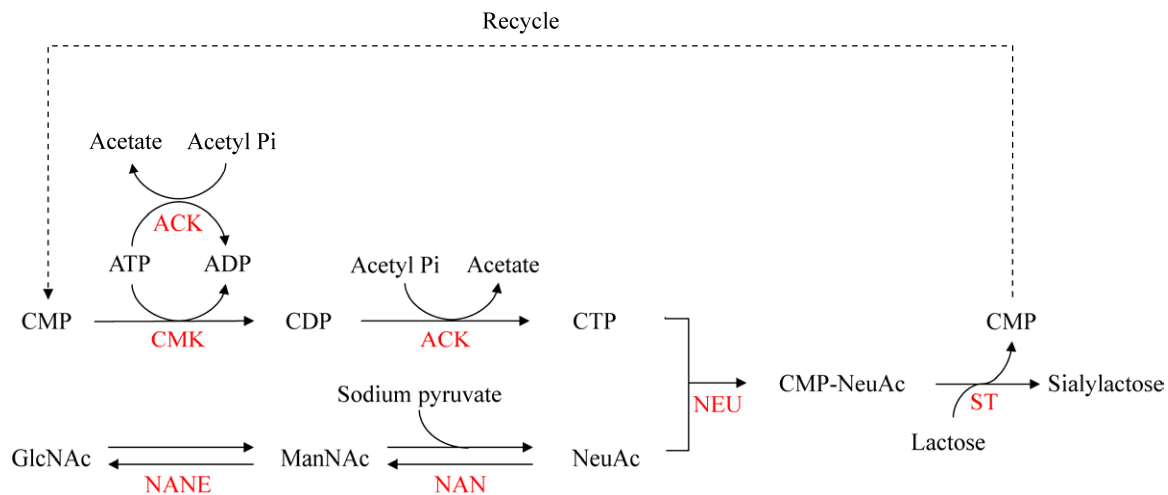


图 2 唾液酸转移酶策略合成 SLs 的路径

Figure 2 Pathway of synthesis of SLs by sialyltransferase strategy. CMP: Cytidine 5'-monophosphate; CDP: Cytidine 5'-diphosphate; CTP: Cytidine 5'-triphosphate; ATP: Adenosine 5'-triphosphate; ADP: Adenosine 5'-diphosphate; ManNAc: N-acetylmannosamine; GlcNAc: N-acetylglucosamine; Neu5Ac: N-acetylneuraminic acid; CMP-Neu5Ac: Cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid. ACK: Acetate kinase; CMK: CMP kinase; NANE: N-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase; NAN: N-acetylneuraminic lyase; NEU: Encoding CMP-Neu5Ac synthetase; ST: Encoding sialyltransferase.

目前, 通过工程菌株实现大规模产业化生产已相对成熟, 包括 HMOs 中的 LNnT、LNT、2'-FL、DFL、3-FL 等。因此, 利用微生物发酵法生产 3'-SL 和 6'-SL 具有巨大的潜力, SLs 的生物合成路线如图 3 所示。

微生物发酵法根据底物来源不同可分为从头合成路径和补救路径两种制备方法(表 2)。2002 年, Priem 等<sup>[49]</sup>首次揭示了 3'-SL 的生物合成过程, 通过改造 *E. coli* JM109 底盘菌株, 敲除 *nanA*、

*lacZ M15*, 并过表达了源自 *N. meningitidis* 的 CMP-Neu5Ac 合成酶基因 *CSS* 和  $\alpha$ 2,3-*SiaT* 基因, 在连续添加甘油、唾液酸和乳糖的发酵培养条件下, 最终产生了总产量为 2.6 g/L 的 3'-SL (其中细胞外 1.1 g/L, 细胞内 1.5 g/L), 这是目前唯一利用补救路径制备 3'-SL 的团队。在该生物合成过程中, 唾液酸供体(CMP-Neu5Ac) 由外源性唾液酸生成, 并通过渗透酶 *NanT* 转运到细胞中。



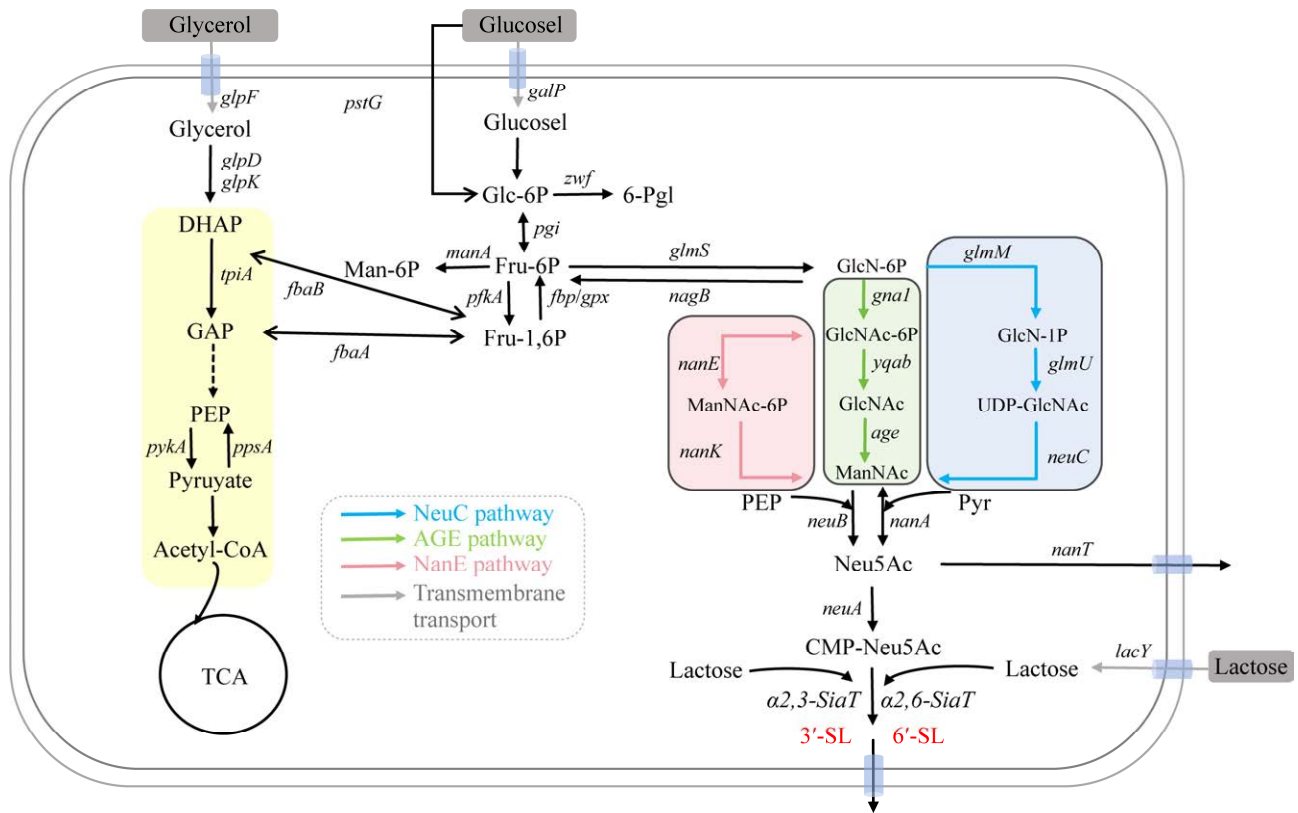


图 3 SLs 的生物合成路线

Figure 3 The biosynthetic pathway of SLs. DHAP: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate; GAP: Glyceraldehyde 3-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvic acid; TCA: Tricarboxylic acid cycle; Fru-6P: Fructose 6-phosphate; Fru-1,6P: Fructose 1,6-diphosphate; GlcN-6P: Glucosamine 6-phosphate; GlcN-1P: Glucosamine 1-phosphate; GlcNAc-1P: N-acetylglucosamine 1-phosphate; GlcNAc-6P: N-acetylglucosamine 6-phosphate; UDP-GlcNAc: Uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine; GlcNAc: N-acetylglucosamine; ManNAc-6P: N-acetylmannosamine 6-phosphate; ManNAc: N-acetylmannosamine; Man-6P: Mannose-6-phosphate; Neu5Ac: N-acetylneuraminic acid; CMP-Neu5Ac: Cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid; SL: Sialyllactose; *pfkA*: Encoding phosphofruktokinase; *fbp*: Encoding fructose-1,6-bisphosphatase; *glpx*: Encoding fructose-1,6-bisphosphatase II; *fbaAB*: Encoding fructose-bisphosphate aldolase; *tpiA*: Encoding triosephosphate isomerase; *pykA*: Encoding pyruvate kinase; *ppsA*: Encoding phosphoenolpyruvate synthetase; *lacY*: Encoding lactose permease; *nagA*: Encoding N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase; *nagB*: Encoding glucosamine-6-phosphate deaminase; *glmS*: Encoding glucosamine-6-phosphate synthase; *glmM*: Encoding phosphoglucosamine mutase; *glmU*: Encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase/glucosamine-1-phosphate acetyltransferase; *GNA1*: Encoding glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase; *nanK*: Encoding N-acetylmannosamine kinase; *nanE*: Encoding N-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase; *yqaB*: Encoding a phosphatase with high specificity for N-acetylglucosamine- 6-phosphate; *age*: Encoding N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase; *neuC*: Encoding UDP-GlcNAc 2-epimerase; *neuB*: Encoding Neu5Ac synthase; *nanA*: Encoding Neu5Ac aldolase; *neuA*: Encoding CMP-Neu5Ac synthetase; *nanT*: Encoding Neu5Ac transporter; *α2,3-SiaT*: Encoding α2,3-sialyltransferase; *α2,6-SiaT*: Encoding α2,6-sialyltransferase; *manA*: Encoding mannose-6-phosphate isomerase; *zwf*: Encoding glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase; *galP*: H<sup>+</sup> symporter; *glpD*: Encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenases; *glpF*: Encoding glycerol facilitator; *glpK*: Encoding glycerol kinase; *ptsG*: Encoding glucose-specific PTS enzyme IIBC component.



表 2 生物合成 SLs 的生产技术方法

Table 2 Biotechnological methods for the biosynthesis of SLs

Microbial hosts	Expressed genes	Cultivation	SLs biosynthesis	References
<i>E. coli</i> JM109	Overexpressed: <i>N. meningitidis</i> <i>CSS</i> and $\alpha 2,3$ - <i>SiaT</i> genes, <i>lacY</i> and <i>nanT</i> Deleted: <i>lacZ</i> <i>M15</i> and <i>nanA</i>	Glycerol, lactose, and Neu5Ac; fed-batch	3'-SL total titer, 2.6 g/L (E: 1.1 g/L and I: 1.5 g/L)	[49]
<i>E. coli</i> K12	Overexpressed: <i>neuC</i> , <i>neuB</i> and <i>neuA</i> from <i>C. jejuni</i> and $\alpha 2,3$ - <i>SiaT</i> -encoding genes from <i>N. meningitidis</i> Deleted: <i>lacZ</i> , <i>nanA</i> , <i>nanK</i> , <i>nanE</i> , <i>nanT</i> and <i>lacA</i>	Glycerol and lactose; fed-batch	3'-SL total titer, 25.5 g/L (E: 15.5 g/L and I: 10.0 g/L)	[50]
<i>E. coli</i> K12	Overexpressed: <i>neuC</i> , <i>neuB</i> and <i>neuA</i> from <i>C. jejuni</i> and $\alpha 2,6$ - <i>SiaT</i> -encoding gene from <i>Photobacterium</i> sp. JT-ISH-224 Deleted: <i>lacZ</i> , <i>nanA</i> and <i>nanK</i>	Glycerol and lactose; fed-batch	6'-SL total titer, 34 g/L (E: 23 g/L and I: 11 g/L)	[51]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expressed: <i>neuC</i> , <i>neuB</i> , and <i>neuA</i> from <i>C. jejuni</i> and $\alpha 2,3$ - <i>SiaT</i> -encoding genes from <i>Vibrio</i> sp. JT-FAJ-16 were expressed <i>via</i> plasmids Overexpressed: $\alpha 2,3$ - <i>SiaT</i> -encoding gene was integrated into genome Deleted: <i>lacZ</i> , <i>nanA</i> and <i>nanK</i>	Glycerol and lactose; fed-batch	3'-SL total titer, 31.4 g/L (E: 23.1 g/L and I: 8.3 g/L)	[52]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Overexpressed: <i>neuC</i> , <i>neuB</i> and <i>neuA</i> from <i>C. jejuni</i> and $\alpha 2,6$ - <i>SiaT</i> (truncation of N-terminal 2-15 amino acids) from <i>P. leiognathi</i> JT-SHIZ-119 Deleted: <i>lacZ</i> , <i>nacZ</i> , <i>nanA</i> , <i>pfkA</i> and <i>nagB</i>	Glycerol and lactose; fed-batch	6'-SL total titer, 22.85 g/L	[53]

E: Extracellular; I: Intracellular.

Sprenger 等<sup>[50]</sup>发现了大肠杆菌利用自身的内部代谢途径从 UDP-GlcNAc 开始进行级联反应生成 CMP-Neu5Ac 的方法; 通过敲除 *nanAKET* 基因簇、*lacZ* 和 *lacA* 来阻断竞争途径, 并过表达 *neuC*、*neuB*、*neuA*、 $\alpha 2,3$ -*SiaT*, 成功实现了 3'-SL 的发酵生产, 无需外源性添加 Neu5Ac; 在连续添加甘油和乳糖的发酵培养中, 最终 3'-SL 的产量达到了 25.5 g/L (其中细胞外 15.5 g/L, 细胞内 10.0 g/L)。同一团队采用相同的方法首次尝试生产 6'-SL, 通过将来自 *N. meningitidis* 的  $\alpha 2,3$ -*SiaT* 替换为  $\alpha 2,6$ -*SiaT*, 并使用来自发光拟杆菌 (*Photobacterium* sp.) JT-ISH-224 的三糖 [KDO-乳糖(2-keto-3-deoxyoctonic acid)] 作为优先糖供体, 通过过表达来自 *N. meningitidis* 的 *neuC*、*neuB*、*neuA* 基因以及来自 *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 的  $\alpha 2,6$ -*SiaT*, 同时敲除 *lacZ*、

*nanA* 和 *nanK* 等, 最终 6'-SL 的最高产量为 34 g/L (其中细胞外 23 g/L, 细胞内 11 g/L)<sup>[51]</sup>。近年来, *E. coli* BL21(DE3) 菌株因生长迅速且易于大规模放大, 广泛应用于 HMO 生物合成的底盘菌。Zhang 等<sup>[52]</sup>采用质粒-整合双结合策略, 将 CMP-Neu5Ac 的合成途径中所需的基因和  $\alpha 2,3$ -*SiaT* 导入 *E. coli* BL21(DE3) 敲除 *lacZ* 底盘细胞中, 以增强代谢通量; 此外, 通过敲除竞争途径中的 *nanA* 和 *nanK* 基因, 减少了竞争代谢通量, 从而实现 3'-SL 的生物合成; 通过优化 UDP-GlcNAc 和 CMP-Neu5Ac 合成途径中关键酶的表达, 筛选了不同来源的  $\alpha 2,3$ -*SiaT*, 并将最佳的  $\alpha 2,3$ -*SiaT* 整合到基因组中, 以最大程度地提高发酵效率; 这些策略使 3'-SL 产量达到了 31.4 g/L (其中细胞外为 23.1 g/L, 细胞内为 8.3 g/L)。

最近, 针对 6'-SL 的研究取得了重大进展。

Li 等<sup>[53]</sup>将 *E. coli* BL21(DE3) 作为底盘细胞进行了改造, 以实现 6'-SL 的 *de novo* 合成; 研究人员敲除了 *lacZ*、*nacZ*、*nanA*、*pfkA* 和 *nagB* 等基因, 同时引入了 *neuB*、*neuC* 和 *neuA* 基因, 以促进 CMP-Neu5Ac 的合成; 此外, 筛选出了高产 6'-SL 的  $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶, 对前体物质 UDP-GlcNAc 进行了优化; 最终, 在甘油和乳糖等多次补料的 3 L 发酵罐中, 大幅提升了 6'-SL 的产量, 达到了 22.85 g/L, 乳糖转化率为 0.494 mol 6'-SL/mol。这一研究对 6'-SL 在大肠杆菌中的高效生产具有指导意义。

尽管 3'-SL 和 6'-SL 在大肠杆菌中的生物合成已取得一定的成效, 然而其在工业化高效生产上仍然存在许多挑战。微生物发酵法的重要限制因素之一可能是其关键前体唾液酸 (Neu5Ac) 的转化率较低。Neu5Ac 的合成与 3'-SL 和 6'-SL 一致, 可分为 3 条途径: AGE、NeuC 和 NanE 途径<sup>[54]</sup>。在 Neu5Ac 的生物合成过程中的关键中间物质如 GlcNAc 和 ManNAc 易被输出到胞外, 从而导致 Neu5Ac 的生产效率降低, 此外, 其他参与碳代谢的关键前体, 如丙酮酸和磷酸烯醇式丙酮酸, 当其供应不足时, 易导致 Neu5Ac 在细胞内产率降低<sup>[55]</sup>。因此, 可设计不同的 Neu5Ac 合成路径, 并通过调整菌株选择、竞争途径、辅因子和转运蛋白等因素从而提高 3'-SL 和 6'-SL 的合成效率。

### 2.3 专利保护

截至目前, 对大肠杆菌进行基因改造来发酵合成唾液酸乳糖的发明专利较少, 本文主要列举了国内利用基因工程的方法对大肠杆菌进行改造从而提高唾液酸乳糖产量的部分专利。国际专利内容主要包括 3'-SL 和 6'-SL 的发酵合成、产品分离纯化、产品应用等多个方面, 申请人包括丹麦 Glycom 公司(被帝斯曼公司收购)、德国 Jennewein 公司(被科汉森公司收购)等知名

HMOs 供应商。3'-SL 和 6'-SL 的部分专利如表 3 所示。

## 3 产业化生产前景

### 3.1 3'-SL 和 6'-SL 的市场需求分析

HMOs 包括 3'-SL 和 6'-SL 已经广泛通过美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)公认安全(generally recognized as safe, GRAS)和欧盟 Novel Food 认可, 可应用于婴幼儿乳粉等食品领域。全球已有多家公司在 HMOs 生产制备领域取得显著进展, 如帝斯曼(Glycom)、杜邦、科汉森(Jennewein)、协和麒麟等均已实现了 3'-SL 和 6'-SL 发酵法生产的产业化, 而国内由于研究起步较晚, 目前尚未有实现产业化的公司。Glycom (GRAS notice number, GRN No.: 880, 881)、Jennewein (GRN No.: 921, 922)、Chr. Hansen (GRN No.: 1015, 1016)、KYOWA (GRN No.: 1053)和 Inbiose (GRN No.: 1075)公司制备的 3'-SL 和 6'-SL 均已获得 FDA 的 GRAS 安全认证。2023 年, 我国卫生健康委员会(National Health Commission of the PRC, NHC)发布《关于桃胶等 15 种“三新食品”的公告》, 其中包含 2 款 HMOs 物质 2'-FL 和 LNNt。2024 年 3 月 NHC 发布关于 3'-SL 和 6'-SL 作为食品添加剂新品种的征求意见, 这标志着 3'-SL 和 6'-SL 作为食品添加剂的安全性和必要性得到了官方认可。

近年来, 随着全球人乳低聚糖市场规模不断扩大, HMOs 在母婴营养健康领域的应用愈发广泛, 2022 年, 其总市值达到近 2 亿美元; 在如今科学技术高速发展、人们对健康需求急剧上升的背景下, HMOs 市场增长动力猛增, 预计 2028 年全球市场规模将增长至 7.8 亿美元; 中国婴幼儿配方乳粉市场规模位居全球第一, 2022 年达到 2 205 亿元左右, 为唾液酸乳糖提供了巨大的市场空间<sup>[71]</sup>。

表3 SLs的部分专利

Table 3 A part of SLs' patents

Patent titles	Patent numbers	Patent applicant	Detailed introduction	Application time	References
A method for constructing recombinant <i>Escherichia coli</i> and the biosynthesis of 3'-sialactose	CN106190938A	Nankai University	The method utilizes a well-established Psim plasmid as a vector to prepare recombinant plasmids containing <i>neuB</i> , <i>neuA</i> , and <i>neuC</i> , a recombinant plasmid containing <i>lacY</i> , and a recombinant plasmid containing <i>Ist</i> , to obtain plasmids for constructing metabolic pathways and to knock out <i>nanA</i> , <i>nanK</i> , <i>nanE</i> , <i>nanT</i> , <i>nagA</i> , <i>nagB</i> , <i>lacZ</i>	2016/12/7	[56]
A method for an engineered strain producing lactobacillus sialactose	CN107904253A	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences; University of Chinese Academy of Sciences	This method involves knocking out the polysialic acid transferase gene ( <i>neuS</i> ), <i>lacZ</i> and the gene cluster related to N-acetylneuraminic acid degradation ( <i>nanKETA</i> ) in <i>Escherichia coli</i> , resulting in a $\Delta neuS\Delta lacZ\Delta nanKETA$ mutant strain. Based on this, different plasmid elements pCC1s and pXC1k are transformed into the strain for comparison, ultimately leading to the selection of the optimal strain K1-KETA-pNst	2018/4/13	[57]
A method of recombinant <i>Escherichia coli</i> and biosynthesis of 6'-sialactose	CN112458034A	Nankai University	This method involves knocking out the <i>lacZ</i> , <i>lacA</i> , <i>nanATEK</i> , and/or <i>nagAB</i> genes, as well as the genes for 6-phosphogluconate dehydrogenase ( <i>zwf</i> ), 6-phosphofructokinase ( <i>pfkAB</i> ), lactate dehydrogenase ( <i>ldh</i> ) and pyruvate quinoprotein oxidoreductase ( <i>poxB</i> ). Additionally, the <i>lacY</i> gene, which is expressed under the control of a strong promoter, is inserted in place of the acetate metabolism gene locus <i>ackA-pta</i> . Using this strain for shake flask fermentation for 24 hours, a yield of 4 g/L to 5 g/L of 6'-SL can be obtained	2021/3/9	[58]
A recombinant host bacterium with high yield of sialactose and its construction method and application	CN113151133A	Hefei Institute of Physical Sciences, Chinese Academy of Sciences; Wuhan Zhongke Optical Valley Green Biotechnology Co., Ltd.	This method knocks out <i>lacZ</i> , <i>lacA</i> , <i>nanATEK</i> , and <i>nagAB</i> genes, using pACYCDuet as a vector to overexpress the <i>pyrG</i> gene and to tandemly overexpress one or multiple copies of the <i>cmk</i> and <i>ppk</i> genes. By regenerating the cofactor CTP or overexpressing the CTP synthase gene, the supply of intracellular substrate cofactors is increased. This eliminates the need for exogenous addition of cofactors, thereby reducing production costs and enhancing the yield of sialactose	2021/7/23	[59]

(待续)

(续表 3)

Patent titles	Patent numbers	Patent applicant	Detailed introduction	Application time	References
Engineering bacteria for high yield of sialactose acid and its construction methods and application	CN114350584A	Cabio Biotechnology (Wuhan) Co., Ltd.	This method involves knocking out the <i>neuS</i> , <i>neuE</i> , and <i>lacZ</i> genes to reduce the interference of heteropolysaccharides. By improving the wild-type PSA strain without the need to introduce foreign SA synthesis pathway genes, it causes minimal disturbance to the chassis; and by introducing the <i>neuAB</i> genes, it increases the accumulation of CMP-SA, thereby enhancing the production of sialactose	2022/4/15	[60]
Construction method and application of an <i>Escherichia coli</i> engineering strain with high 3'-sialactose	CN114874966A	Jiangnan University	This patent involves knocking out <i>lacZ</i> , <i>nanA</i> , <i>nanT</i> , and <i>nanK</i> genes, overexpressing <i>glmM</i> , <i>glmU</i> , and <i>glmS*</i> , introducing an exogenous <i>neuBCA</i> pathway, and screening for a novel $\alpha$ 2,3-SiaT to modify it. Under the conditions of a 5 L fermentation tank with fed-batch supplementation for 38.5 h, it is possible to accumulate 31.4 g/L of 3'-SL	2022/8/9	[61]
A genetically engineered bacteria Z3 For enhancing the production of 3'-sialactose and its application	CN115232778A	Nantong Richen Bio-Engineering Co., Ltd.	The patent proposes a method for constructing a recombinant <i>Escherichia coli</i> and the biosynthesis of 3'-SL. This method starts with a high Neu5Ac-producing strain 3D6.2, integrates the foreign genes <i>NeuA</i> and <i>Nst</i> into the <i>Bacillus subtilis</i> genome, knocks out <i>yesZ</i> , optimizes the promoters for the key enzymes <i>NeuA</i> and $\alpha$ -2,3-sialyltransferase <i>Nst</i> to achieve optimal expression levels, and also optimizes the carbon source in the fermentation medium to find the best carbon source for 3'-SL synthesis. This results in a shake flask fermentation yield of 3'-SL reaching 185.2 mg/L	2022/10/25	[62]
Spray-dried sialactose	AU2018380959	Jennewein Biotechnologie GmbH	The patent provides a method for preparing sialactose powder using spray drying technology. This powder has improved solubility and stability, offering new possibilities for the application of sialactose in food and pharmaceutical products	2023/03/17	[63]
Simple method for the purification of a sialactose	US20210212335	Jennewein Biotechnologie GmbH	The patent first utilizes genetic engineering techniques to modify the <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) strain, integrating multiple genes to enhance the biosynthesis pathway of CMP-sialic acid, and removing genes that could potentially degrade	2021/07/15	[64]

(待续)

(续表 3)

Patent titles	Patent numbers	Patent applicant	Detailed introduction	Application time	References
			N-acetylglucosamine 6-phosphate, thereby optimizing the production of sialactose. During the fermentation process, a specific mineral medium and sucrose as a carbon source are used, and by controlling the pH and aeration conditions, the production of sialactose is promoted		
New major facilitator superfamily (MFS) protein (FRED) in production of sialylated HMOs	WO2022/157280	Glycom A/S	The patent provides a method for enhancing the production efficiency of sialactose using a novel major facilitator superfamily (MFS) protein (FRED). This invention contributes to the advancement of infant nutrition products, particularly in terms of mimicking the composition of breast milk and offering health benefits	2022/07/28	[65]
Composition for preventing or treating osteoarthritis containing sialactose or salt thereof as active ingredient	HK42022045985.3	Cupione Co., Ltd.	The patent proposes a composition containing sialactose as an active ingredient for the prevention or treatment of osteoarthritis. This invention leverages the bioactivity of sialactose, offering a novel therapeutic option for patients suffering from osteoarthritis, which holds potential clinical and commercial value	2022/03/25	[66]
A nutritional composition comprising 6'-SL and LNT in combination to improve the gastrointestinal barrier function	US17416578	Societe Des Produits Nestle S.A.	The patent proposes a nutritional composition containing 6'-SL and LNT to improve gastrointestinal barrier function. The patent includes a series of experimental methods and results, which aim to demonstrate the synergistic effect of the combination of 6'-SL and LNT on the activation of the GPR35 receptor and how this activation is associated with the improvement of gastrointestinal barrier function. The experimental results indicate that the combination of 6'-SL and LNT can activate the GPR35 receptor at lower effective concentrations than either of the HMOs alone, showing a synergistic effect	2022/09/15	[67]
Composition for inhibiting immune cell proliferation comprising sialactose or derivative thereof and method thereof	US11291676	Cupione Co., Ltd.	The patent describes a composition containing sialactose or its derivatives and a method for using this composition to inhibit the proliferation of immune cells. By administering an effective amount of sialactose to patients, the overproliferation of immune cells can be suppressed. Specifically,	2022/04/05	[68]

(待续)

(续表 3)

Patent titles	Patent numbers	Patent applicant	Detailed introduction	Application time	References
Prebiotic effect of sialactose	US201314391739	Trustees of Boston College	the components 3'-SL and 6'-SL can promote the differentiation and apoptosis of macrophages by binding to the cell surface protein SIGLEC-3 (CD33). This process involves lipid raft-dependent endocytosis and subsequent molecular cascade reactions, including the recruitment of SOCS3 and SHP1, as well as the activation of ERK, ultimately leading to cell differentiation and apoptosis The patent pertains to a special class of prebiotic compositions, the main components of which include sialylated oligosaccharides and adhesin-derived oligosaccharides among other oligosaccharide substances. The primary function of this composition is to stimulate the growth of beneficial microbes in the gut, such as <i>Bifidobacteria</i> , while also helping to reduce the quantity of pathogenic bacteria within the intestines	2015/09/24	[69]
A concentrate derived from a milk product enriched in naturally occurring sialactose and a process for preparation thereof	US201213713942	Arla Foods Amba	The patent describes a method for extracting sialactose with a higher concentration from milk or dairy products using ultrafiltration and dialysis techniques based on thin-film polyamide membranes. Through this method, foods and nutritional supplements rich in sialactose can be developed, thereby offering consumers more healthful choices.	2014/06/19	[70]

3'-SL 和 6'-SL 作为乳糖的衍生物, 具有免疫调节、抗菌和抗病毒等多重生理功能。在婴幼儿配方奶粉、功能性食品与保健品以及乳制品等应用领域展现了巨大的市场潜力。首先, 随着第四代婴配乳粉要求精准模拟母乳, 婴幼儿配方奶粉对 3'-SL 和 6'-SL 的需求稳步上升。作为母乳中的主要成分, HMOs 加入奶粉后有助于婴幼儿免疫系统和肠道健康的发育, 因此婴幼儿配方奶粉制造商积极在产品中添加这两种唾液酸乳糖, 以模拟母乳成分, 满足婴幼儿生理

与成长需求。其次, 功能性食品和保健品市场也对 3'-SL 和 6'-SL 表现出日益增长的兴趣。这是因为这两种唾液酸乳糖蕴含丰富的益生元, 被认为具有益生菌作用, 可作为功能性成分改善人体健康。随着人们健康意识的提高, 功能性食品和保健品市场对这两种成分的需求逐渐增加。最后, 乳制品行业也在积极探索其应用, 在酸奶等奶制品中添加 3'-SL 和 6'-SL 有助提升营养价值, 增强产品市场竞争力。

总体而言, 作为功能性成分, 3'-SL 和 6'-SL

不仅能够满足婴幼儿与成人的营养需求，还在食品与保健品领域展现出广阔的市场前景。对两种唾液酸乳糖的持续研发，将有利于满足市场的稳步增长需求。因此，研究 SL 的生物合成制备技术具有重要的应用价值<sup>[72]</sup>。

### 3.2 探究构建工业化生产菌株的研究方案

微生物发酵是生产 3'-SL 和 6'-SL 的主要技术途径，为提高其发酵效率，可从 3 个方面进行研究：(1) 提高关键酶的活力和可溶性。通过寻找新的酶源或改进已有酶源来进一步提升关键酶的性能；对已有的基因资源库采用高通量筛选技术，以寻找适合替代现有的新酶源，同时对性质优良的酶进行结构解析和相关改造，挖掘催化机制和优化底物特异性以用于从头合成的进一步研究。(2) 探索整合菌的发酵生产。SLs 微生物发酵法主要采取质粒菌的菌株进行发酵生产，质粒不稳定，发酵提前终止导致产量较低，将关键酶基因整合到底盘细胞的基因组上是未来需要考虑的重要方向。使用转座子编码的 CRISPR-Cas 系统的多拷贝基因整合系统提供了精确的基因改造控制，提高了基因表达的稳定性，有助于弥补质粒菌易丢失质粒的缺点，进一步提高 3'-SL 和 6'-SL 的生产效率<sup>[73]</sup>。(3) 开发食品安全级别的底盘菌株。具有 GRAS 认证或国标 GB2760 认证的底盘菌株在工业化生产中十分重要，尤其是开发食品行业应用成熟的酵母、谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌等底盘微生物。目前欧盟已批准 3'-SL 作为新食品资源投入市场，欧盟批准的 3'-SL 是由大肠杆菌 W (ATCC 9637) 的衍生菌株(大肠杆菌 NEO3)所生产，用于婴幼儿配方奶粉、婴幼儿特殊用途食品、食品补充剂等。此外，随着未来相关法规制度的完善和各企业的产业标准统一，可考虑将转基因的底盘菌株作为宿主，进一步推动 SL 合成技术的创新与发展。通过优化基因编辑技

术，提高菌株的稳定性和表达效率，确保转基因产品的安全性和可控性，同时加强对转基因生物安全监管，确保其对生态环境和人类健康的潜在影响得到严格评估与控制。

## 4 总结与展望

3'-SL 和 6'-SL 均显示出良好的益生元作用，尤其是在促进双歧杆菌增殖和塑造肠道微生物方面，均表现出包括抗粘连、抗菌、抗病毒、预防 NEC、免疫调节等作用。此外，在调节肠上皮细胞反应、促进大脑发育和认知改善方面，3'-SL 和 6'-SL 也表现出显著效果。随着精准医疗和个性化营养领域的快速发展，3'-SL 和 6'-SL 的应用前景日益受到关注。针对不同人群的特定健康需求，可以通过调整 HMOs 的种类和含量，实现营养产品的个性化定制。例如，在婴幼儿营养领域，可以根据婴幼儿的遗传特点和肠道微生物组成，研发配方奶粉，以模拟母乳中的天然成分，促进婴幼儿的健康成长和免疫系统发育。此类配方奶粉有望提高婴幼儿对营养的吸收效率，同时有助于预防过敏反应和感染性疾病。对于患有慢性疾病的成人，可以通过研发含有特定比例的 3'-SL 和 6'-SL 的产品，如针对糖尿病患者设计的低糖或低血糖指数食品、针对心血管疾病患者的富含可改善血管健康成分的食品，从而帮助他们在日常生活中更好地管理疾病，提高生活质量<sup>[74]</sup>。

综合已有 SLs 合成工艺路线来看，SLs 的合成策略主要有酶促合成法和微生物发酵法。酶促合成技术依赖唾液酸酶或唾液酸转移酶催化唾液酸残基的末端糖苷键水解，以实现 SLs 的生产。该策略主要围绕酶的筛选、改造进行改良优化，但受限于有限的底物来源、高昂的底物成本以及体外酶活特异性，难以大规模应用。相比之下，微生物发酵法以“细胞工厂”为



核心, 不仅可以利用简单便宜的底物合成复杂化学物质, 还可以通过基因工程针对性改造代谢通路, 在产量、转化率、底物成本和放大应用上都具优势。当前, 代谢网络模型已广泛应用于构建底盘细胞。未来, 可结合计算分析工具扩大改造目标范围, 采用多种技术实现目标菌株快速迭代, 并利用生物信息学、基因组学和高通量筛选挖掘关键酶, 为高效生产提供理论指导。尽管 3'-SL 和 6'-SL 在大肠杆菌中的微生物发酵合成已取得一定成效, 但工业化生产仍面临挑战。而针对大规模发酵和过程控制问题, 可以尝试利用基因编码设计优化动态代谢平衡, 以提高发酵菌株的环境适应性和产量稳定性, 或采取系统代谢工程手段统筹考虑原料制备、连续补料发酵和提取纯化等过程, 以实现高密度发酵和缩短发酵周期。生物制造领域的发展将为 3'-SL 和 6'-SL 的生产带来新的机遇, 合成生物学的进步, 如基因簇的合成和组装、人工细胞工厂的设计等, 可能会使 3'-SL 和 6'-SL 的生产更加高效和灵活。此外, 生物催化剂(如酶和微生物)的定向进化和改造将进一步提高合成效率和产物特异性。

帝斯曼等公司生产的 3'-SL 和 6'-SL 已经广泛通过美国 FDA GRAS 和欧盟 Novel Food 认可, 可应用于婴幼儿乳粉等食品领域。作为人乳关键成分之一, 雀巢和惠氏等上市企业将 3'-SL 和 6'-SL 添加到婴儿配方奶粉产品中, 成功实现了商业化应用。国内 2024 年 3 月 NHC 发布食品添加剂新品种 3'-SL 和 6'-SL 征求意见, 预计短期内在国内可获得审批通过。但是由于国内研究起步较晚, 尚未有国内企业实现产业化报道。目前国内已经有江南大学、中国科学院合肥物质科学研究院、中国科学院微生物所和南开大学等机构进行 SLs 发酵法制备技术研究。

3'-SL 和 6'-SL 有望在更广阔的应用领域中发挥重要作用。在功能性食品和特殊医学用途食品(foods for special medical purposes, FSMP)市场, 可为消费者提供免疫调节和抗炎保护。在保健品市场, 可开发为维持肠道微生态平衡和提高机体免疫力的膳食补充剂。综上所述, 开发新型策略进一步优化 3'-SL 和 6'-SL 的合成技术, 对推动政策和产业的持久良性发展具有重要的经济价值。

## REFERENCES

- [1] 李晨晨, 李梦丽, 张涛. 人乳寡糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 284-292.  
LI CC, LI ML, ZHANG T. Research progress of human milk oligosaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 284-292 (in Chinese).
- [2] BODE L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama[J]. Glycobiology, 2012, 22(9): 1147-1162.
- [3] HAN NS, KIM TJ, PARK YC, KIM J, SEO JH. Biotechnological production of human milk oligosaccharides[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1268-1278.
- [4] BYCH K, MIKŠ MH, JOHANSON T, HEDEROS MJ, VIGSNÆS LK, BECKER P. Production of HMOs using microbial hosts-from cell engineering to large scale production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 130-137.
- [5] GROLLMAN AP, HALL CW, GINSBURG V. Biosynthesis of fucosyllactose and other oligosaccharides found in milk[J]. Journal of Biological Chemistry, 1965, 240(3): 975.
- [6] THUM C, WALLI CR, WEISS GA, WANG W, SZETO IM-Y, DAY L. Changes in HMO Concentrations throughout Lactation: Influencing Factors, Health Effects and Opportunities[J]. Nutrients, 2021, 13(7): 2272.
- [7] THURLL S, MUNZERT M, BOEHM G, MATTEWS C, STAHLI B. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk[J]. Nutrition Reviews, 2017, 75(11): 920-933.
- [8] KUNZ C, RUDLOFF S, BAIER W, KLEIN N, STROBEL S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects[J]. Annual

- Review of Nutrition, 2000, 20: 699-722.
- [9] COPPA GV, GABRIELLI O, PIERANI P, CATASSI C, CARLUCCI A, GIORGI PL. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation[J]. Pediatrics, 1993, 91(3): 637-641.
- [10] BEERENS H, ROMOND C, NEUT C. Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1980, 33(11 suppl): 2434-2439.
- [11] KUNZ C, RUDLOFF S, BAIER W, KLEIN N, STROBEL S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects[J]. Annual Review of Nutrition, 2000, 20: 699-722.
- [12] CHEN X, KOWAL P, WANG PG. Large-scale enzymatic synthesis of oligosaccharides[J]. Current Opinion in Drug Discovery & Development, 2000, 3(6): 756-763.
- [13] KIM J, KIM YJ, KIM JW. Bacterial clearance is enhanced by  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-sialactose via receptor-mediated endocytosis and phagocytosis[J]. Infection and Immunity, 2018, 87(1): e00694-18.
- [14] JEON J, KANG LJ, LEE KM, CHO C, SONG EK, KIM W, PARK TJ, YANG S. 3'-sialactose protects against osteoarthritic development by facilitating cartilage homeostasis[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22(1): 57-66.
- [15] BAEK A, JUNG SH, PYO S, KIM SY, JO S, KIM L, LEE EY, KIM SH, CHO SR. 3'-sialactose protects SW1353 chondrocytic cells from interleukin-1 $\beta$ -induced oxidative stress and inflammation[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 609817.
- [16] YU ZT, CHEN C, NEWBURG DS. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes[J]. Glycobiology, 2013, 23(11): 1281-1292.
- [17] BONDUE P, LEBRUN S, TAMINIAU B, EVERAERT N, LaPOINTE G, HENDRICK C, GAILLEZ J, CRÈVECOEUR S, DAUBE G, DELCENSERIE V. Effect of *Bifidobacterium crudilactis* and 3'-sialactose on the toddler microbiota using the SHIME<sup>®</sup> model[J]. Food Research International, 2020, 138(Pt A): 109755.
- [18] CHARBONNEAU MR, O'DONNELL D, BLANTON LV, TOTTEN SM, DAVIS JCC, BARRATT MJ, CHENG JY, GURUGE J, TALCOTT M, BAIN JR, MUEHLBAUER MJ, ILKAYEVA O, WU C, STRUCKMEYER T, BARILE D, MANGANI C, JORGENSEN J, FAN YM, MALETA K, DEWEY KG, et al. Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition[J]. Cell, 2016, 164(5): 859-871.
- [19] AUTRAN CA, KELLMAN BP, KIM JH, ASZTALOS E, BLOOD AB, SPENCE ECH, PATEL AL, HOU JY, LEWIS NE, BODE L. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants[J]. Gut Microbes, 2018, 67(6): 1064-1070.
- [20] 张雯婷, 壮文军, 杨明美, 丁洁璐, 闫竞宇, 崔玥, 恽琪, 顾猛. 双唾液酸乳糖-N-四糖保护新生肠道屏障预防坏死性小肠结肠炎的研究[J]. 中华新生儿科杂志, 2022, 37(4): 350-355.
- ZHANG WT, ZHUANG WJ, YANG MM, DING JJ, YAN JJ, CUI Y, YUN Q, GU M. The protective effects of disialyllacto-N-tetraose of neonatal intestinal barriers in the prevention of necrotizing enterocolitis[J]. Chinese Journal of Neonatology, 2022, 37(4): 350-355 (in Chinese).
- [21] YAMABE M, KAIHATSU K, EBARA Y. Sialactose-modified three-way junction DNA as binding inhibitor of influenza virus hemagglutinin[J]. Bioconjugate Chemistry, 2018, 29(5): 1490-1494.
- [22] SUN XL. The role of cell surface sialic acids for SARS-CoV-2 infection[J]. Glycobiology, 2021, 31(10): 1245-1253.
- [23] YU X, WU Q, WANG LP, ZHAO YJ, ZHANG QQ, MENG QT, Pawan, WANG SJ. Silencing of ST6GalNAc I suppresses the proliferation, migration and invasion of hepatocarcinoma cells through PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Tumor Biology, 2016, 37(9): 12213-12221.
- [24] NOYE TUPLIN EW, CHLEILAT F, ALUKIC E, REIMER RA. The effects of human milk oligosaccharide supplementation during critical periods of development on the mesolimbic dopamine system[J]. Neuroscience, 2021, 459: 166-178.
- [25] HAUSER J, PISA E, ARIAS VÁSQUEZ A, TOMASI F, TRAVERSA A, CHIODI V, MARTIN FP, SPRENGER N, LUKJANCENKO O, ZOLLINGER A, METAIRON S, SCHNEIDER N, STEINER P, MARTIRE A, CAPUTO V, MACRÌ S. Sialylated human milk oligosaccharides program cognitive development through a non-genomic transmission mode[J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26: 2854-2871.
- [26] CHO S, ZHU ZL, LI TF, BALUYOT K, HOWELL BR, HAZLETT HC, ELISON JT, HAUSER J, SPRENGER N, WU D, LIN WL. Human milk 3'-sialactose is positively associated with language development

- during infancy[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2021, 114(2): 588-597.
- [27] 翟娅菲, 禹晓, 相启森, 张华, 张星稀, 申瑞玲. 人乳寡糖体外合成研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 348-352.
- ZHAI YF, YU X, XIANG QS, ZHANG H, ZHANG XX, SHEN RL. Research progress of human milk oligosaccharides synthesis *in vitro*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 348-352 (in Chinese).
- [28] TAYLOR G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, 6(6): 830-837.
- [29] NIDETZKY B, GUTMANN A, ZHONG C. Leloir glycosyltransferases as biocatalysts for chemical production[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(7): 6283-6300.
- [30] SCHENKMAN S, JIANG MS, HART GW, NUSSENZWEIG V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells[J]. *Cell*, 1991, 65(7): 1117-1125.
- [31] SINGH S, SCIGELOVA M, HALLBERG ML, HOWARTH OW, SCHENKMAN S, CROUT DHG. Synthesis of sialyloligosaccharides using the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*: novel branched and di-sialylated products from digalactoside acceptors[J]. *Chemical Communications*, 2000(12): 1013-1014.
- [32] PONTES-de-CARVALHO LC, TOMLINSON S, NUSSENZWEIG V. *Trypanosoma rangeli* sialidase lacks trans-sialidase activity[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, 62(1): 19-25.
- [33] MICHALAK M, LARSEN DM, JERS C, ALMEIDA JRM, WILLER M, LI HY, KIRPEKAR F, KJÆRULFF L, GOTFREDSSEN CH, NORDVANG RT, MEYER AS, MIKKELSEN JD. Biocatalytic production of 3'-sialactose by use of a modified sialidase with superior trans-sialidase activity[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(2): 265-270.
- [34] GUO LC, CHEN XD, XU L, XIAO M, LU LL. Enzymatic synthesis of 6'-sialactose, a dominant sialylated human milk oligosaccharide, by a novel *exo-α*-sialidase from *Bacteroides fragilis* NCTC9343[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(13): e00071-18.
- [35] GILBERT M, WATSON DC, CUNNINGHAM AM, JENNINGS MP, YOUNG NM, WAKARCHUK WW. Cloning of the lipooligosaccharide alpha-2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(45): 28271-28276.
- [36] GILBERT M, BAYER R, CUNNINGHAM AM, DeFREES S, GAO YH, WATSON DC, YOUNG NM, WAKARCHUK WW. The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 769-772.
- [37] YU H, CHEN X. One-pot multienzyme (OPME) systems for chemoenzymatic synthesis of carbohydrates[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016, 14(10): 2809-2818.
- [38] YU H, CHOKHAWALA H, KARPEL R, YU H, WU BY, ZHANG JB, ZHANG YX, JIA Q, CHEN X. A multifunctional *Pasteurella multocida* sialyltransferase: a powerful tool for the synthesis of sialoside libraries[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(50): 17618-17619.
- [39] YAMAMOTO T, NAKASHIZUKA M, KODAMA H, KAJIHARA Y, TERADA I. Purification and characterization of a marine bacterial-galactoside 2,6-sialyltransferase from *Photobacterium damsela* JTO<sub>16</sub>O[J]. *Journal of Biochemistry*, 1996, 120(1): 104-110.
- [40] CHOI YH, KIM JH, PARK JH, LEE N, KIM DH, JANG KS, PARK IH, KIM BG. Protein engineering of  $\alpha$ 2,3,6-sialyltransferase to improve the yield and productivity of *in vitro* sialactose synthesis[J]. *Glycobiology*, 2014, 24(2): 159-169.
- [41] MERTSCH A, HE N, YI D, KICKSTEIN M, FESSNER WD. An  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase from *Photobacterium phosphoreum* with broad substrate scope: controlling hydrolytic activity by directed evolution[J]. *Chemistry*, 2020, 26(50): 11614-11624.
- [42] SCHELCH S, EIBINGER M, GROSS BELDUMA S, PETSCHACHER B, KUBALLA J, NIDETZKY B. Engineering analysis of multienzyme cascade reactions for 3'-sialactose synthesis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(11): 4290-4304.
- [43] WANG JJ, WU JY, LI ZK, CHEN XS, LIU WW, YAO JM. Protein engineering of CMP kinases to improve thermal stability and resultant production of 3'-sialactose[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2022, 36(1): 433-441.
- [44] SCHELCH S, ZHONG C, PETSCHACHER B, NIDETZKY B. Bacterial sialyltransferases and their

- use in biocatalytic cascades for sialo-oligosaccharide production[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 44: 107613.
- [45] TAN YM, ZHANG Y, HAN YB, LIU H, CHEN HF, MA FQ, WITHERS SG, FENG Y, YANG GY. Directed evolution of an  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase using a single-cell ultrahigh-throughput screening method[J]. *Science Advances*, 2019, 5(10): eaaw8451.
- [46] SCHM LK, CZABANY T, LULEY GC, PAVKOV KT, RIBITSCH D, SCHWAB H, GRUBER K, WEBER H, NIDETZKY B. Complete switch from  $\alpha$ -2,3- to  $\alpha$ -2,6-regioselectivity in *Pasteurella dagmatis*  $\beta$ -D-galactoside sialyltransferase by active-site redesign[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(15): 3083-3086.
- [47] GUO Y, JERS C, MEYER AS, ARNOUS A, LI HY, KIRPEKAR F, MIKKELSEN JD. A *Pasteurella multocida* sialyltransferase displaying dual trans-sialidase activities for production of 3'-sialyl and 6'-sialyl glycans[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 170(1): 60-67.
- [48] PERNA VN, DEHLHOLM C, MEYER AS. Enzymatic production of 3'-sialactose in milk[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 148(1): 109829.
- [49] BYCH K, MIKS MH, JOHANSON T, HEDEROS MJ, VIGSNAS LK, BECKER P. Production of HMOs using microbial hosts: from cell engineering to large scale production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 130-137.
- [50] 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[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(4): 235-240.
- [51] SPRENGER GA, BAUMGÄRTNER F, ALBERMANN C. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 258: 79-91.
- [52] DROUILLARD S, MINE T, KAJIWARA H, YAMAMOTO T, SAMAIN E. Efficient synthesis of 6'-sialactose, 6,6'-disialactose, 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): 1394-1399.
- [53] ZHANG JM, ZHU YY, ZHANG WL, MU WM. Efficient production of a functional human milk oligosaccharide 3'-sialactose in genetically engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(8): 2837-2845.
- [54] LI CC, LI ML, HU MM, GAO W, MIAO M, ZHANG T. Engineering *Escherichia coli* for the efficient biosynthesis of 6'-sialactose[J]. *Food Bioscience*, 2023, 55: 103040.
- [55] ZHANG XL, WANG CY, LV XQ, LIU L, LI JH, DU GC, WANG M, LIU YF. Engineering of synthetic multiplexed pathways for high-level N-acetylneuraminic acid bioproduction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(49): 14868-14877.
- [56] ZHANG XL, LIU YF, LIU L, LI JH, DU GC, CHEN J. Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: advances and perspectives[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 787-800.
- [57] 王磊, 黄笛, 许莹莹, 刘斌. 一种构建的重组大肠杆菌及生物合成 3'-唾液乳糖的方法: CN106190938A[P]. 2016-12-07.  
WANG L, HUANG D, XU YY, LIU B. A method for constructing recombinant *Escherichia coli* and the biosynthesis of 3'-sialactose: CN106190938A[P]. 2016-12-07 (in Chinese).
- [58] 王梦楠, 杨静华, 陶勇, 金城. 一种产唾液酸乳糖大肠杆菌工程菌株的构建方法: CN107904253A[P]. 2018-04-13.  
WANG MN, YANG JH, TAO Y, JIN C. A method for an engineered strain producing lactobacillus sialactose: CN107904253A[P]. 2018-04-13 (in Chinese).
- [59] 王磊, 冯露, 黄笛, 王茹. 一种基因工程构建的重组大肠杆菌及生物合成 6'-唾液乳糖的方法: CN112458034A[P]. 2021-03-09.  
WANG L, FENG L, HUANG D, WANG R. A method of recombinant *Escherichia coli* and biosynthesis of 6'-sialactose: CN112458034A[P]. 2021-03-09 (in Chinese).
- [60] 吴金勇, 李忠奎, 陈祥松, 袁丽霞, 王纪, 王煜, 王刚, 孙立洁, 李翔宇, 姚建铭. 一种高产唾液酸乳糖的重组宿主菌及其构建方法和应用: CN113151133A[P]. 2021-07-23.  
WU JY, LI ZK, CHEN XS, YUAN LX, WANG J, WANG Y, WANG G, SUN LJ, LI XY, YAO JM. A recombinant host bacterium with high yield of sialactose and its construction method and application: CN113151133A[P]. 2021-07-23 (in Chinese).
- [61] 汪志明, 刘洋, 余超, 陆姝欢, 李翔宇. 高产唾液酸乳糖的工程菌及其构建方法与应用: CN114350584A[P]. 2022-04-15.

- WANG ZM, LIU Y, YU C, LU ZH, LI XY. Engineering bacteria for high yield of sialactose acid and its construction methods and application: CN114350584A[P]. 2022-04-15 (in Chinese).
- [62] 沐万孟, 张文立, 张嘉萌, 朱莺莺. 一种高产 3'-唾液酸乳糖的大肠杆菌工程菌株的构建方法及应用: CN114874966A[P]. 2022-08-09.
- MU WM, ZHANG WL, ZHANG JM, ZHU YY. Construction method and application of an *Escherichia coli* engineering strain with high 3'-sialactose: CN114874966A[P]. 2022-08-09 (in Chinese).
- [63] 孙怡, 刘龙, 施晓玲, 陈坚, 吕雪芹, 堵国成, 李江华, 刘延峰, 朱咏莲, 李古月. 一种提高 3'-唾液酸乳糖产量的基因工程菌 Z3 及其应用: CN115232778A[P]. 2022-10-25.
- SUN Y, LIU L, SHI XL, CHEN J, Lü XQ, DU GC, LI JH, LIU YF, ZHU YL, LI GY. A genetically engineered bacteria Z3 for enhancing the production of 3'-sialactose and its application: CN115232778A[P]. 2022-10-25 (in Chinese).
- [64] JENNEWEIN S. Spray-dried sialyllactose: AU2018380959[P]. 2020-06-18.
- [65] JENNEWEIN S, HELFRICH M, ENGELS B. Simple method for the purification of a sialactose: US20210212335[P]. 2021-07-15.
- [66] PEDERSEN M, D'ARRIGO I, BYCH KAMPMANN K, PAPADAKIS M. New major facilitator superfamily (MFS) protein (FRED) in production of sialylated HMOs: WO2022/157280[P]. 2022-07-28.
- [67] YANG SY, JEON JM, KANG LJ, CHO CM. Composition for preventing or treating osteoarthritis containing sialactose or salt thereof as active ingredient: HK42022045985.3[P]. 2022-03-25.
- [68] SAMI D, FRANCIS F, NORBERT S. A nutritional composition comprising 6'-SL and LNT in combination to improve the gastrointestinal barrier function: US17416578[P]. 2021-07-23.
- [69] YANG SY, JEON J, KANG LJ, CHO C. Composition for inhibiting immune cell proliferation comprising sialyllactose or derivative thereof and method thereof: US16130522[P]. 2022-04-05.
- [70] NEWBURG DAVID S.YU ZT. Prebiotic effect of sialactose: US201314391739[P]. 2015-09-24.
- [71] HOLST H HG, WILLIAM S.M, METTE TJ, ANDERS S. A concentrate derived from a milk product enriched in naturally occurring sialactose and a process for preparation thereof: US201213713942[P]. 2017-11-01.
- [72] 母乳低聚糖(HMOs)市场增长势头强劲 我国市场有待进一步开发[EB/OL]. [2023-08-28]. <https://www.newsijie.com/sijiezixun/siguandian/2023/0828/11334072.html>.
- [73] ZHU YY, ZHANG JM, ZHANG WL, MU WM. Recent progress on health effects and biosynthesis of two key sialylated human milk oligosaccharides, 3'-sialactose and 6'-sialactose[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 62: 108058.
- [74] KNOTT GJ, DOUDNA JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 866-869.
- [75] HUANG Z, LI Y, LUO Y, GUO HY. Human milk oligosaccharides 3'-sialactose and 6'-sialactose protect intestine against necrotizing enterocolitis damage induced by hypoxia[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86: 104708.

(本文责编 郝丽芳)