

人乳寡糖 2'-FL 和 3-FL 的生物制备研究进展

徐铮, 李娜, 陈盈利, 张雯瑞, 朱婉莹

南京工业大学 食品与轻工学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

徐铮, 李娜, 陈盈利, 等. 人乳寡糖 2'-FL 和 3-FL 的生物制备研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2767-2778.

Xu Z, Li N, Chen YL, et al. Recent advances in the bio-production of human milk oligosaccharides 2'-FL and 3-FL. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2767-2778.

摘要: 人乳寡糖 (Human milk oligosaccharides, HMO) 是母乳中重要的免疫活性成分, 对婴幼儿健康起到显著促进作用。2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL) 是 HMO 的主要组分, 极具应用价值, 3-岩藻糖基乳糖 (3-FL) 与 2'-FL 的合成途径相似, 两者的研究具有相互借鉴意义, 近年来针对它们的研究取得了较多进展。以微生物细胞工厂为核心理念的新型生物合成途径有望将 2'-FL 和 3-FL 产业化, 未来将对乳制品行业产生重要的影响。文中综述了生物技术制备 2'-FL 和 3-FL 的最新研究进展, 并对未来发展趋势进行了展望。

关键词: 人乳寡糖, 岩藻糖基乳糖, 细胞工厂, 生物制造

Recent advances in the bio-production of human milk oligosaccharides 2'-FL and 3-FL

Zheng Xu, Na Li, Yingli Chen, Wenrui Zhang, and Wanying Zhu

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

Abstract: Human milk oligosaccharides (HMO) are important immunoactive components found in breast milk. Scientific research proves that HMOs are significantly beneficial for infant health. 2'-fucosyllactose (2'-FL) is the major component of HMO, which obtained growing attentions from food industry. Besides, 3-fucosyllactose (3-FL) is another important fucosyllactose and it has a similar synthetic route comparing to 2'-FL. Thus, research of the two HMO components has interactive effects for each other. Recently, numerous publications are available for 2'-FL and 3-FL. The microbial cell factory is able to massively produce fucosyllactose via an efficient way, which will show considerable influences in dairy industry. In this paper, we review recent studies on 2'-FL and 3-FL, and discuss their prospects according to published literature and patents.

Keywords: human milk oligosaccharides, fucosyllactose, cell factory, bio-manufacturing

Received: April 12, 2020; **Accepted:** June 23, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0902200), Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province, China (No. NY-056).

Corresponding author: Zheng Xu. Tel: +86-25-58139433; E-mail: xuzheng@njtech.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0902200), 江苏省六大人才高峰 (No. NY-056) 资助。

网络出版时间: 2020-07-07

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200706.1326.001.html>

母乳具有独一无二的活性功能,对新生儿健康至关重要。研究表明,母乳喂养的新生儿患肠胃炎、急性中耳炎以及其他免疫类疾病的概率较非母乳喂养显著降低,甚至在未来的智商发育上都占据优势,产生肥胖和糖尿病的概率也会下降^[1]。母乳中含量最高的成分是乳糖和脂类,此外含有大量岩藻糖基化且无法被消化的寡糖(即人乳寡糖 HMO),而牛奶、羊奶中的寡糖含量却非常少,因此母乳是最丰富的天然 HMO 源。母乳中至今已发现 200 种以上的 HMO,初乳中总含量为 20–25 g/L,成熟母乳中的含量为 10–15 g/L^[2–3]。HMO 大多包含 3–6 个糖基,以乳糖或唾液酸结尾,可分为 3 类,包括被岩藻糖基修饰的中性 HMO (35%–50%)、包含唾液酸及其硫酸盐的酸性 HMO (12%–14%)以及非岩藻糖基化的中性 HMO (42%–55%)。2'-岩藻基乳糖 (2'-FL) 的含量最高,达到 HMO 总量的近 30%,母乳中浓度为 0.5–2.0 g/L^[4–6]。2'-FL 的合成研究对 HMO 的商业化应用至关重要,尤其是寻找到高效率、低成本、绿色环保的合成路线。学者们首先尝试了有机合成法,但难以突破若干瓶颈问题,例如反应立体选择性差、产率低、使用毒性试剂等,不利于在食品工业中推广^[2]。近年来,2'-FL 和 3-FL 的生物制备研究发展迅速,并体现出优于化学合成路线的诸多特性,在国外已达到产业化水平^[3]。本文针对这两种 HMO 的最新研究成果尤其是生物法合成路线予以综述,并对未来发展趋势进行深入讨论。

1 2'-FL 和 3-FL 的功效研究

HMO 是母乳中的主要活性成分,对婴幼儿健康起到显著促进作用。HMO 可以促进婴儿双歧杆菌 *Bifidobacterium infantis* 以及其他双歧杆菌类益生菌的生长,促进 *B. infantis* 分泌短链脂肪酸,构建健康的肠道微环境来抑制有害菌生长,进而减少腹泻发生。HMO 在结构上与肠道表皮细胞表面的多糖受体结构相似,可以作为诱饵诱导病毒、病原菌、或细菌毒素与之结合,从而降低这些有害物质定殖或入侵人体的风险。研究表明,奶粉中添加 2'-FL 和乳糖-N-新四糖 (LNnT) 喂养的婴儿其体内的肠道菌群种类与母乳喂养的婴儿一致;持续喂养 3 个月,观察到粪便中的微生物双歧杆菌数量上升而病原菌种类减少^[7–8]。肠杆菌科细菌被认为与早产儿的坏死性小肠结肠炎相关,研究表明肠杆菌科菌株可以在含有低聚半乳糖的环境下繁殖,但却无法在含有 2'-FL、6'-唾液酸乳糖 (6'-SL) 或 LNnT 的环境下存活,表明 2'-FL 对肠道有害菌具有显著抑制作用^[9];Weichert 等^[10]证明 2'-FL 和 3-FL 能够抑制绿脓杆菌和肠道致病型大肠杆菌在肠道和呼吸系统的定殖。2019 年德国巴斯夫公司针对婴幼儿营养品市场推出了首款 2'-FL 产品 PREBILAC,并与 Glycosyn LLC 公司合作将其专利技术应用于婴儿营养以外的肠道健康领域,包括膳食补充剂、功能性营养和医疗食品等。

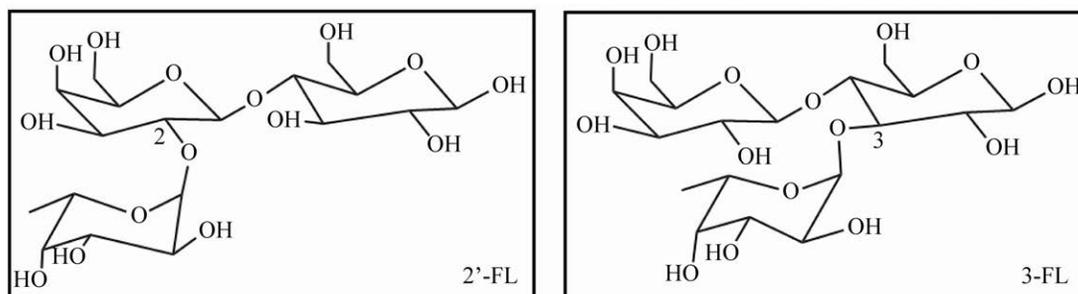


图 1 2'-FL 和 3-FL 的结构示意图

Fig. 1 The chemical structures of 2'-FL and 3-FL.

2 2'-FL 和 3-FL 的生物合成途径研究

2'-FL 的生物合成路径如图 2 所示。2'-FL 的生物合成最早通过酶催化来实现, Albermann 等^[12]在 2000 年通过外源表达和纯化大肠杆菌 *Escherichia coli* K12 来源的 Gmd 酶 (GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶) 和 WcaG 酶 (GDP-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖-3,5-差向异构酶-4-还原酶), 在体外将 GDP-D-甘露糖转化为 GDP-L-岩藻糖, 即 2'-FL 合成最关键的前体。同时他们发现 Gmd 的活性能够被 GDP-L-岩藻糖显著抑制, 因此 Gmd 是一个较关键的限速步骤酶。岩藻糖基转移酶 (Fucosyltransferases, FTs) 可以催化 GDP-L-岩藻糖的岩藻糖基转糖苷到乳糖上去, FTs 大多来源于真核生物, 但真核类 FTs 具有一个膜结合结构域, 活性受翻译后修饰影响, 因此这类基因在缺乏后修饰能力的原核宿主中难以获得活性表达。直到 1997 年 Ge 等^[13]发现了第一个原核来源的 FTs, 来源于幽门螺杆菌

Helicobacter pylori。Albermann 等^[14]进一步表达了幽门螺杆菌来源的 FucT2 酶, 并与 Gmd 和 WcaG 联用, 以 GDP-D-甘露糖为出发底物, 乳糖为最终底物, 在体外成功合成了 2'-FL, 其中 GDP-D-甘露糖到 GDP-L-岩藻糖的转化率为 78%, 以上研究表明 3 种关键酶能够通过联用有效合成 2'-FL。

纯酶催化仅限于实验室小规模研究, 产业化应用还需要将关键酶基因构建到底盘微生物中来完成。已知的合成途径包括 Salvage 和 *De novo* 两种 (图 2), 其中 Salvage 途径需要外源添加 L-岩藻糖作为合成前体; *De novo* 途径则直接利用 D-葡萄糖或甘油为碳源来合成关键前体 GDP-L-岩藻糖, 进而生产出人乳寡糖。2006 年, 法国国家科研中心的 Drouillard 等^[15]首次在大肠杆菌中构建出 2'-FL 合成途径, 表达了幽门螺杆菌 FutC 酶基因, 最高产量达到 14 g/L, 其中胞外含量 11 g/L。

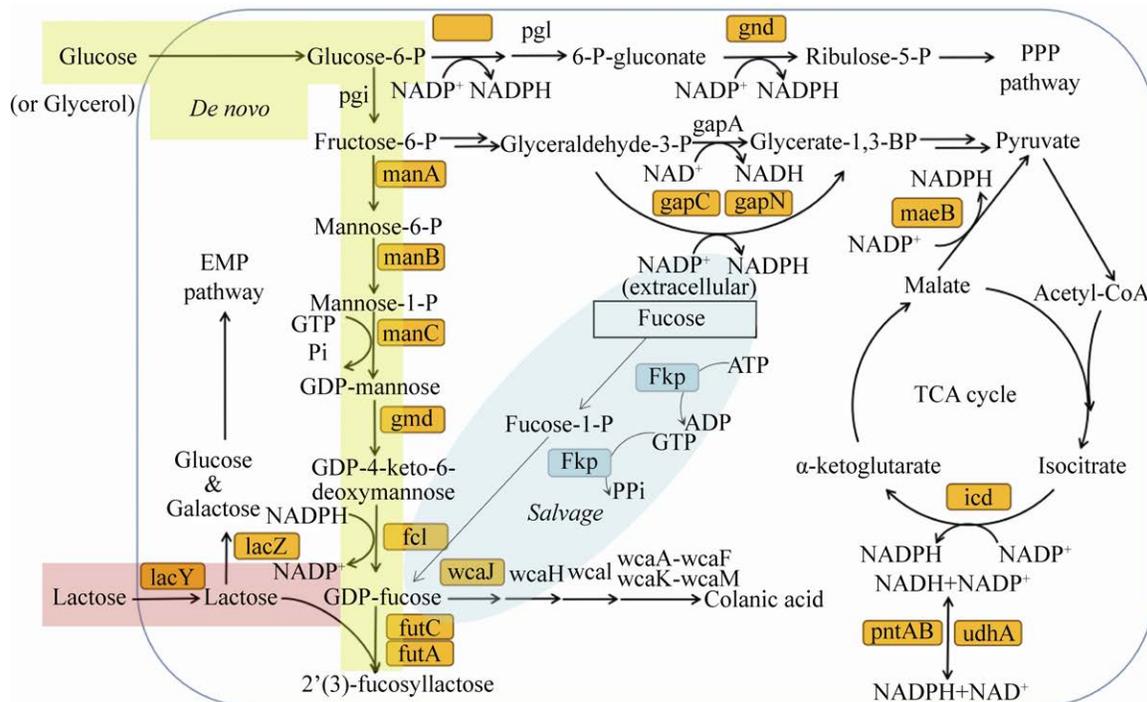


图 2 2'-FL 或 3-FL 的生物合成路径 (修改自文献[11])

Fig. 2 The biosynthetic routes of 2'-FL and 3-FL, modified from reference [11].

这是首次采用 *De novo* 途径, 该途径成为研究的焦点, Lee 等^[16]在 *E. coli* BL21 star(DE3) 菌株中表达了幽门螺杆菌来源的 FucT2 酶以及 ManB、ManC、Gmd、WcaG 酶, 但该菌株分解乳糖的能力较强, 因此难以大量积累 2'-FL。更换无法水解乳糖的 *E. coli* JM109(DE3) 后, 乳糖仅被用于合成 2'-FL, 产量上升到 1.2 g/L, 但仅为理论产量的 20%。此外, 作者发现 FucT2 表达后可溶性很差, 多为包涵体, 因此解决该酶的可溶性问题将提高 2'-FL 的合成能力。例如, Chin 等^[17]在其 N 端融合了 3 个天冬氨酸 (D3 标签), 使得酶可溶性提升, 酶活力提高了 3.4 倍, 这种添加负电荷氨基酸标签的方式早先也被用于提高脂肪酶在大肠杆菌中的可溶性表达, 获得了较好的效果, 因而具备一定的普适性。

由于 *E. coli* JM109(DE3) 菌株存在一些产业化应用的缺陷, 包括生长缓慢、易产乙酸、易形成生物膜等, Chin 等^[18]尝试使用 BL21 star(DE3) 菌株, 他们使用 λ -Red 重组技术改造了乳糖操纵子, 使得 BL21 star(DE3) 水解乳糖的能力下降了 97%, 解决了乳糖易被宿主分解的问题。尽管最终产量并不如 JM109(DE3), 但每克乳糖对应的 2'-FL 产率提高了 3.6 倍。最终通过分批发酵实现了 2'-FL 产量 6.4 g/L, 最高细胞干重 71.1 g/L, 产率 0.118 g/(L·h)。Huang 等^[11]对不同的大肠杆菌宿主进行了比较, 结果表明对 2'-FL 而言 JM109(DE3) 产量最高, 对 3-FL 而言 JM109(DE3) 和 NovaBlue(DE3) 产量最高, 而这两种宿主都不能利用乳糖, 因此避免了乳糖分解。另一方面, 加强乳糖的转运能力对提高 2'-FL 产量有较大帮助, 已有报道通过表达乳酸克鲁维酵母来源的乳糖转运蛋白基因 *lac12* 来实现该目标。

补救途径 (Salvage pathway) 也获得了较多的关注, Baumgärtner 等^[18]利用 λ -Red 重组技术整合 2'-FL 表达元件到 JM109 的基因组, 表达元件包括 *gmd*、*wcaG*、*manB*、*manC*、*futC* (双拷贝)

和 *fkp* 基因, 每个基因单独配置 tac 启动子, 整个体系没有使用质粒, 因此无需使用抗生素。重组菌以甘油为碳源, 岩藻糖和乳糖为底物, 合成 2'-FL 获得了 20.28 g/L 的产量, 产率 0.57 g/(L·h)。由于大肠杆菌本身具有 L-岩藻糖的利用途径, 因而造成胞内 L-岩藻糖的损耗; Chin 等^[19]在 *E. coli* BL21 star(DE3) 菌株中敲除了 *fucI* 和 *fucK* 两个 L-岩藻糖利用途径的关键酶基因, 敲除了 β -半乳糖苷酶基因 *lacZ*, 同时用质粒表达了 *fkp* 和 *fucT2* 两个基因, 成功以甘油为碳源将 2'-FL 产量提高到 23.1 g/L, 产率达到 0.389 g/(L·h), 2'-FL 和 L-岩藻糖的摩尔转化比为每摩尔 L-岩藻糖转化出 0.36 mol 2'-FL。岩藻糖在大肠杆菌胞内有代谢途径, 该途径会显著影响菌体的生长速率, 因此敲除该途径的 3 个关键基因 *fucI* (表达 L-岩藻糖异构酶)、*fucK* (表达 L-墨角藻糖激酶)、*fucA* (表达 L-墨角藻糖-1-磷酸醛缩酶) 将重组菌生长速率提高了 14%–78%。进一步地, 在此基础上 Jung 等^[20]敲除了 *araA* 和 *rhaA* 两个基因 (分别表达 L-阿拉伯糖异构酶和鼠李糖异构酶), 使得重组菌能够产出 47 g/L 的 2'-FL, 是文献报道的最高产量; 产率也达到最高的 0.6 g/(L·h)。然而作者发现 L-岩藻糖到 2'-FL 的摩尔转化率为 0.52, 表明仍然有接近一半的 L-岩藻糖被其他代谢途径消耗, 造成了浪费。

Salvage 途径具有技术局限性, 原因是 L-岩藻糖价格昂贵且难以获得, 产业化难度较大^[3]。相比较而言, *De novo* 途径不引入 L-岩藻糖而以葡萄糖或甘油为碳源合成 2'-FL 前体 GDP-L-岩藻糖。显然, *De novo* 途径的增产需要足够的胞内 GDP-L-岩藻糖。为了实现过量积累, 多个课题组优化了 GDP-L-岩藻糖合成途径。Byun 等^[21]优化大肠杆菌 *de novo* 途径产 GDP-L-岩藻糖的产量为 55.2 mg/L, 共表达了 *gmd*、*wcaG*、*zwf* 三个基因; 其中 *zwf* 基因属于磷酸戊糖途径, 编码负责 NADPH 再生的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH), 从而为 WcaG 催化的反应供应更多的 NADPH。

Lee 等^[22]通过在大肠杆菌中表达 *gmd*、*wcaG*、*manB*、*manC* 获得了 170.3 mg/L 的 GDP-L-岩藻糖含量,是仅表达 *gmd* 和 *wcaG* 对照组的 4.4 倍,表明 *manB* 和 *manC* 的过表达较为重要。但继续表达 *manA* 并没有进一步增强 GDP-L-岩藻糖的产量,表明该基因无需过表达。大肠杆菌的最高 GDP-L-岩藻糖积累量为 235.2 mg/L,是通过表达 *gmd*、*wcaG*、*manB*、*manC*、*g6pdh*、*icd*、*maeB* 七个基因实现的,其中 G6PDH、Icd、MaeB 均负责产生还原力 NADPH,十分有利于 GDP-L-岩藻糖的积累^[23]。Koizumi 等^[24]利用大肠杆菌和产氨短杆菌 *Corynebacterium ammoniagenes* 来混菌发酵,产氨短杆菌具有很强的转化 GMP 为 GTP 的能力,GTP 被大肠杆菌中的 ManC 酶催化产生 GDP-D-甘露糖,在经过 Gmd 和 WcaG 的作用形成 GDP-L-岩藻糖,并通过 FucT 催化与 N-乙酰-D-乳糖胺 (LacNAc) 反应生成终产物 Lewis X (也称 CD15),这步反应释放的 GDP 再次通过产氨短杆菌转化为 GTP;该混菌体系获得了惊人的 18.4 g/L 的反应中间体 GDP-L-岩藻糖,最终收获了 21 g/L 的 Lewis X,这为 2'-FL 和 3-FL 的大量合成提供了一种新思路,但混菌发酵较为复杂,研究难度大,因此尚未见更多的应用报道。3-FL 的合成研究较 2'-FL 少,Jung 等^[25]通过表达幽门螺杆菌 FutA,实现了 3-FL 的从头生物合成 (*de novo*),其表达宿主基于大肠杆菌 BL21 star(DE3) Δ L-YA 菌株,作者发现以甘油为碳源的 3-FL 产量要远高于葡萄糖为碳源,并且敲除了可拉酸合成途径的关键基因 *wcaJ* 后菌株 Δ LW-YA 中 3-FL 产量达到了 11.5 g/L,摩尔得率 0.39 mol/mol,产率 0.22 g/(L·h)。Choi 等^[26]发现 BL21(DE3) 乙酸产生量更低,因此更适合生产 3-FL。结合上述报道,2'-FL 和 3-FL 的生物制备工艺总结为表 1,对中间体 GDP-L-岩藻糖的增强合成工艺总结为表 2。

3 2'-FL 和 3-FL 合成关键酶的研究

2'-FL 和 3-FL 的合成关键酶较多,主要包括

Gmd、WcaG、1,2-FT、1,3-FT 等。近年来,针对以上关键酶的酶源挖掘与分子改造研究逐步深入。多篇文献针对关键酶酶源进行了挖掘与筛选分析,其中研究最为详细的是 1,2-FT 酶 (α 1,2-岩藻糖基转移酶)。南开大学的 Huang 等^[11]对 α 1,2-岩藻糖基转移酶基因 *futC*、*futL*、*futF*、*wbsJ*、*wbwK*、*wbgL*、*wbiQ*、*futG*、*futN*、*wcfB*、*wcfW* 进行了比较,结果表明来源于幽门螺杆菌的 *futC* 效果最好。此外他们还对 *futB*、*futA*、*futD*、*futE*、*futH*、*futJ*、*futK*、*futM* 等 1,3-FT 基因 (α 1,3-岩藻糖基转移酶)进行了比较研究,结果表明表达 FutA 酶获得的 3-FL 产量最高。Albermann 等和 Yu 等^[14,27]发现 FucT2 酶的底物特异性不强,会造成副产物积累,例如在重组酵母以及大肠杆菌合成 2'-FL 过程中测到了乳糖二岩藻糖四糖 (Difucosyllactose),这是由于 FucT2 酶以第一次合成出的 2'-FL 为底物,二次转糖苷形成了四糖产物。与 FucT2 酶相比较,WcfB 酶的底物特异性要强得多,利用 WcfB 酶催化的产物中没有发现副产物,且 2'-FL 的产量提高了^[28];这表明有必要对 α 1,2-岩藻糖基转移酶的底物特异性进行研究,提高合成效率。关键酶的改造研究对于提高酶的可溶性以及产物合成能力至关重要,已报道文献主要针对 3-FL 合成酶 1,3-FT。2006 年 Lin 等和 Ma 等^[29-30]分别研究了幽门螺杆菌来源 1,3-FT 酶的可溶性问题。研究表明,改善关键酶的可溶性能够有效提升 3-FL 产量,Choi 等^[31]也发现幽门螺杆菌 1,3-FT 酶可溶性可以通过密码子优化和截短 C 末端来获得大幅提升,截短体 Δ 52 的蛋白可溶性上升到 0.15–0.20 g/L,3-FL 初筛产量提高了 18 倍。进一步利用 HotSpot Wizard 在线预测来定点突变获得了突变体 A128N,活性又提高 3.4 倍,最终构建的 Δ 52 四位点突变体 A128N/H129E/Y132I/S46F 是野生型酶催化效率的近 20 倍 (对底物乳糖的 k_{cat}/K_m 值达到 4.97 L/(mmol·min)),这表明截短体是增强这类酶催化活性的一种途径。Yu 等^[32]对幽门螺杆菌来源

表 1 已报道的 2'-FL 和 3-FL 生物制备技术

Table 1 The reported bio-production processes of 2'-FL and 3-FL

Microbial hosts and pathway selection	Expressed genes	Deleted genes	Titer (g/L)	Productivity g/(L·h) (fermentation time)	Molar yield (mol product/mol substrate)	References
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (salvage)	<i>fkp, gsk, mfutA</i>	<i>lacZΔm15*</i> , <i>fucIK</i>	3-FL, 4.6 (extracellular)	0.076 (60 h)	0.33 (mol 3-FL/mol lactose)	[26]
<i>E. coli</i> JM109 (salvage)	<i>fkp, futC, gmd, wcaG,</i> <i>manB, manC</i>		2'-FL, 20.28 (50% for extracellular)	0.57 (35.5 h)	NR	[18]
<i>E. coli</i> BL21star(DE3) (salvage)	<i>fkp, fucT2</i>	<i>fucI, fucK,</i> <i>lacZ</i>	2'-FL, 23.1 (extracellular)	0.389 (>70 h)	0.36 (mol 2'-FL/mol fucose)	[19]
<i>E. coli</i> BL21star(DE3) (salvage)	<i>fkp, fucT2</i>	<i>araA, rhaA,</i> <i>fucI, fucK,</i> <i>lacZ</i>	2'-FL, 47 (extracellular)	0.60 (80 h)	0.52 (mol 2'-FL/mol fucose)	[20]
<i>E. coli</i> JM109(DE3) (<i>de novo</i>)	<i>manB, manC, gmd,</i> <i>wcaG, fucT2</i>		2'-FL, 1.23 (extracellular)	0.013 (96 h)	0.09 (g 2'-FL/g lactose)	[16]
<i>E. coli</i> BL21star(DE3) (<i>de novo</i>)	<i>manB, manC, gmd,</i> <i>wcaG, fucT2</i> (fus aspartic acid tag)	<i>lacZΔm15*</i>	2'-FL, 6.4 (extracellular)	0.118 (78 h)	0.225 (g 2'-FL/g lactose)	[17]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (<i>de novo</i>)	<i>lacY, rcsA, zwf, icd,</i> <i>gnd, maeB, pntAB,</i> <i>udhA, gapC, gapN</i>	<i>lacZ, ion,</i> <i>wcaJ</i>	2'-FL, 9.12 3-FL, 12.43 (50% for extracellular)	NR	NR	[11]
<i>E. coli</i> (<i>de novo</i>)	<i>futC, rcsA</i>		2'-FL, 14 (intracellular 3, extracellular 11)	0.31 (45 h)	NR	[15]
<i>E. coli</i> ΔL M15 (<i>de novo</i>)	<i>manB, manC, gmd,</i> <i>wcaG, wcfB</i>	<i>lacZ</i>	2'-FL, 15.4 (extracellular)	0.53 (46 h)	0.6 (mol 2'-FL/ mol lactose)	[28]
<i>E. coli</i> BL21star(DE3) (<i>de novo</i>)	<i>gmd, wcaG, manB,</i> <i>manC</i>	<i>lacZΔm15*</i>	2'-FL, 0.49 (flask, 87.7% for extracellular)	0.007 (72 h)	NR	[40]
<i>E. coli</i>	NR	NR	3-FL, 0.26	NR	NR	[32]
<i>E. coli</i> BL21star(DE3) (<i>de novo</i>)	<i>futC, gmd, wcaG,</i> <i>manB, manC</i>	<i>lacZ, wcaj</i>	3-FL, 11.5 (extracellular)	0.22 (65 h)	0.39 (mol 3-FL/mol lactose)	[25]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (salvage)	<i>lacI2, fkp, fucT2</i>		2'-FL, 0.5 (25% for extracellular)	0.004 (120 h)	0.63 (mol 2'-FL/mol fucose)	[27]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>de novo</i>)	<i>lacI2, gmd, wcaG,</i> <i>fucT2</i>		2'-FL, 0.56 (75% for extracellular)	0.0058 (96 h)	0.229 (mol 2'-FL/mol lactose)	[34]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>de novo</i>)	NR	NR	2'-FL 15	0.22 (68 h)	NR	[35]
<i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>de novo</i>)			24	0.44 (55 h)		
<i>B. subtilis</i> (salvage)	<i>lacI2, fkp, fucT, glcP,</i> several genes for GTP synthesis	<i>yesZ</i>	2'-FL, 5.01	0.1 (48 h)	0.85 (mol 2'-FL/mol fucose)	[36]

*: *lacZ* was knocked-out partially.

表 2 已报道的 GDP-L-岩藻糖增强合成方法

Table 2 The reported enhanced biosynthesis of GDP-L-fucose

Microbial hosts	Expressed genes	GDP-L-fucose concentration	Productivity	References
<i>E. coli</i> (<i>de novo</i>)	<i>gmd, wcaG, zwf</i>	55.2 mg/L	2.5 mg/(L·h)	[21]
<i>C. glutamicum</i> (<i>de novo</i>)	<i>gmd, wcaG, manB, manC</i>	86.2 mg/L	NR	[37]
<i>E. coli</i> (salvage)	<i>fkp, gpt, gmk, ndk</i>	122.0 mg/L	NR	[41]
<i>E. coli</i> (<i>de novo</i>)	<i>gmd, wcaG, manB, manC</i>	170.3 mg/L	6.7 mg/(L·h)	[22]
<i>E. coli</i> (<i>de novo</i>)	<i>gmd, wcaG, manB, manC, G6PDH (zwf), icd, maeB</i>	235.2 mg/L	NR	[23]
<i>E. coli</i> and <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> (mixed fermentation)	<i>gmd, wcaG, manB, manC</i>	18.4 g/L	NR	[24]

NR: not reported.

的 3 种 1,3-FTs (*ft1*、*ft2*、*pylT*) 进行了研究, 这类酶是细胞膜结合的二聚体蛋白, C 末端都具有重复型七肽结构 (2–10 个) 来保持二聚体结构, 还具有一个细胞膜铆钉区域。当增加重复七肽数量以及去除膜结合区域后二聚体结构更加稳定且活性上升, 使得 3-FL 产量能够提升 10–20 倍。除截短改造外, 基于高通量筛选的定向进化方法也是提高关键酶产物合成能力的有效手段。上海交通大学研究团队对 3-FL 合成酶 FutA 进行了定向进化研究^[33], 利用荧光激活细胞分离仪 FACS 技术对 3-FL 进行标记, 以易错 PCR 产生的大肠杆菌单克隆的胞内 3-FL 含量作为筛选指标; 经过 3 轮筛选获得了突变体 M32 (7 点突变: S45F/D127N/R128E/H131I/Y199N/E340D/V368A), 该突变体的 3-FL 合成能力提升了 14 倍 (k_{cat}/K_m 值由 2.53 L/(mmol·s) 提升到 15.59 L/(mmol·s)), 其主要原因是突变体的 K_m 值大幅下降, 仅为野生型酶的 9.2% (9.2 mmol/L)。晶体结构解析和分子动力学 MD 模拟分析表明 S45F 突变在活性中心形成了一个钳形结构, 增强了对半乳糖基团的亲和力, 而 α 螺旋 $\alpha 5$ 的灵活性获得提升, 可能增强了其岩藻糖糖基化能力。综上所述, 2'-FL 和 3-FL 合成关键酶在新酶源挖掘与比较、酶分子改造等方面已取得了成果, 为提升人乳寡糖产量奠定基础。

4 利用食品安全型底盘微生物合成 2'-FL

由于大肠杆菌会分泌内毒素 (热源) 且极易感染噬菌体, 因此开发食品安全型微生物作为细胞工厂来生产 2'-FL 具有重要意义。相比较而言, 酵母已被人类使用几千年非常安全, 不易被噬菌体感染, 是食品药品行业非常有竞争力的宿主微生物, 常用的酵母底盘包括酿酒酵母、毕赤酵母、解脂耶氏酵母等。伊利诺伊大学香槟分校的 Liu 等^[34]首先在酿酒酵母中构建了 2'-FL 的 *de novo* 合成途径, 成功合成出了 2'-FL, 产量 0.51 g/L, 作者还通过表达一个 α -岩藻糖苷酶基因将 2'-FL 水解为 L-岩藻糖, 从而获得了 0.41 g/L 的 L-岩藻糖。尽管产量很低, 但还是对于酵母底盘的应用作了探索性贡献。Yu 等^[27]在酿酒酵母中表达乳糖透过酶基因 *lac12*、*fkp*、*fucT2*, 发酵 120 h 获得了 0.5 g/L 的 2'-FL, 但 75% 的 2'-FL 被发现位于胞内, 仅有 25% 分泌到了胞外, 而在大肠杆菌也只有不到 50% 的 2'-FL 能够分泌到胞外。2019 年, 杜邦公司的 Hollands 等^[35]分别开发了酿酒酵母和解脂耶氏酵母两个底盘来尝试 *de novo* 途径, 其中酿酒酵母底盘做到了 15 g/L 产量, 产率 0.22 g/(L·h), 发酵时间约 70 h; 解脂耶氏酵母更是达到了 24 g/L, 产率 0.44 g/(L·h), 发酵时间不到 60 h, 该研究是食品级宿主生产 2'-FL 的较大突破, 为产业化应用提供了可能。当然, 酵母底盘也存在一些缺点,

例如发酵延滞期长、总周期长等。枯草芽孢杆菌是安全性较好的食品级微生物宿主, 江南大学研究团队尝试利用重组枯草芽孢杆菌生产 2'-FL, 采用了补救途径。通过提高底物 L-岩藻糖和乳糖的转运 (过表达 *glcP* 和 *lac12* 基因)、去除乳糖水解途径 (敲除 *yesZ* 基因)、引入补救途径关键基因 *fkp* 和 *fucT*、增强 GTP 的再生 (调节 GTP 合成的数个关键基因) 这几种方法, 将 2'-FL 在补料发酵中的产量提升到 5.01 g/L (合成 36 h), 是摇瓶实验的 4.84 倍。L-岩藻糖的摩尔转化率达到最高的 0.85, 由于理论摩尔转化率为 1.0, 因此作者认为枯草芽孢杆菌中可能存在未知的 L-岩藻糖消耗途径^[36]。Chin 等^[37]在谷氨酸棒杆菌中表达了 *gmd*、*wcaG*、*manB*、*manC* 四个基因来构建 *de novo* 途径, 最终获得了 86.2 mg/L 的 GDP-L-岩藻糖; 这是首次在大肠杆菌以外的菌株实现关键前体 GDP-L-岩藻糖的积累。综上所述, 多个课题组开展了食品级微生物宿主生产 2'-FL 或 3-FL 的研究。结果表明酵母、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌均具备了开发为工业生产菌株的潜力, 其中酵母底盘的效果最优。

5 对 2'-FL 运出蛋白的研究

由于胞内合成的 2'-FL 有时难以有效地被输送到胞外, 导致部分残留在胞内 (大部分文献中残留率达 50%), 需要破胞才能获得所有 2'-FL, 这对下游产物分离和提取造成了很大困难, 这也是目前的一大技术瓶颈。Hollands 等^[35]对 2'-FL 的转运蛋白进行了系统研究, 他们依据 3 个基本原则, 包括: (1) 挑选一切有可能转运 2'-FL 的转运蛋白, 最终锁定大肠杆菌 *SetA* 为参考对象, 使用隐马尔可夫模型 (HMM) 检索到数个候选蛋白。(2) 挑选真菌来源能够转运二糖、三糖、四糖的转运蛋白, 最终锁定粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 来源的 CDT1 和 CDT2 转运蛋白。(3) 不依赖 ATP 水解、能够在同向和反向协同过程中保持

质子或金属离子动态平衡的转运蛋白, 这让他们锁定植物源转运蛋白 SWEET 家族。根据以上原则筛选了 27 种不同的转运蛋白, 结果表明 CDT2 和大肠杆菌 *SetA* 对 2'-FL 的转运效果最好, SWEET 家族蛋白和 CDT1 则没有效果, 但 *SetA* 会降低菌体生长速率, 因此最终选择 CDT2 作为酵母底盘的 2'-FL 转运蛋白, 通过荧光显微镜可以观察到 CDT2 在细胞膜上的聚集, 酿酒酵母合成 2'-FL 的胞外/胞内含量比例提高到约 2.5 倍 (对照组不到 1.5 倍), 解脂耶氏酵母的该比例由不到 1 倍提升到 1.5 倍以上, 为 2'-FL 的产物释放提供了有力借鉴; 然而, 对大肠杆菌的人乳寡糖转出蛋白研究还未见。

6 2'-FL 的专利保护情况

截止目前, 2'-FL 和 3-FL 的发明专利情况如表 3 所示。中国发明专利获得授权的较少, 国际专利申请人包括德国巴斯夫公司、丹麦 Glycom 公司、美国杜邦公司、美国雅培制药公司、美国 Glycosyn 公司、德国 Jennewein Biotechnologie 公司等知名 HMO 供应商, 专利内容包括 2'-FL 和 3-FL 的发酵合成、关键酶改造、产品分离纯化、产品结晶、产品应用等多个方面。其中多数专利由欧洲企业申报, 表明欧洲已成为人乳寡糖产品的研发与生产中心。

7 2'-FL 和 3-FL 的产业化前景

近期丹麦 Glycom 公司的 Agoston 等^[38]也报道了化学合成 2'-FL 的工艺, 并获得了公斤级的高纯度产品, 该路线是将乳糖经过 2 步反应获得中间体 3、岩藻糖经过 4 步反应获得中间体 8, 3 和 8 再经过 4 步反应得到 2'-FL, 所有的反应步骤均在接近常温的条件下完成, 能耗相对经济。尽管总得率不高, 但化学工艺在生产稳定性上往往占有优势, 因此化学法的进步也对人乳寡糖的生物法研发提出了更高的要求, 但生物制备技术仍有瓶颈问题待进一步突破: (1) 大幅提升关键酶

表 3 2'-FL 和 3-FL 的部分发明专利*

Table 3 Part of published patents for 2'-FL and 3-FL

Patent title	Patent number	Patent applicant	Application time
促进有益微生物群生长的益生菌和人乳寡糖的合益素组合 (授权中国发明专利)	CN201180068703.2	Abbott Laboratories	2011/12
Increasing activity of 2'-fucosyllactose transporters endogenous to microbial cells	US201815959573	DuPont Nutrition & Biosciences	2018/04
Hydrated and anhydrous polymorphs of 2'-fucosyllactose and their production methods	US201916393866	BASF SE	2019/04
Use of purified 2'-fucosyllactose, 3-fucosyllactose and lactodifucotetraose as prebiotics	US201916403095	Glycosyn LLC Trustees Boston College	2019/05
Process for purification of neutral human milk oligosaccharide using simulated moving bed chromatography	US201916440100	Jennewein Biotechnologie GmbH	2019/06
Separation of 2'-O-fucosyllactose from fermentation broth	WO2015DK50158	Glycom AS	2015/06
Crystalline 3-O-fucosyllactose	US201314442017	Glycom AS	2013/09
2'-Fucosyllactose producing mutant microorganisms and method for producing 2'-fucosyllactose using same	WO2016KR03013	Seoul National University R&db Foundation	2016/03
Method for the production of fucosyllactose in bacterial cells	US201314100825	Jennewein Biotechnologie GmbH	2013/12
Polymorphs of 2'-O-fucosyllactose and producing thereof	PCT/DK2011/050192	Glycom AS	2011/06
Crystalline 3-O-fucosyllactose	PCT/DK2013/050300	Glycom A/S	2013/09

*: Searched in European Patent Office (EPO) database.

的活力和可溶性,尤其是 2'-FL 和 3-FL 合成关键酶,都存在外源表达可溶性差、酶活性低的问题,探索其与分子伴侣的适配性来提升表达效果,开发新酶源替代现有酶极为重要,而这其中必须借助高通量的筛选技术并对基因资源库进行充分探索。(2) 将关键酶基因整合到宿主染色体,避免基于抗生素的质粒体系带来的生产不稳定性以及食品安全问题,但这其中伴随着因染色体基因拷贝数降低而产量下降的可能,需要更多的实验来佐证效果。(3) 增强底盘宿主对 2'-FL 和 3-FL 的胞外分泌能力,筛选更好的产物运输蛋白,免去破胞步骤,减小下游产品分离提取的难度,这是目前最应该解决的瓶颈问题。(4) 进一步提升底盘微生物胞内合成 GDP-L-岩藻糖的能力,改造其合成途径的关键酶,例如解决 Gmd 酶的产物抑制作用,大幅提升限速酶的合成力。(5) 开发高效的 2'-FL 和 3-FL 下游分离提取技术,降低分离成本并提高产物提取收率。

8 展望

国外如韩国、欧盟等对人乳寡糖的研究已非常深入,国内对 2'-FL 和 3-FL 的研究起步较晚,但近期关注度很高。由于对人乳寡糖的重视程度与日俱增,2016 年国家食品安全风险评估中心(CFSA) 已对 2'-FL 作为食品添加剂新品种公开征求意见,因此 2'-FL 的法规出台有望提上日程。尽管欧洲对大肠杆菌生产 2'-FL 持开放态度^[39],开发食品安全级别的宿主(如具有 GRAS 认证或国标 GB2760 认证) 仍然很有必要,尤其是开发酵母、谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌等食品行业非常成熟的底盘微生物。此外,对于转基因菌种的使用在法规上较为模糊,有待国家相关部门和企业的产业标准出台。从技术角度来看,对合成途径中的新酶挖掘与改造至关重要,需要生物信息学、基因组学、高通量筛选等技术的介入,例如近年来兴起的蛋白质从头设计法(*De novo design*) 和基于微流控的荧光激活细胞分选技术

(FACS) 可分别从理性设计和定向进化两种角度深入研究。在知识产权方面, 应尽快建立专利壁垒, 形成我国自有知识产权的 HMO 生产技术。由于中国人普遍存在乳糖不耐受症, 故乳糖是不受欢迎的乳业废弃物, 未经处理排放还会造成严重水体污染, 因此开发 HMO 将极大提升乳糖的利用附加值, 具有重要的经济价值与乳品产业升级意义。

REFERENCES

- [1] Zhai YF, Yu X, Xiang QS, et al. Research progress of human milk oligosaccharides synthesis *in vitro*. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(5): 348–352 (in Chinese).
翟娅菲, 禹晓, 相启森, 等. 人乳寡糖体外合成研究进展. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 348–352.
- [2] Han NS, Kim TJ, Park YC, et al. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1268–1278.
- [3] Bych K, Mikš MH, Johanson T, et al. Production of HMOs using microbial hosts—from cell engineering to large scale production. *Curr Opin Biotech*, 2019, 56: 130–137.
- [4] Grollman AP, Hall CW, Ginsburg V. Biosynthesis of fucosyllactose and other oligosaccharides found in milk. *J Biol Chem*, 1965, 240(3): 975–981.
- [5] Sprenger GA, Baumgärtner F, Albermann C. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations. *J Biotechnol*, 2017, 258: 79–91.
- [6] Anderson A, Donald ASR. Improved method for the isolation of 2'-fucosyllactose from human milk. *J Chromatogr A*, 1981, 211(1): 170–174.
- [7] Vandenplas Y, Berger B, Carnielli VP, et al. Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lacto-N-neotetraose (LNnT) in infant formula. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1161.
- [8] Reverri EJ, Devitt AA, Kajzer JA, et al. Review of the clinical experiences of feeding infants formula containing the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1346.
- [9] Facinelli B, Marini E, Magi G, et al. Breast milk oligosaccharides: effects of 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose on the adhesion of *Escherichia coli* and *Salmonella fytis* to Caco-2 cells. *J Matern-Fetal Neo Med*, 2019, 32(17): 2950–2952.
- [10] Weichert S, Jennewein S, Hüfner E, et al. Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutr Res*, 2013, 33(10): 831–838.
- [11] Huang D, Yang KX, Liu J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement. *Metab Eng*, 2017, 41: 23–38.
- [12] Albermann C, Distler J, Piepersberg W. Preparative synthesis of GDP- β -l-fucose by recombinant enzymes from enterobacterial sources. *Glycobiology*, 2000, 10(9): 875–881.
- [13] Ge ZM, Chan NW, Palcic MM, et al. Cloning and heterologous expression of an α 1,3-fucosyltransferase gene from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 21357–21363.
- [14] Albermann C, Piepersberg W, Wehmeier UF. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr Res*, 2001, 334(2): 97–103.
- [15] Drouillard S, Driguez H, Samain E. Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori* α 1, 2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* cells. *Angew Chem Int Edit*, 2006, 45(11): 1778–1780.
- [16] Lee WH, Pathanibul P, Quarterman J, et al. Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 48.
- [17] Chin YW, Kim JY, Lee WH, et al. Enhanced

- production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* BL21star (DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase. *J Biotechnol*, 2015, 210: 107–115.
- [18] Baumgärtner F, Seitz L, Sprenger GA, et al. Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 40.
- [19] Chin YW, Seo N, Kim JH, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce 2'-fucosyllactose via *salvage* pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP)-L-fucose. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(11): 2443–2452.
- [20] Jung SM, Chin YW, Lee YG, et al. Enhanced production of 2'-fucosyllactose from fucose by elimination of rhamnose isomerase and arabinose isomerase in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(9): 2412–2417.
- [21] Byun SG, Kim MD, Lee WH, et al. Production of GDP-L-fucose, L-fucose donor for fucosyloligosaccharide synthesis, in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(4): 768–775.
- [22] Lee WH, Han NS, Park YC, et al. Modulation of guanosine 5'-diphosphate-d-mannose metabolism in recombinant *Escherichia coli* for production of guanosine 5'-diphosphate-l-fucose. *Bioresour Technol*, 2009, 100(24): 6143–6148.
- [23] Lee WH, Chin YW, Han NS, et al. Enhanced production of GDP-L-fucose by overexpression of NADPH regenerator in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot*, 2011, 91(4): 967–976.
- [24] Koizumi S, Endo T, Tabata K, et al. Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J Ind Microbiol Biot*, 2000, 25(4): 213–217.
- [25] Jung SM, Park YC, Seo JH. Production of 3-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* with α -1,3-fucosyltransferase from *Helicobacter pylori*. *Biotechnol J*, 2019, 14(6): 1800498.
- [26] Choi YH, Park BS, Seo JH, et al. Biosynthesis of the human milk oligosaccharide 3-fucosyllactose in metabolically engineered *Escherichia coli* via the salvage pathway through increasing GTP synthesis and β -galactosidase modification. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(12): 3324–3332.
- [27] Yu S, Liu JJ, Yun EJ, et al. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 101.
- [28] Chin YW, Kim JY, Kim JH, et al. Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative α -1,2-fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis*. *J Biotechnol*, 2017, 257: 192–198.
- [29] Lin SW, Yuan TM, Li JR, et al. Carboxyl terminus of *Helicobacter pylori* α 1,3-fucosyltransferase determines the structure and stability. *Biochemistry*, 2006, 45(26): 8108–8116.
- [30] Ma B, Audette GF, Lin SJ, et al. Purification, kinetic characterization, and mapping of the minimal catalytic domain and the key polar groups of *Helicobacter pylori* α -(1,3/1,4)-fucosyltransferases. *J Biol Chem*, 2006, 281(10): 6385–6394.
- [31] Choi YH, Kim JH, Park BS, et al. Solubilization and iterative saturation mutagenesis of α -1,3-fucosyltransferase from *Helicobacter pylori* to enhance its catalytic efficiency. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(8): 1666–1675.
- [32] Yu J, Shin J, Park M, et al. Engineering of α -1,3-fucosyltransferases for production of 3-fucosyllactose in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2018, 48: 269–278.
- [33] Tan YM, Zhang Y, Han YB, et al. Directed evolution of an α -1,3-fucosyltransferase using a single-cell ultrahigh-throughput screening method. *Sci Adv*, 2019, 5(10): eaaw8451.
- [34] Liu JJ, Kwak S, Pathanibul P, et al. Biosynthesis of a functional human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, and L-fucose using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(11): 2529–2536.

- [35] Hollands K, Baron CM, Gibson KJ, et al. Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose. *Metab Eng*, 2012, 52: 232–242.
- [36] Deng JY, Gu LY, Chen TC, et al. Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(10): 2418–2427.
- [37] Chin YW, Park JB, Park YC, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to produce GDP-L-fucose from glucose and mannose. *Bioproc Biosyst Eng*, 2013, 36(6): 749–756.
- [38] Agoston K, Hederos MJ, Bajza I, et al. Kilogram scale chemical synthesis of 2'-fucosyllactose. *Carbohyd Res*, 2019, 476: 71–77.
- [39] EU approved lactose-N-neotetrasaccharide as a new food ingredient. *Chin J Food Hyg*, 2016, 28(2): 262 (in Chinese).
欧盟批准乳糖-N-新四糖等作为新食品成分使用. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(2): 262. <http://www.chinabeverage.org/standard/show/detail.php?id=7818>.
- [40] Seydametova E, Yu J, Shin J, et al. Search for bacterial α -1,2-fucosyltransferases for whole-cell biosynthesis of 2'-fucosyllactose in recombinant *Escherichia coli*. *Microbiol Res*, 2019, 222: 35–42, DOI: 10.1016/j.micres.2019.02.009.
- [41] Zhai YF, Han DL, Pan Y, et al. Enhancing GDP-fucose production in recombinant *Escherichia coli* by metabolic pathway engineering. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 69: 38–45.

(本文责编 陈宏宇)