



# 人乳寡糖 2'-岩藻糖基乳糖的功能及其全细胞生物合成

邢敏钰<sup>1</sup>, 谭丹<sup>2</sup>, 冉淦侨<sup>1,3\*</sup>

1 陕西省生物农业研究所, 陕西 西安 710043

2 西安交通大学生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049

3 陕西省酶工程技术研究中心, 陕西 西安 710600

邢敏钰, 谭丹, 冉淦侨. 人乳寡糖 2'-岩藻糖基乳糖的功能及其全细胞生物合成. 微生物学报, 2022, 62(7): 2478–2497.

Xing Minyu, Tan Dan, Ran Ganqiao. Function and whole-cell biosynthesis of human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2478–2497.

**摘要:** 母乳是新生儿最理想的营养剂。其中, 人乳寡糖作为母乳的第三大固体组分, 对新生儿的生长、发育及健康状况有重要影响, 被应用于婴幼儿配方食品中。2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL), 是分泌型母乳中含量最高的人乳寡糖, 约占人乳寡糖总量的 30%, 具有重要的营养和医学价值。2'-FL 能够促进婴幼儿生长发育、提高其认知能力、增强免疫力、抗过敏、抗病毒, 以及调节肠道菌群, 是极具潜力的新型营养强化剂。但是, 2'-FL 来源于母乳, 依靠分离、提取获得大量 2'-FL 并不现实, 因此亟需进行人工合成。人工合成 2'-FL 的方法有 3 种, 包括: 化学合成法、酶催化合成法和全细胞生物合成法。全细胞生物合成法因其成本相对低廉, 且易于规模化扩大, 而引起了国内外的广泛关注和研究。目前, 国外很多跨国公司均开始布局 2'-FL 的工业化生产和应用, 而我国在该领域尚处于研发阶段, 因此, 了解和掌握 2'-FL 的合成方法对我国开展 2'-FL 规模化生产具有重要的意义。本文旨在介绍 2'-FL 的功能特性, 系统阐述其全细胞生物合成的关键技术和最新进展, 讨论了针对限速步骤进一步提高产量的策略, 旨在为 2'-FL 的合成和商业化生产提供生物学依据, 为今后开发接近母乳的婴幼儿配方奶粉奠定基础。

**关键词:** 2'-岩藻糖基乳糖; 人乳寡糖; 全细胞生物合成; 应用

**基金项目:** 陕西省科学院科技计划(2017K-13, 2019K-09)

Supported by the Scientific Research Projects of Shaanxi Academy of Science (2017K-13, 2019K-09)

\*Corresponding author. E-mail: [ranganqiao@163.com](mailto:ranganqiao@163.com)

Received: 15 November 2021; Revised: 13 January 2022; Published online: 11 February 2022

# Function and whole-cell biosynthesis of human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose

XING Minyu<sup>1</sup>, TAN Dan<sup>2</sup>, RAN Ganqiao<sup>1,3\*</sup>

1 Bio-Agriculture Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, Shaanxi, China

2 School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

3 Enzyme Engineering Research Center of Shaanxi Province, Xi'an 710600, Shaanxi, China

**Abstract:** Breast milk is the ideal food for infants. As the third most abundant solid ingredients in breast milk, human milk oligosaccharides (HMOs) have an important impact on the growth, development and health of infants. A few HMOs have been used in infant formulas. Among them, 2'-fucosyllactose (2'-FL) has the highest content and comprises 30% of the total HMOs in secretor milk. With high nutritional and medical values, 2'-FL is regarded as a new type of food nutrition fortifier, and it boasts multiple functions such as growth promotion, cognition benefits, immune enhancement, anti-allergic activity, anti-viral activity, and intestinal flora regulation. However, originating from breast milk, 2'-FL is unlikely to be obtained by separation. Thus, it is urgent to synthesize 2'-FL in artificial manners, which include chemical and enzymatic synthesis and whole-cell biosynthesis. Cost-effective and easy to scale up, whole-cell biosynthesis of 2'-FL has received worldwide attention. At present many foreign multinational companies have begun the industrial production and commercial application of 2'-FL, whereas the relevant work in China remains in research. Therefore, it is of great significance for China to master the synthesis method of 2'-FL. This paper aimed to review the functional characteristics of 2'-FL and systematically describe the key technologies and the latest progress in whole-cell biosynthesis. The strategies of rate-limiting steps to increase production were also discussed. We sought to provide a biological basis for the synthesis and commercial production of 2'-FL. Further, the paper facilitated the development of infant formulas close to human milk.

**Keywords:** 2'-fucosyllactose; human milk oligosaccharides; whole-cell biosynthesis; application

母乳富含碳水化合物、蛋白质、脂肪、无机盐以及微量元素等营养物质, 其成分和比例易于新生儿消化、吸收, 是新生儿最理想、最优质的天然食品<sup>[1]</sup>。此外, 母乳还具有健康功效; 母乳喂养短期内能起到抗感染的作用, 有效减少婴儿发生呼吸道感染、泌尿道感染、中耳炎、感染性胃肠炎、早产儿坏死性小肠结肠炎、儿童癌症, 以及 I 型糖尿病等疾病的风险; 同时, 母乳喂养还能够降低婴儿远期过敏、肥胖、冠心病、肿瘤等疾病的发病率<sup>[1-2]</sup>。

研究发现, 母乳对健康的促进作用主要是

由于母乳中存在多种生物活性因子<sup>[3]</sup>。人乳寡糖(human milk oligosaccharides, HMOs)作为母乳中仅次于乳糖和脂肪的第三大固体成分, 是母乳中重要的活性因子, 在婴儿的生长发育过程中发挥着特殊的作用<sup>[1,4-5]</sup>。HMOs 不仅可以抑制病原体与肠道黏膜结合、防止病原体定殖, 从而减少感染的风险<sup>[6-9]</sup>, 还可以促进双歧杆菌、乳酸菌等有益菌生长的活性, 抑制有害菌群生长, 维持肠道微生态的平衡<sup>[6,9]</sup>。此外, HMOs 还具有促进新生儿大脑早期发育, 提高婴儿免疫力的作用<sup>[9-11]</sup>。

HMOs 种类多样, 主要包括 2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、乳酰-N-新四糖、乳酰-N-四糖、6'-唾液酸乳糖和 3'-唾液酸乳糖等, 且随乳母的孕龄、血型、遗传、分泌状态、所在地域、饮食生活习惯及哺乳时段等条件的不同, HMOs 的分布也存在差异<sup>[1,5,12-13]</sup>。其中, 2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL, 结构式如图 1 所示)是分泌型母乳中含量最高的 HMO, 含量为 1.10–7.36 g/L, 约占总 HMOs 的 30%, 而在非分泌型母乳中则基本不存在<sup>[5,13,16-19]</sup>。2'-FL 是 1 分子岩藻糖通过  $\alpha$ -1,2 糖苷键与 1 分子乳糖中的半乳糖残基连接而成<sup>[1]</sup>。2'-FL 对婴儿生长发育效果明显, 是极具潜力的新型营养强化剂<sup>[20]</sup>。近年来, 2'-FL 的合成方法取得长足进步, 产量已经达到产业化水平, 国外很多跨国公司均开始布局 2'-FL 的工业化生产和应用, 而我国对 2'-FL 合成尚处于研发阶段, 能够规模化生产 2'-FL 的企业更是寥寥无几。本文介绍 2'-FL 的功能特性, 系统阐述其全细胞生物合成的关键技术和最新研究进展, 并针对限速步骤提出了进一步提高产量的策略, 为 2'-FL 在我国今后的产业化及应用推广奠定基础。

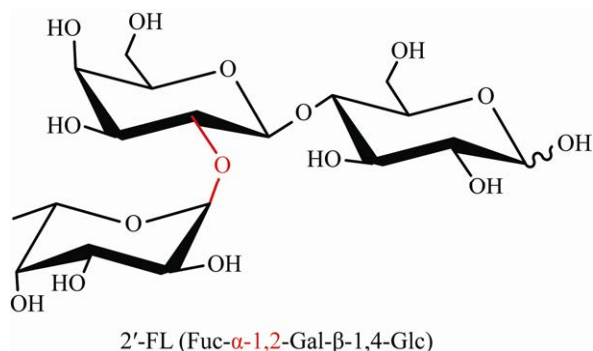


图 1 2'-FL 的结构示意图<sup>[14-15]</sup>

Figure 1 The chemical structure of 2'-FL<sup>[14-15]</sup>. The alpha-1,2-glycosidic bond is noted in red.

## 1 2'-FL 的主要生理功能

### 1.1 2'-FL 对生长发育的影响

潘丽娜等<sup>[21]</sup>在小鼠的饲料中添加不同浓度的 2'-FL, 饲喂 28 d 后发现 2'-FL 不仅可以增加小鼠胰岛素的含量, 还可以提高小鼠对钙、磷、粗脂肪和总能量的消化利用率。另有研究表明, 含 2'-FL 的配方奶粉对婴儿生长、发育的促进效果与完全母乳喂养的婴儿无显著性差异, 且婴儿对含 2'-FL 的配方奶粉耐受性良好<sup>[22-23]</sup>。

### 1.2 2'-FL 对认知能力的影响

Fleming 等<sup>[24]</sup>研究发现, 2'-FL 对学习和记忆也有积极作用, 饲喂了 2'-FL 的猪表现出更大的嗅球体积, 且与多巴胺、氨基丁酸、胆碱合成相关基因的表达水平, 以及与细胞粘附、染色质重塑过程相关基因的表达水平均有所改变。Vázquez 等<sup>[25]</sup>发现, 长期口服 2'-FL 有助于改善啮齿动物的突触可塑性, 增加参与储存新获得记忆的不同分子的表达, 从而影响啮齿动物的认知领域, 并改善其学习和记忆能力。此外, Berger 等<sup>[26]</sup>也发现早期接触 2'-FL 可以促进婴儿认知发展, 尤其是婴儿 1 个月时高频率的母乳喂养能够显著促进婴儿的认知发展。

### 1.3 2'-FL 对免疫的调节作用

近年来, 大量研究表明 2'-FL 在调节免疫系统方面具有积极作用<sup>[27]</sup>。而且随着 2'-FL 人工合成技术的发展, 欧美一些国家已经开始在配方奶粉中添加 2'-FL, 更多的临床研究也证实: 添加了 2'-FL 的配方奶粉能够有效促进婴幼儿免疫系统发育<sup>[27]</sup>。

#### 1.3.1 提高免疫力

2'-FL 能够促进免疫系统成熟, 提高免疫功能。Azagra-Boronat 等<sup>[28]</sup>从大鼠出生后开始每天给大鼠喂食 2'-FL, 16 d 后, 大鼠表现出较高的血浆 IgG 和 IgA 水平以及肠系膜淋巴结

中 T 细胞亚群增多的现象。Ayechu-Muruzabal 等<sup>[29]</sup>研究发现, 2'-FL 可通过支持微生物 CpG-DNA 的作用促进黏膜免疫发育, 该作用与调节上皮半乳糖凝集素和 TGF- $\beta$ 1 分泌有关。Mao 等<sup>[30]</sup>研究发现, 喂食含 2'-FL 配方奶的小鼠胸腺指数、淋巴细胞增殖率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 同时自然杀伤细胞活性和迟发型过敏反应程度均得到明显改善 ( $P < 0.05$ )。此外, 临床研究表明, 喂食含 2'-FL 配方奶粉的婴儿与喂食普通配方奶粉的婴儿在体重、消化情况、行为模式等方面类似; 但是血浆炎症细胞因子, 如白细胞介素(IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)、白细胞介素-1 受体拮抗剂(IL-1ra)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )等的浓度降低了 29%–83%; 同时在支气管炎、下呼吸道感染, 以及退热药和抗生素的使用上明显降低<sup>[31–32]</sup>。

2'-FL 还能改善慢性免疫介导的炎症性皮肤病疾病, 如银屑病。Lei 等<sup>[33]</sup>以咪喹莫特(IMQ)诱导的银屑病小鼠为模型进行实验, 发现给予 2'-FL 的小鼠, 其皮肤的红斑和厚度显著减少, 皮肤损伤和炎症减轻。进一步机理研究表明, 2'-FL 可通过调节 STAT3 信号通路抑制 Th17 细胞免疫应答和 Th17 相关细胞因子分泌, 从而改善银屑病。

### 1.3.2 抗过敏

2'-FL 在抗过敏方面也具备一定的应用潜力。Castillo-Courtade 等<sup>[34]</sup>考察了 2'-FL 对卵清蛋白致敏小鼠的症状学和免疫反应的影响。结果表明, 2'-FL 可通过诱导 IL-10<sup>+</sup>调节性 T 细胞和间接稳定肥大细胞, 减轻小鼠腹泻和体温过低等食物过敏症状。张琦敏<sup>[35]</sup>也发现 2'-FL 能够通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路、调节 miR-146a 表达水平、降低巨噬细胞激活水平和细胞因子表达, 从而发挥抗过敏作用, 有效缓解  $\beta$ -乳球蛋白过敏引发的炎症反应。

2'-FL 还可以减轻因环境污染导致的过敏反应。2'-FL 能降低 PM-10 诱导的 HaCaT 角质形成细胞中 IL-6、IL-8、IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的过表达, 抑制 PM-10 刺激的 HIF-1 $\alpha$  蛋白的积累和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 的磷酸化, 改善 PM-10 诱导的角化层的表皮厚度和完整性。同时, 2'-FL 还可以通过调节 HIF-1 $\alpha$ /PI3K/Akt 通路, 抑制 PM-10 诱导的促炎介质, 保护皮肤表皮免受 PM-10 刺激<sup>[36]</sup>。因此, 2'-FL 还可以作为化妆品和药品成分, 用于减轻城市空气污染引起的皮肤刺激和炎症反应。

### 1.3.3 抗病毒

研究表明, 母乳喂养的婴儿感染轮状病毒(RV)、诺如病毒(NV)和艾滋病毒(HIV)的风险相对较低, 这可能跟 HMOs 的抗病毒作用有关<sup>[37]</sup>。HMOs 的结构与存在于细胞表面的病毒受体多糖结构相似, 可以代替细胞与病毒结合, 阻断病毒对靶细胞的粘附, 进而预防感染<sup>[37]</sup>。研究表明, 2'-FL 不但可以替代人组织血型抗原(HBGAs)与诺如病毒结合, 从而阻止诺如病毒与宿主细胞的结合, 而且还能阻止 hNoV-GII.4 病毒样颗粒与 A 型唾液的结合<sup>[38–39]</sup>。

### 1.4 2'-FL 对肠道菌群的影响

首先, 2'-FL 能够促进有益菌生长。研究表明, 母乳喂养婴儿的肠道菌群以双歧杆菌(*Bifidobacterium*)为主, 许多 *Bifidobacterium* 能够通过岩藻糖基乳糖转运蛋白有效识别 2'-FL, 并以其为碳源进行生长<sup>[40]</sup>。He 等<sup>[41]</sup>通过基因型分析对 151 株双歧杆菌利用 2'-FL 的能力进行评价, 其中 37 株菌具有利用 2'-FL 的能力, 包括 *Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium longum* ssp. *longum*、*Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* 和 *Bifidobacterium dentium*。Hirvonen 等<sup>[42–43]</sup>使用 Bioscreen C 生长曲线分析仪监测细菌生长, 测

定了 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 和 *Bacteroides* 属细菌的发酵能力,发现几乎所有研究的细菌都能利用低聚半乳糖、乳糖和葡萄糖,但 *B. longum* ssp. *infantis*、*B. bifidum*、*Bacteroides fragilis*、*Bacteroides vulgatus*、*Bacteroides thetaiotaomicron* 等细菌只能以 HMOs 作为唯一碳源。另有研究表明,母乳喂养婴儿肠道中的优势菌株 *B. longum* ssp. *infantis* 能够利用 2'-FL 维持其生长,并产生乳酸、乙酸、1,2-丙二醇等代谢产物<sup>[42,44-46]</sup>。体外模拟实验表明,2'-FL 能够沿结肠进行全长发酵,随着 2'-FL 不断被发酵,*Bifidobacteriaceae* 的相对丰度也随之增加,同时还伴随着 *Actinobacteria* 数量增加,以及 *Proteobacteria* 和 *Enterobacteriaceae* 数量减少<sup>[47-49]</sup>。2'-FL 作为碳源不但能够促进 *Bifidobacterium* 生长,还能够增加 *Bifidobacterium* 的黏附性能。以 2'-FL 为碳源时,*B. bifidum* DNG6 的黏附性能显著提高,与 Caco-2 细胞粘附相关基因的表达水平明显高于其以低聚半乳糖和葡萄糖为碳源时的表达水平<sup>[50]</sup>。

其次,2'-FL 可以减少有害菌在体内的定殖,从而降低感染的风险。动物实验表明,摄入 2'-FL 能够有效降低 *Escherichia coli* 在小鼠肠道的定殖率<sup>[51-52]</sup>。2'-FL 还可以抑制 *Campylobacter jejuni*、*Salmonella enterica* serovar. *fyris* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 等致病菌对人类肠道细胞系 Caco-2 的粘附(分别减少 26%、12% 和 17%)<sup>[53]</sup>。

进一步,2'-FL 可以通过促进有益菌生长,抑制有害菌生长,建立了一个良性的肠道微生物环境,从而降低了肠道炎症。肠道微生物环境失调和肠上皮细胞中的 toll 样受体 4 (TLR4)信号传导是导致婴儿坏死性小肠结肠炎的两大主要原因,2'-FL 既能通过抑制 TLR4 信号传导,预防小鼠和仔猪的坏死性小肠结

肠炎,也可以通过调节肠道菌群,预防和治疗结肠炎<sup>[54-55]</sup>。动物实验表明,补充 2'-FL 后,小鼠的抵抗力增强,肠道内 *Barnesiella*、*Lactobacillus* 和潜在的益生菌 *Akkermansia* 的丰度显著增加,*Streptococcus* 和 *Escherichia*、*Shigella* 的过度生长被抑制,在小鼠体内形成了对炎症性疾病有抵抗力的肠道环境,这种肠道环境与短链脂肪酸的产生呈正相关,与炎症生物标志物呈负相关,有利于减轻炎症性肠病,从而影响小鼠对葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎的敏感性<sup>[52,56-57]</sup>。口服 2'-FL 也可减轻 IL-10 基因缺失小鼠的慢性炎症,显著降低结肠炎的严重程度,表现为炎症标志物表达量减少、组织学和腹泻评分降低、上皮完整性增加、结肠无明显缩短<sup>[58]</sup>。Ryan 等<sup>[59]</sup>发现患有肠易激综合征和溃疡性结肠炎的成人服用含有 2'-FL 的营养配方奶粉 6 周后,其胃肠道生活质量指数 (GIQLI)总评分、胃肠道症状分级评分、粪便中 *Bifidobacterium* 和 *Faecalibacterium prausnitzii* 数量,以及粪便中短链脂肪酸含量均有所增加,而且临床症状有明显改善。

最后,肠道微生物失调是导致肥胖的重要原因之一,2'-FL 还能够通过调节肠道菌群及其代谢物组成治疗肥胖。Lee 等<sup>[60]</sup>发现补充 10%的 2'-FL 能够提高肠道中 *Parabacteroides* 菌的丰度,增加乳酸和丙酮酸的含量,显著下调盲肠中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和巨噬细胞趋化蛋白-1 的基因表达,抑制高脂饮食诱导的肝过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$  (脂肪生成的转录因子)的基因表达,改善肠道微生物群-大脑轴,从而降低能量摄入和脂肪质量,减轻体重。

## 2 2'-FL 的生物合成研究进展

2'-FL 的合成方法有化学合成法、酶催化合成法和全细胞生物合成法。其中,化学合成

需以 L-岩藻糖为底物经过 4 步反应合成岩藻糖基供体, 再以乳糖为底物经过两步反应合成乳糖受体, 随后岩藻糖基供体和乳糖受体再经 4 步反应合成 2'-FL, 最后反应产物经色谱分离, 从而获得纯度较高的 2'-FL。该方法不仅步骤多、得率低, 且底物 L-岩藻糖较为昂贵、成本高; 同时反应条件也较为严苛, 合成过程中还需要使用大量有机试剂, 造成环境污染。因此, 化学法合成 2'-FL 目前尚处于千克级规模<sup>[19]</sup>。

酶法合成 2'-FL 主要有两条途径: 第一是以鸟苷二磷酸-L-岩藻糖(GDP-L-岩藻糖, GDP-L-fucose)和乳糖为底物, 通过  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶( $\alpha$ -1,2-FT)合成 2'-FL<sup>[61]</sup>; 第二是利用  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶催化 4-硝基苯基- $\alpha$ -L-岩藻糖苷和乳糖进行转糖基反应, 从而生成 2'-FL<sup>[62-63]</sup>。相较于化学合成法, 酶催化合成法具有反应条件温和、可控, 反应体系中成分相对简单, 易于纯化等优点。但同时酶法也存在一些缺点: (1) 以 GDP-L-岩藻糖为底物合成 2'-FL, 底物成本高; (2) 以 4-硝基苯基- $\alpha$ -L-岩藻糖苷为底物合成 2'-FL, 反应产物中会存在对硝基苯酚的污染, 不利于其在食品领域中的应用; (3) 酶催化合成 2'-FL 的得率不高, 目前尚处于实验室规模。

全细胞生物合成法是通过挖掘特定的功能基因, 组装合成途径, 构建微生物细胞工厂来合成 2'-FL。跟化学法和酶法相比, 微生物细胞具有增殖快、易于扩大培养的优点, 且能以葡萄糖、甘油和蔗糖等廉价原料作为底物, 其成本相对低廉, 规模化生产难度较低, 现已成为当前工业生产的主要方法。然而, 全细胞合成法也面临着来自成本、生产效率和安全性等诸多挑战。例如, 如何降低底物 L-岩藻糖的生产

成本, 提高 GDP-L-岩藻糖的合成量, 以及如何提高  $\alpha$ -1,2-FT 的活性等问题, 是降低 2'-FL 生产成本、提高生产效率的关键。同时, 由于现有的  $\alpha$ -1,2-FT 大多来源于致病菌 *Helicobacter pylori*, 因此寻找安全、高效的  $\alpha$ -1,2-FT 来源也引起了国内外学者的广泛关注<sup>[64]</sup>。此外, 目前 2'-FL 工业化的生产菌株为大肠杆菌(*E. coli*), 存在内毒素的污染风险, 因此选择更为安全的表达宿主也是目前 2'-FL 研究的热点<sup>[4]</sup>。

### 2.1 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

*E. coli* 是最为简单的模式生物之一, 也是在 2'-FL 合成研究中最常用的表达宿主。利用 *E. coli* 合成 2'-FL 有 2 种途径。一是天然存在于 *E. coli* 中的从头合成途径(*de novo pathway*), 该途径来源于可拉酸合成途径, 利用廉价碳源和细胞代谢的能量合成岩藻糖供体 GDP-L-岩藻糖, 进而合成 2'-FL<sup>[65]</sup>。具体合成途径如图 2 所示, 果糖-6-磷酸通过 ManA (甘露糖-6-磷酸异构酶)、ManB (磷酸甘露糖变位酶)、ManC ( $\alpha$ -D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶)、Gmd (GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶)、WcaG (GDP-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖-3,5-差向异构酶-4-还原酶) 被转化为 GDP-L-岩藻糖, GDP-L-岩藻糖和乳糖(lactose)在外源  $\alpha$ -1,2-FT 的作用下最终合成 2'-FL<sup>[66]</sup>。另一条途径是来源于真核细胞的补救合成途径(*salvage pathway*), 如图 3 所示, 该途径需要以 L-岩藻糖(L-fucose)作为底物, 利用来源于 *B. fragilis* 的双功能酶 Fkp (L-岩藻糖激酶/GDP-L-岩藻糖焦磷酸化酶) 来产生 GDP-L-岩藻糖。即 L-岩藻糖首先通过 L-岩藻糖激酶磷酸化为岩藻糖-1-磷酸, 再通过 GDP-L-岩藻糖焦磷酸化酶转化为 GDP-L-岩藻糖。最后, GDP-L-岩藻糖和乳糖在  $\alpha$ -1,2-FT 酶的催化下合成 2'-FL<sup>[67]</sup>。

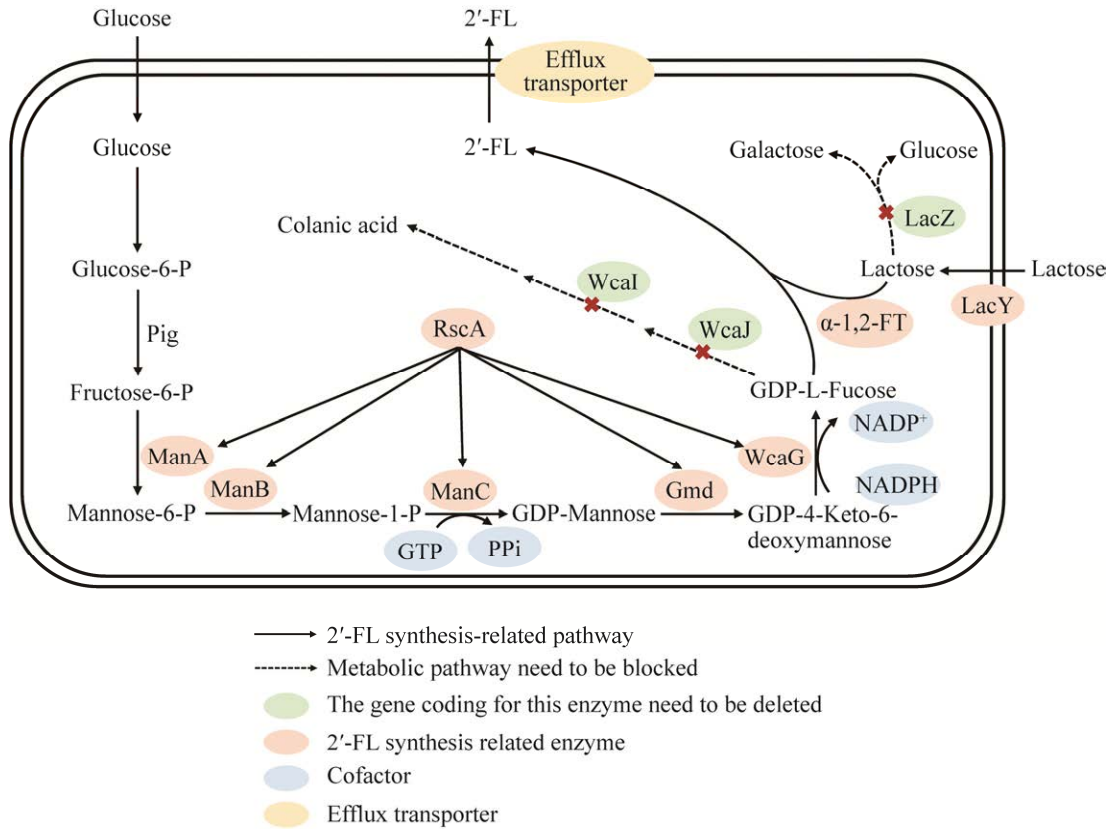


图 2 2'-FL 的从头合成途径<sup>[66,68-69]</sup>  
 Figure 2 *De novo* pathway of 2'-FL<sup>[66,68-69]</sup>.

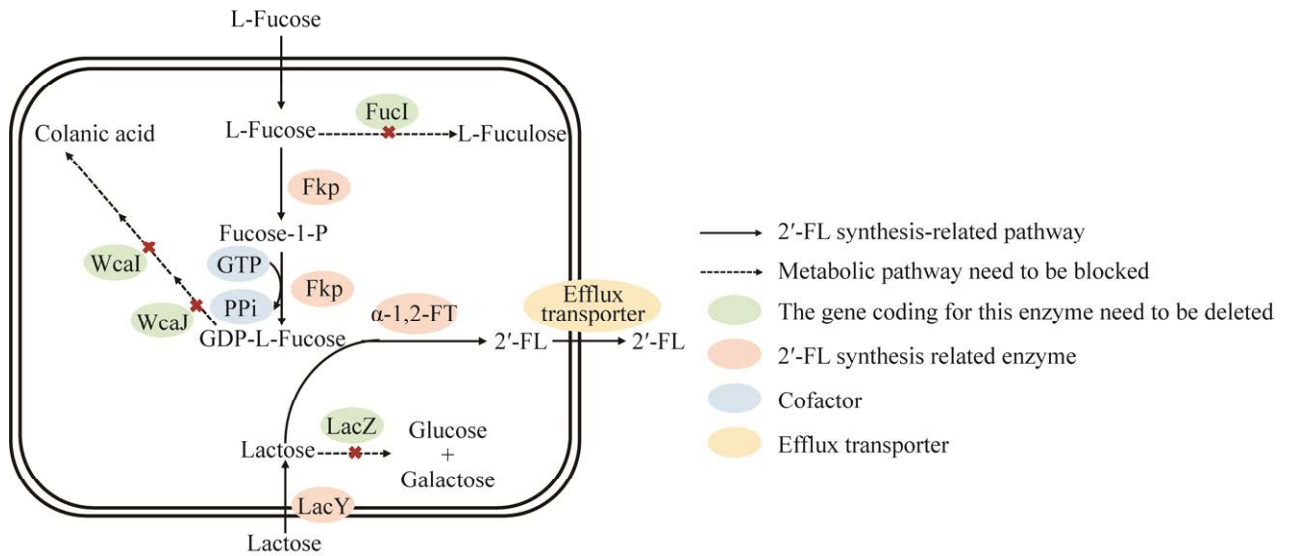


图 3 2'-FL 的补救合成途径<sup>[67]</sup>  
 Figure 3 *Salvage* pathway of 2'-FL<sup>[67]</sup>.

表 1 总结了近 5 年利用 *E. coli* 作为宿主菌合成 2'-FL 的研究进展。提高 2'-FL 产量的策略包括: (1) 提高 GDP-L-岩藻糖在胞内的积累, (2) 构建辅因子再生途径, (3) 促进乳糖的摄取和积累, (4)  $\alpha$ -1,2-FT 的高效表达, (5) 提高 2'-FL 的外排效率。

### 2.1.1 GDP-L-岩藻糖在胞内的积累

GDP-L-岩藻糖是一种相对昂贵的前体, 直接补充 GDP-L-岩藻糖成本高。Stevenson 等<sup>[65]</sup>发现, 在 *E. coli* 的可拉酸合成途径中, GDP-L-岩藻糖可从葡萄糖合成, 但是产量不高。提高细胞内 GDP-L-岩藻糖产量的策略主要有 2 个: 一是过表达 GDP-L-岩藻糖合成的相关基因, 如 *manB*、*manC*、*gmd*、*wcaG*, 以及可拉酸合成途径中的转录正调控因子基因 *rcaA* 或 *rcaB*<sup>[66]</sup>。另一个是敲除 GDP-L-岩藻糖的代谢相关基因, 如参与可拉酸合成的基因 *wcaJ*、*wcaI*, 抑制 GDP-L-岩藻糖进一步合成可拉酸<sup>[71]</sup>。此外, 敲除 ATP 依赖型胞内蛋白酶基因 *lon* 也能够促进 GDP-L-岩藻糖的积累, 这是由于 *rcaA* 基因的过表达能够上调 GDP-L-岩藻糖合成基因的表达, 而 RcsA 会被 Lon 快速降解<sup>[69]</sup>。

在补救途径中, L-岩藻糖除了合成 GDP-L-岩藻糖, 还可以作为 *E. coli* 菌体生长的碳源<sup>[74]</sup>。因此, 要想在补救途径中提高胞内 GDP-L-岩藻糖的产量, 不但需要过表达 GDP-L-岩藻糖合成基因 *fkp*, 还需要敲除 *fucI* (岩藻糖异构酶基因)、*fucK* (岩藻糖激酶基因) 等参与 L-岩藻糖代谢的基因<sup>[73]</sup>。此外, L-岩藻糖的异构化也可以由 RHA (L-鼠李糖异构酶)、AraA (D-阿拉伯糖异构酶) 催化, 因此敲除 *araA*、*rhaA* 也是提高 GDP-L-岩藻糖产量的有效策略。Jung 等<sup>[67]</sup>利用 *araA*、*rhaA* 双缺失的重组菌产出 47.0 g/L 2'-FL。相较于 *de novo* pathway, 通过 *Salvage* pathway 合成 2'-FL 涉及的基因较少, 菌株构建

相对简单, 但由于原料 L-岩藻糖来源有限, 价格昂贵, 生产成本低, 阻碍了其大规模的生产应用。

### 2.1.2 辅因子的再生

鸟苷-5'-三磷酸(GTP)作为生物合成 GDP-L-岩藻糖的关键辅因子, 它既是 GDP 的供体, 也是能源物质。因此过表达 *gsk* (编码鸟苷-肌苷激酶)、*gpt* (编码鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)、*gmk* (编码鸟苷酸激酶)、*ndk* (编码核苷二磷酸激酶) 等参与 GTP 合成的基因也能提高 GDP-L-岩藻糖的产量。研究表明, 过表达 *gsk* 的 *E. coli* 和仅过表达 GDP-L-岩藻糖生物合成酶的 *E. coli* 相比, GDP-L-岩藻糖产量提高了 58%<sup>[75]</sup>。此外, 过表达 *fkp*、*gpt*、*gmk* 和 *ndk* 的菌株摇瓶发酵获得的最大 GDP-L-岩藻糖量, 是仅过表达 *fkp* 菌株的 4.2 倍<sup>[76]</sup>。

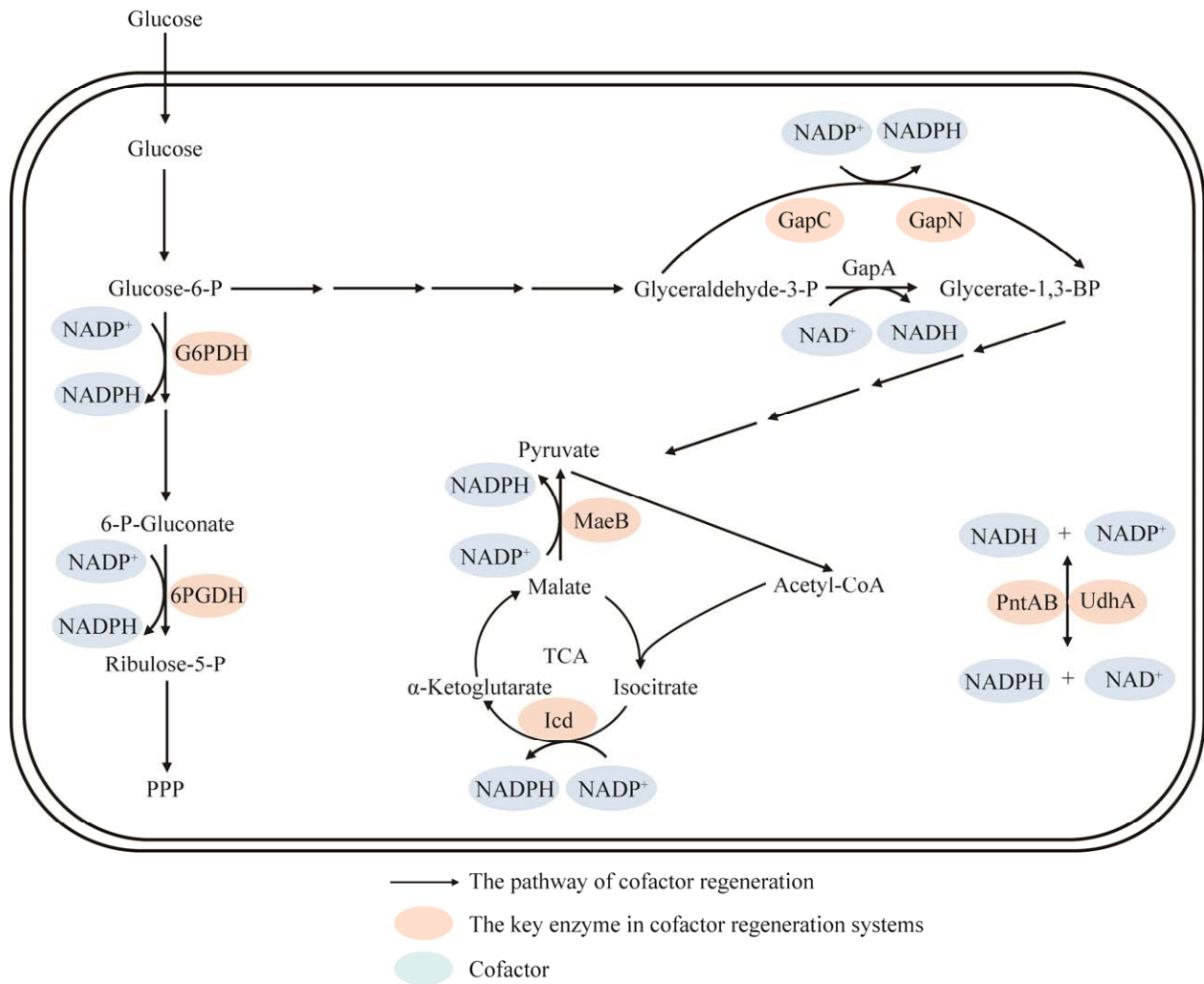
2'-FL 合成的另一关键辅因子是 NADPH, 其主要来源于磷酸戊糖途径(PPP 途径)、三羧酸循环途径(TCA 循环)以及脱氢酶系统。如图 4 所示, 一方面过表达参与 PPP 途径和 TCA 循环的相关酶基因, 如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH, *zwf* 基因编码)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGDH, *gnd* 基因编码)、异柠檬酸脱氢酶(ICD, *icd* 基因编码)、苹果酸酶(MaeB, *maeB* 基因编码)等, 可以促进 NADPH 的生成; 另一方面过表达嘧啶核苷酸转氢酶(PntAB, *pntAB* 基因编码)、吡啶核苷酸转氢酶(UdhA, *udhA* 基因编码)也可以促进 NADPH 的再生; 此外, 还可以引入甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GapN, *gapN* 基因编码)等酶的编码基因, 构建细胞内氧化还原再生途径, 从而提高 2'-FL 的产量<sup>[69,77-83]</sup>。万李<sup>[82]</sup>通过在 *E. coli* 中过表达 *zwf* 和 *gsk* 这 2 个基因, 促进胞内辅因子 NADPH 和 GTP 的循环再生, 从而将 GDP-L-岩藻糖的产量提高了 8.1 倍。



表 1 全细胞生物合成 2'-FL 的技术

Table 1 Technology of whole-cell biosynthesis of 2'-FL

The time of publication	Strain	Carbon source	Synthesis pathway	Gene overexpression	Gene knockout	The production of 2'-FL	Characteristic	Reference
2017	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Glucose	<i>De novo</i> pathway	<i>fucC, lacY, rscA, zwf, icd, gnd, wcaJ, lon, manB, pntAB, udhA, gapC, gapN</i> , etc.	<i>wcaJ</i> , etc.	9.120 g/L	1. Multiple modular optimization strategies were applied in a plug-and-play manner; 2. The intracellular redox regeneration pathways were engineered	[69]
2017	<i>E. coli</i> BL21star(DE3)	Glycerol	<i>De novo</i> pathway	<i>wcfB, manB, manC, gmd, wcaG</i> , etc.	<i>lacZ</i>	15.400 g/L 2'-FL	The feasibility of industrial production of 2'-FL using this microbial system was demonstrated by performing fed-batch fermentation in a 75 L bioreactor	[68]
2019	<i>E. coli</i> ΔL M15	Glycerol	<i>De novo</i> pathway	<i>Te2FT, gmd, wcaG, manB, manC</i> , etc.	<i>lacZ</i>	0.486 g/L 2'-FL	10 α1,2-FT genes from bacteria of biosafety level one were identified	[64]
2019	<i>E. coli</i> BL21star(DE3)	Glycerol, L-fucose	<i>Salvage</i> pathway	<i>fkp, fucT2</i> , etc.	<i>araA, rhaA, fucI, fucK, lacZ</i> , etc.	47,000 g/L 2'-FL	1. Double-deletion of the <i>araA</i> and <i>rhaA</i> genes; 2. 2'-FL was synthesized through the <i>salvage</i> pathway	[67]
2020	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Sucrose	<i>De novo</i> pathway	<i>wbgL</i> ; the <i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970 <i>TP Y.b.</i> (encoding a sugar efflux transporter of the major facilitator superfamily); <i>manC, manB, gmd, wcaG</i> , and genes of sucrose metabolism and lactose synthesis: <i>cscB, cscA, cscK, pgi, pgm, galE, galT</i> , etc.	<i>lacZ, wcaJ, wcaI</i> , etc.	60,000 g/L 2'-FL	An <i>E. coli</i> BL21 strain was engineered for the <i>de novo</i> production of GDP-L-fucose as well as lactose, enabling the total synthesis of 2'-FL from one simple carbon source	[70]
2020	<i>E. coli</i> S17-3	Glycerol	<i>De novo</i> pathway	<i>fucC, wcfB</i> , etc.	<i>lacZ, wcaJ, wcaI</i> , etc.	0.617 g/L 2'-FL	This paper reported a novel bioconversion route of 2'-FL by engineering a low pH triggered colanic acid synthetic pathway, found in <i>E. coli</i> S17-3, which supplied GDP-L-fucose for <i>in vivo</i> 2'-FL formation catalyzed by the heterologous α1,2-FT	[71]
2020	<i>E. coli</i> C41 (DE3)ΔZ	Glycerol	<i>De novo</i> pathway	<i>fucC, manB, manC, gmd, wcaG, rcsA, rcsB</i> , etc.	<i>lacZ, wcaJ, nudD, nudK</i> , etc.	66.800 g/L 2'-FL	1. The co-introduction of two heterologous positive regulators, RcsA and RcsB, was confirmed to be more conducive to GDP-L-fucose formation and thus 2'-FL production; 2. The feasibility of mass production was demonstrated in a 50 L fed-batch fermentation system	[66]
2021	<i>E. coli</i> C41 (DE3)ΔZ	Glucose, glycerol	<i>De novo</i> pathway	<i>manB, manC, gmd, wcaG, fucC</i> , etc.	<i>lacZ, wcaJ, araA, iclR</i> , etc.	7.140 g/L 2'-FL	In this study, a glucose-glycerol mixed carbon source and the deletion of the genes <i>araA</i> and <i>iclR</i> were attempted for the first time in engineered <i>E. coli</i> to improve 2'-FL production	[72]
2021	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Glycerol	<i>De novo</i> pathway and <i>salvage</i> pathway	<i>manB, manC, gmd, fkp, wcaG, fucI</i> , etc.	<i>lacZ, fucI, fucK, wcaI</i> , etc.	14.100 g/L 2'-FL	The <i>de novo</i> and <i>salvage</i> pathways for GDP-L-fucose synthesis were engineered and optimized in <i>E. coli</i> BL21(DE3) to improve the production of 2'-FL	[73]



**图 4 NADPH 的来源<sup>[69]</sup>**  
 Figure 4 Source pathway of NADPH<sup>[69]</sup>.

此外，厌氧氧化还原调控应答调节蛋白 (ArcA) 是 *E. coli* 中一种重要的全局调节因子。*arcA* 基因的敲除有利于 TCA 循环，从而提高 2'-FL 的合成能力。研究表明，*arcA* 缺失的工程菌与对照菌株相比，2'-FL 产量增加了 38.8%<sup>[72]</sup>。

### 2.1.3 乳糖的摄取和积累

乳糖是合成 2'-FL 的受体底物，充足的乳糖供给是大量合成 2'-FL 的基础。乳糖通过 LacY (β-半乳糖苷透性酶) 进入细胞内后会立即被 LacZ (β-半乳糖苷酶) 水解成葡萄糖和半乳糖。因此，提高细胞内乳糖浓度的策略主

要有：一、过表达 *lacY* 以提高乳糖的摄入；二、部分破坏或敲除 *lacZ*，以阻止乳糖的进一步水解<sup>[69]</sup>。

### 2.1.4 α-1,2-FT 的高效表达

α-1,2-FT 能够以 GDP-L-岩藻糖和乳糖为底物合成 2'-FL，是 2'-FL 合成的关键限制因素之一。表 2 总结了不同来源的 α-1,2-FT，其中 WbsJ、WbwK、WbiQ、WbgL 等来源于 *E. coli*，但这些酶的基因表达水平通常比较低。目前使用最多的 α-1,2-FT 是来源于 *H. pylori* 的 FutC 和 FucT2，但是 FutC 和 FucT2 会导致

表 2 部分  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶Table 2 Some members of  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase

A-1,2-FT	Strains	References
FutC	<i>H. pylori</i>	[69]
FucT2	<i>H. pylori</i>	[67]
WbsJ	<i>E. coli</i> O128	[84]
WbwK	<i>E. coli</i> O86:B7	[85]
WbiQ	<i>E. coli</i> O127:K63(B8)	[86]
WbgL	<i>E. coli</i> O126	[87]
WcfB	<i>B. fragilis</i>	[68]
Te2FT	<i>T. elongatus</i>	[64]

副产物的产生，后处理相对复杂，而且 *H. pylori* 是病原微生物，这可能会成为 2'-FL 在各国准入审批的障碍。此外，Chin 等<sup>[68]</sup>发现 *B. fragilis* 中的 WcfB 表达水平高且无副产物生成，但由于该酶同样也是来源于病原微生物，因而被认为不安全。Seydametova 等<sup>[64]</sup>从生物安全一级细菌中鉴定了 10 个  $\alpha$ -1,2-FT 基因，筛选出了来自 *Thermosynechococcus elongatus* 的 Te2FT，并在 *E. coli*  $\Delta$ L M15 中表达 Te2FT，摇瓶发酵 72 h 可获得 0.49 g/L 2'-FL，这与先前报道的 *H. pylori* 和 *B. fragilis* 的  $\alpha$ -1,2-FTs 值相当<sup>[64]</sup>。

### 2.1.5 2'-FL 的外排

由于 *E. coli* 胞内成分复杂，破壁会大大增加后续分离提取的难度，因此引入 2'-FL 的外排系统，将 2'-FL 从胞内排至胞外，可以减少后续分离步骤，降低生产成本<sup>[88]</sup>。Parschat 等<sup>[70]</sup>构建了一株以蔗糖为唯一碳源、且从头合成 2'-FL 的工程菌，并在该菌株中引入了来自 *Y. bercovieri* ATCC 43970 的 *TP Y.b.* 基因，*TP Y.b.* 能够编码主要协同转运蛋白超家族 (major facilitator superfamily, MFS) 的糖外排转运体，从而有效促进 2'-FL 的外排，发酵 84 h 后，可获得超过 60 g/L 的 2'-FL。此外，选择合适的  $\alpha$ -1,2-FT 也有助于提高胞外 2'-FL 的含量。例如，利用 FutC 合成 2'-FL 时，49% 的 2'-FL 在

胞内；而利用 Te2FT 合成的 2'-FL，只有 12.3% 的 2'-FL 存在于胞内<sup>[64]</sup>。

## 2.2 其他微生物

目前，2'-FL 的生物合成主要在 *E. coli* 中进行，然而由于 *E. coli* 细胞含内毒素，其作为食品和化妆品原料的生产菌株存在一定的风险。酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 是一种 GRAS (公认安全的) 微生物，且细胞中含有丰富的 GDP-D-甘露糖，这为酵母中大量生产 2'-FL 提供了可能<sup>[89]</sup>。然而，在 *S. cerevisiae* 中实现 2'-FL 生产，需要大量供应关键前体：乳糖和 GDP-L-岩藻糖，而天然 *S. cerevisiae* 既不能代谢也不能输入乳糖。为了使前体乳糖能从培养基中输入到细胞质中，需要将来自 *Kluyveromyces lactis* 的乳糖透性酶 (Lac12) 或来自 *Neurospora crassa* 的纤维糊精转运体引入 *S. cerevisiae* 中，从而将外部乳糖吸收到细胞内<sup>[90-91]</sup>。另一前体 GDP-L-岩藻糖，则可以 GDP-D-甘露糖为底物从头合成，或以 L-岩藻糖为底物在细胞内构建 *salvage pathway* 来实现。

Liu 等<sup>[90]</sup>在 *S. cerevisiae* 中引入了乳糖透性酶 (Lac12)、GDP-L-岩藻糖的 *de novo pathway* 相关基因 *gmd*、*wcaG*、*fucT2*，该菌分批发酵能够产生 0.51 g/L 的 2'-FL，这是 *S. cerevisiae* 通过 *de novo pathway* 生产 2'-FL 的首次报告。Yu 等<sup>[92]</sup>在 *S. cerevisiae* 中引入编码乳糖透性酶的 *lac12*，以及 *fkp*、*fucT2* 等 GDP-L-岩藻糖的 *salvage pathway* 相关基因，以乙醇为碳源，分批补料发酵 120 h 后可获得 0.503 g/L 的 2'-FL。Lee 等<sup>[91]</sup>以木糖代替葡萄糖，解除葡萄糖代谢过度产生的副产物对 2'-FL 合成的抑制，并在细胞内构建了 Lac12、Gmd、WcaG 和 WbgL 等酶组成的合成途径，将 2'-FL 产量提高到 25.5 g/L，同时通过调整培养基组分改变酵母产生 2'-FL 的主要位置，使 72% 的 2'-FL 能够被分泌到胞

外。Hollands 等<sup>[93]</sup>引入来源于 *N. crassa* 的纤维糊精转运体 CDT2 的编码基因也能够有效改善酵母菌中 2'-FL 的外排。

*Bacillus subtilis* 也是一种典型的 GRAS 菌株, 被广泛应用于食品级产品的生物合成。Deng 等<sup>[94]</sup>通过在 *B. subtilis* 引入 *fkp*、*futC* 等基因构建了 2'-FL 的 GDP-L-岩藻糖的 *salvage pathway*, 引入外源乳糖透性酶基因(*lacY*、*lacI2*)促进乳糖吸收, 敲除内源性  $\beta$ -半乳糖苷酶基因(*yesZ*)来阻断乳糖降解, 过表达转运蛋白基因 *glcP* 改善了 L-岩藻糖的输入, 同时调整辅因子 GTP 再生模块基因的表达, 使 *B. subtilis* 合成 2'-FL 的产量达到 5.01g/L。

### 3 2'-FL 的检测方法

2'-FL 的含量可通过高效液相色谱法(HPLC)进行定量检测。Christensen 等<sup>[95]</sup>建立的 HPLC 方法: 样品制备简单, 测定时间为 19 min, 在 0.2–12.0 mg/mL 范围内线性良好( $R^2 > 0.9995$ ), 且该方法用于婴儿配方奶粉中 2'-FL 的定量检测, 具有高准确度和高重现性。然而, HPLC 检测的方法不能实现高通量检测。Seydametova 等<sup>[96]</sup>开发了一种以微孔板形式定量 2'-FL 的简单方法, 即通过  $\alpha$ -(1-2,3,4,6)-L-岩藻糖苷酶从 2'-FL 释放 L-岩藻糖, 测定 L-岩藻糖脱氢酶氧化 L-岩藻糖时形成的 NADPH, 从而快速测定 2'-FL, 该方法可使用 96 孔微孔板在 50 min 内快速、高通量地检测 2'-FL (检测的 2'-FL 浓度高达 5 g/L)。Seydametova 等<sup>[97]</sup>还鉴定、克隆并在 *E. coli* 中过表达了来自 *Xanthomonas manihotis* 的  $\alpha$ -1,2-岩藻糖苷酶和来自 *Pseudomonas* sp. no. 1143 的 L-岩藻糖脱氢酶, 2'-FL 在  $\alpha$ -1,2-岩藻糖苷酶的作用下分解为 L-岩藻糖和乳糖, L-岩藻糖在 L-岩藻糖脱氢酶的作用下进一步氧化, 并形成 NADPH, 通过测定 NADPH 进而确定 2'-FL

含量, 该方法不仅可以用于婴儿配方奶粉中 2'-FL 的定量检测, 还可以用于 2'-FL 高产菌株的快速筛选。Shin 等<sup>[98]</sup>开发了一个全细胞荧光生物传感器, 在 *E. coli*  $\Delta$ L YA 中组成型共表达  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶和红色荧光蛋白(RFP), *E. coli*  $\Delta$ L YA 在含有 2'-FL 的培养基中表现出荧光强度增强, 且细胞的荧光强度与 2'-FL 在 1–5 g/L 浓度内成线性比例。

### 4 2'-FL 的安全性

研究表明, 在日粮中添加 2 g/L 的 2'-FL 对新生仔猪无不良影响<sup>[99]</sup>。临床数据表明, 添加到婴儿配方奶粉中的 2'-FL 是安全的、耐受性好的, 且喂食含 2'-FL 配方奶粉有益于婴儿的免疫和肠道健康<sup>[19,32,100–102]</sup>。Phipps 等<sup>[103–105]</sup>对 2'-FL 和二岩藻糖基乳糖(DFL)混合物、2'-FL 和乳糖-N-岩藻五糖 I (LNFP-I)混合物作为食品的安全性进行了评估, 包括细菌回复突变试验、体外哺乳动物细胞微核试验和新生大鼠 90 d 经口灌胃试验等, 在为期 90 d 的研究中, 未观察到不良反应和遗传毒性, 证明 2'-FL/DFL 混合物、2'-FL/LNFP-I 混合物在婴儿配方奶粉以及食品添加剂中的应用是安全的。Parschat 等<sup>[106]</sup>也证实了含有 2'-FL、3-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖、3'-唾液酸乳糖、6'-唾液酸乳糖等 5 种 HMO 的混合物在婴儿产品和一般食品中应用的安全性。

2016 年, 美国食品和药物监督管理局(FDA)批准 2'-FL 为“公认安全”(GRAS), 可作为食品添加剂应用于婴幼儿配方奶粉、乳制品和饮料等产品中<sup>[107]</sup>。2019 年, 澳大利亚新西兰食品标准局(FSANZ)允许在婴儿配方食品中单独添加 2'-FL 或与乳糖-N-新四糖复合添加<sup>[108]</sup>。同年, 欧洲食品安全局(EFSA)批准 2'-FL/DFL 作为新型食品(NF)进入市场<sup>[105,109–110]</sup>。2'-FL 不仅可

作为婴儿配方奶粉中添加的活性成分，还可作为膳食补充剂和医用食品原料应用于食品加工领域<sup>[109]</sup>。

## 5 展望

HMOs 能够促进婴儿生长、发育和健康，因而被广泛应用于婴儿配方奶粉。HMOs 在婴儿配方奶粉中的应用占全球 HMOs 市场的一半以上。2'-FL 是分泌型母乳中含量最高的 HMO，在抑制病原菌感染、调节肠道菌群和增强免疫力等方面发挥着重要作用<sup>[13,111]</sup>。目前，在欧美一些国家 2'-FL 可以作为食品成分应用于婴儿配方奶粉、膳食补充剂和医疗食品中。在婴儿配方奶粉中添加 2'-FL 是一种很有前途的营养创新，这对于开发接近母乳的婴儿配方奶粉具有重要意义<sup>[112]</sup>。近年来，作为长期占据 HMOs 市场的寡头企业，杜邦公司、巴斯夫集团、荷兰皇家帝斯曼集团，以及丹麦科汉森等知名企业纷纷进军 2'-FL 产业，进行规模化生产。而我国对 2'-FL 的合成还处于研发阶段，目前还没有企业能够实现 2'-FL 规模化生产，未来仍需加速推进对 2'-FL 合成方法的研究。

全细胞生物合成法是目前公认的最具工业化潜力的 2'-FL 生产方法，但该法仍有诸多问题亟待解决。首先，由于利用 *salvage pathway* 合成 2'-FL 时需要以 L-岩藻糖为底物，而如今 L-岩藻糖的生产仍以天然产物提取为主，原料单一、提取成本高，限制了 2'-FL 的产业化发展<sup>[113]</sup>。因此，开发 L-岩藻糖低成本的生产方法，或开发以葡萄糖或其他廉价底物为碳源的 2'-FL 合成途径是今后研究的重要方向。其次， $\alpha$ -1,2-FT 的高效表达、辅因子的再生、乳糖的摄取和积累以及 2'-FL 的外排效率都极大影响 2'-FL 的产量和生产效率。因此，筛选安全来源、

且活性高的  $\alpha$ -1,2-FT，通过蛋白质工程提高  $\alpha$ -1,2-FT 催化效率、构建辅因子再生途径、使用特定的抗反馈基因缓解中间代谢物的反馈抑制，以及引入 2'-FL 外排转运体等策略，对于 2'-FL 的高效合成至关重要<sup>[109]</sup>。第三，除了 *E. coli*，食品级宿主菌 *S. cerevisiae*、*B. subtilis* 等也被改造用于合成 2'-FL，但这些食品级菌株产量较低，且缺乏利用乳糖底物的乳糖透性酶。因此，引入乳糖透性酶也是增加 2'-FL 产量的有效策略。第四，当发酵规模扩大时，发酵罐内的环境变量，以及工程菌的遗传稳定性也是值得关注的问题。最后，目前中国尚未批准 2'-FL 作为食品添加剂加入婴幼儿配方奶粉中，也缺乏相关标准。因此，在推动 2'-FL 合成技术发展的同时，亦需要积极推动国内 2'-FL 作为新食品原料的申报与审批工作，制定相关的行业标准。

## 参考文献

- [1] 魏远安, 张丽君, 郑惠玲, 陈晓林. 中国母乳低聚糖的研究进展和现状. *乳业科学与技术*, 2016, 39(3): 33–38.  
Wei YA, Zhang LJ, Zheng HL, Chen XL. Recent progress and current status of studies on human milk oligosaccharides (HMOs) and their application in China. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2016, 39(3): 33–38. (in Chinese)
- [2] Schack-Nielsen L, Michaelsen KF. Advances in our understanding of the biology of human milk and its effects on the offspring. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(2): 503S–510S.
- [3] 房新平. 母乳中生物活性物质概述. *中国奶牛*, 2014(18): 39–42.  
Fang XP. A review on the bioactive materials in human milk. *China Dairy Cattle*, 2014(18): 39–42. (in Chinese)
- [4] 史然, 江正强. 2'-岩藻糖基乳糖的酶法合成研究进展和展望. *合成生物学*, 2020, 1(4): 481–494.  
Shi R, Jiang ZQ. Enzymatic synthesis of 2'-fucosyllactose: advances and perspectives. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(4): 481–494. (in Chinese)

- [5] 揭良, 苏米亚, 贾宏信, 陈文亮, 齐晓彦. 母乳寡糖的研究进展. *食品工业*, 2020, 41(10): 258–261.  
Jie L, Su MY, Jia HX, Chen WL, Qi XY. Recent progress in research of human milk oligosaccharides. *The Food Industry*, 2020, 41(10): 258–261. (in Chinese)
- [6] Newburg DS. Glycobiology of human milk. *Biochemistry (Moscow)*, 2013, 78(7): 771–785.
- [7] Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual Review of Nutrition*, 2005, 25: 37–58.
- [8] Lin AE, Au tran CA, Szyszka A, Escajadillo T, Huang M, Godula K, Prudden AR, Boons GJ, Lewis AL, Doran KS, Nizet V, Bode L. Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B *Streptococcus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(27): 11243–11249.
- [9] 揭良, 苏米亚, 贾宏信, 陈文亮, 齐晓彦. 人乳低聚糖研究进展. *乳业科学与技术*, 2020, 43(5): 31–36.  
Jie L, Su MY, Jia HX, Chen WL, Qi XY. Human milk oligosaccharides: past achievements and current trends. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2020, 43(5): 31–36. (in Chinese)
- [10] Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 2012, 22(9): 1147–1162.
- [11] Kulinich A, Liu L. Human milk oligosaccharides: the role in the fine-tuning of innate immune responses. *Carbohydrate Research*, 2016, 432: 62–70.
- [12] Thurl S, Munzert M, Boehm G, Matthews C, Stahl B. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutrition Reviews*, 2017, 75(11): 920–933.
- [13] Austin S, De Castro CA, Bénet T, Hou YF, Sun HN, Thakkar SK, Vinyes-Pares G, Zhang YM, Wang PY. Temporal change of the content of 10 oligosaccharides in the milk of Chinese urban mothers. *Nutrients*, 2016, 8(6): 346.
- [14] Agoston K, Hederos MJ, Bajza I, Dekany G. Kilogram scale chemical synthesis of 2'-fucosyllactose. *Carbohydrate Research*, 2019, 476: 71–77.
- [15] Pereira CL, McDonald FE. Synthesis of human milk oligosaccharides: 2'- and 3'-fucosyllactose. *HETEROCYCLES*, 2012, 84(1): 637–655.
- [16] Kunz C, Meyer C, Collado MC, Geiger L, García-Mantrana I, Bertua-Ríos B, Martínez-Costa C, Borsch C, Rudloff S. Influence of gestational age, secretor, and lewis blood group status on the oligosaccharide content of human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2017, 64(5): 789–798.
- [17] 李娜, 徐恺, 李丽, 於昊, 徐铮. 2'-岩藻糖基乳糖的生理功效以及制备方法研究进展. *食品与发酵工业*. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028419>.  
Li N, Xu K, Li L, Yu H, Xu Z. Recent researches in physiological function and manufacturing method of 2'-fucosyllactose. *Food and Fermentation Industries*. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028419>. (in Chinese)
- [18] Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Peila C, Giuliani F, Bertino E, Fabris C, Coppa GV. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*, 2011, 128(6): e1520–e1531.
- [19] Vandenplas Y, Berger B, Carnielli VP, Ksiazek J, Lagström H, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, Picaud JC, Possner M, Singhal A, Wabitsch M. Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lacto-N-neotetraose (LNnT) in infant formula. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1161.
- [20] 刘爽, 刘筠, 毛颖异, 蔡小堃, 田芳, 赵艳荣, 王硕. 中国六地区成熟母乳中低聚糖含量研究. *营养学报*, 2020, 42(3): 219–223.  
Liu S, Liu Y, Mao YY, Cai XK, Tian F, Zhao YR, Wang S. Concentrations of oligosaccharides in mature breast milks sampled from six cities of China. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2020, 42(3): 219–223. (in Chinese)
- [21] 潘丽娜, 李泽, 郁欢欢, 毛筱, 韩知妍, 王建武. 配方奶粉中添加 2'-岩藻糖基乳糖对小鼠消化吸收功能影响. *中国乳品工业*, 2019, 47(10): 20–23.  
Pan LN, Li Z, Yu HH, Mao X, Han ZY, Wang JW. Effect of 2'-fucosyllactose added to formula milk powder on digestion and absorption function of mice. *China Dairy Industry*, 2019, 47(10): 20–23. (in Chinese)
- [22] Vandenplas Y, de Halleux V, Arciszewska M, Lach P, Pokhlyko V, Klymenko V, Schoen S, Abrahamse-Berkeveld M, Mulder KA, Rubio RP, On behalf of the voyage study group. A partly fermented infant formula with postbiotics including 3'-GL, specific oligosaccharides, 2'-FL, and milk fat supports adequate growth, is safe

- and well-tolerated in healthy term infants: a double-blind, randomised, controlled, multi-country trial. *Nutrients*, 2020, 12(11): 3560.
- [23] Marriage BJ, Buck RH, Goehring KC, Oliver JS, Williams JA. Infants fed a lower calorie formula with 2'-FL show growth and 2'-FL uptake like breast-fed infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2015, 61(6): 649–658.
- [24] Fleming SA, Mudd AT, Hauser J, Yan J, Metairon S, Steiner P, Donovan SM, Dilger RN. Dietary oligofructose alone or in combination with 2'-fucosyllactose differentially improves recognition memory and hippocampal mRNA expression. *Nutrients*, 2020, 12(7): 2131.
- [25] Vázquez E, Barranco A, Ramírez M, Gruart A, Delgado-García JM, Martínez-Lara E, Blanco S, Martín MJ, Castanys E, Buck R, Prieto P, Rueda R. Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2015, 26(5): 455–465.
- [26] Berger PK, Plows JF, Jones RB, Alderete TL, Yonemitsu C, Poulsen M, Ryoo JH, Peterson BS, Bode L, Goran MI. Human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose links feedings at 1 month to cognitive development at 24 months in infants of normal and overweight mothers. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0228323.
- [27] 刘爽, 王津, 邹妍, 王硕. 2'-岩藻糖基乳糖的功能及其应用现状. *营养学报*, 2020, 42(2): 187–192.  
Liu S, Wang J, Zou Y, Wang S. The health benefits of 2'-fucosyllactose and its application in infant formula products. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2020, 42(2): 187–192. (in Chinese)
- [28] Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Mayneris-Perxachs J, Knipping K, van't Land B, Tims S, Stahl B, Garssen J, Franch À, Castell M, Rodríguez-Lagunas MJ, Pérez-Cano FJ. Immunomodulatory and prebiotic effects of 2'-fucosyllactose in suckling rats. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1773.
- [29] Ayechu-Muruzabal V, Overbeek SA, Kostadinova AI, Stahl B, Garssen J, Van't Land B, Willemsen LEM. Exposure of intestinal epithelial cells to 2'-fucosyllactose and CpG enhances galectin release and instructs dendritic cells to drive Th1 and regulatory-type immune development. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 784.
- [30] Mao X, Wang JW, Hang YX, Zhang YC, Yu HH, Li Z, Pan LN, Dai ZY. A human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, enhances the immunity in mice fed an infant formula milk diet. *International Dairy Journal*, 2019, 98: 38–43.
- [31] Goehring KC, Marriage BJ, Oliver JS, Wilder JA, Barrett EG, Buck RH. Similar to those who are breastfed, infants fed a formula containing 2'-fucosyllactose have lower inflammatory cytokines in a randomized controlled trial. *The Journal of Nutrition*, 2016, 146(12): 2559–2566.
- [32] Puccio G, Alliet P, Cajozzo C, Janssens E, Corsello G, Sprenger N, Wernimont S, Egli D, Gosoni L, Steenhout P. Effects of infant formula with human milk oligosaccharides on growth and morbidity: a randomized multicenter trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2017, 64(4): 624–631.
- [33] Lei K, Wang D, Lin L, Zeng JQ, Li Y, Zhang LY, Lane JA, Zuo DM, Sun LD. 2'-fucosyllactose inhibits imiquimod-induced psoriasis in mice by regulating Th17 cell response via the STAT3 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 2020, 85: 106659.
- [34] Castillo-Courtade L, Han S, Lee S, Mian FM, Buck R, Forsythe P. Attenuation of food allergy symptoms following treatment with human milk oligosaccharides in a mouse model. *Allergy*, 2015, 70(9): 1091–1102.
- [35] 张琦敏. MicroRNA 参与 2'-岩藻糖基乳糖缓解牛乳过敏的分子机制研究. 东北农业大学硕士学位论文, 2020.
- [36] Lee KE, Ryu JJ, Jo YK, Yeo H, Kang S. 2'-fucosyllactose attenuates particulate matter-induced inflammation via inhibition of hypoxia-inducible factor in keratinocytes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 42(10): 1620–1627.
- [37] Etzold S, Bode L. Glycan-dependent viral infection in infants and the role of human milk oligosaccharides. *Current Opinion in Virology*, 2014, 7: 101–107.
- [38] Weichert S, Koromyslova A, Singh BK, Hansman S, Jennewein S, Schrotten H, Hansman GS. Structural basis for *Norovirus* inhibition by human milk oligosaccharides. *Journal of Virology*, 2016, 90(9): 4843–4848.

- [39] Tan MTH, Li Y, Gorji ME, Gong ZY, Li D. Fucoidan but not 2'-fucosyllactose inhibits human *Norovirus* replication in zebrafish larvae. *Viruse*, 2021, 13(3): 461.
- [40] Sakanaka M, Hansen ME, Gotoh A, Katoh T, Yoshida K, Odamaki T, Yachi H, Sugiyama Y, Kurihara S, Hirose J, Urashima T, Xiao JZ, Kitaoka M, Fukiya S, Yokota A, Lo Leggio L, Abou Hachem M, Katayama T. Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis. *Science Advances*, 2019, 5(8): eaaw7696.
- [41] He ZJ, Yang B, Liu XM, Ross RP, Stanton C, Zhao JX, Zhang H, Chen W. Short communication: genotype-phenotype association analysis revealed different utilization ability of 2'-fucosyllactose in *Bifidobacterium* genus. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(2): 1518–1523.
- [42] Hirvonen J, Salli K, Putaala H, Tiihonen K, Maukonen J, Ouwehand A. Selective utilization of human milk oligosaccharides 2'-FL and 3-FL by probiotic bacteria resulting in different metabolite production by these bacteria (P20-012-19). *Current Developments in Nutrition*, 2019, 3(Supplement\_1): 1771.
- [43] Salli K, Hirvonen J, Siitonen J, Ahonen I, Anglenius H, Maukonen J. Selective utilization of the human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose, 3-fucosyllactose, and difucosyllactose by various probiotic and pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(1): 170–182.
- [44] Dedon LR, Özcan E, Rani A, Sela DA. *Bifidobacterium infantis* metabolizes 2'-fucosyllactose-derived and free fucose through a common catabolic pathway resulting in 1,2-propanediol secretion. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 583397.
- [45] Zabel B, Yde CC, Roos P, Marcussen J, Jensen HM, Salli K, Hirvonen J, Ouwehand AC, Morovic W. Novel genes and metabolite trends in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Bi-26 metabolism of human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose. *Scientific Reports*, 2019, 9: 7983.
- [46] Zabel BE, Gerdes S, Evans KC, Nedveck D, Singles SK, Volk B, Budinoff C. Strain-specific strategies of 2'-fucosyllactose, 3-fucosyllactose, and difucosyllactose assimilation by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Bi-26 and ATCC 15697. *Scientific Reports*, 2020, 10: 15919.
- [47] Van den Abbeele P, Duysburgh C, Vazquez E, Chow J, Buck R, Marzorati M. 2'-fucosyllactose alters the composition and activity of gut microbiota from formula-fed infants receiving complementary feeding in a validated intestinal model. *Journal of Functional Foods*, 2019, 61: 103484.
- [48] Van den Abbeele P, Sprenger N, Ghyselinck J, Marsaux B, Marzorati M, Rochat F. A comparison of the *in vitro* effects of 2'-fucosyllactose and lactose on the composition and activity of gut microbiota from infants and toddlers. *Nutrients*, 2021, 13(3): 726.
- [49] Salli K, Anglenius H, Hirvonen J, Hibberd AA, Ahonen I, Saarinen MT, Tiihonen K, Maukonen J, Ouwehand AC. The effect of 2'-fucosyllactose on simulated infant gut microbiome and metabolites; a pilot study in comparison to GOS and lactose. *Scientific Reports*, 2019, 9: 13232.
- [50] Zhang GF, Zhao JJ, Wen R, Zhu XM, Liu LB, Li C. 2'-fucosyllactose promotes *Bifidobacterium bifidum* DNG6 adhesion to Caco-2 cells. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(11): 9825–9834.
- [51] Facinelli B, Marini E, Magi G, Zampini L, Santoro L, Catassi C, Monachesi C, Gabrielli O, Coppa GV. Breast milk oligosaccharides: effects of 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose on the adhesion of *Escherichia coli* and *Salmonella fytis* to Caco-2 cells. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2019, 32(17): 2950–2952.
- [52] Wang Y, Zou Y, Wang J, Ma H, Zhang BW, Wang S. The protective effects of 2'-fucosyllactose against *E. coli* O157 infection are mediated by the regulation of gut microbiota and the inhibition of pathogen adhesion. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1284.
- [53] Weichert S, Jennewein S, Hüfner E, Weiss C, Borkowski J, Putze J, Schrotten H. Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutrition Research*, 2013, 33(10): 831–838.
- [54] Sodhi CP, Wipf P, Yamaguchi Y, Fulton WB, Kovler M, Niño DF, Zhou QJ, Banfield E, Werts AD, Ladd MR, Buck RH, Goehring KC, Prindle T Jr, Wang SX, Jia HP, Lu P, Hackam DJ. Insights image for “the human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose protect against the development of necrotizing



- enterocolitis by inhibiting toll-like receptor 4 signaling.”. *Pediatric Research*, 2021, 89(1): 248.
- [55] Sodhi CP, Wipf P, Yamaguchi Y, Fulton WB, Kovler M, Niño DF, Zhou QJ, Banfield E, Werts AD, Ladd MR, Buck RH, Goehring KC, Prindle T Jr, Wang SX, Jia HP, Lu P, Hackam DJ. The human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose protect against the development of necrotizing enterocolitis by inhibiting toll-like receptor 4 signaling. *Pediatric Research*, 2021, 89(1): 91–101.
- [56] Li AL, Ni WW, Li Y, Zhang X, Yang JJ, Ma XY, Jia XD, Li C, Liu LB. Effect of 2'-fucosyllactose supplementation on intestinal flora in mice with intestinal inflammatory diseases. *International Dairy Journal*, 2020, 110: 104797.
- [57] Weiss GA, Chassard C, Hennet T. Selective proliferation of intestinal *Barnesiella* under fucosyllactose supplementation in mice. *The British Journal of Nutrition*, 2014, 111(9): 1602–1610.
- [58] Grabinger T, Garzon JFG, Hausmann M, Geirnaert A, Lacroix C, Hennet T. Alleviation of intestinal inflammation by oral supplementation with 2-fucosyllactose in mice. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1385.
- [59] Ryan JJ, Monteagudo-Mera A, Contractor N, Gibson GR. Impact of 2'-fucosyllactose on gut microbiota composition in adults with chronic gastrointestinal conditions: batch culture fermentation model and pilot clinical trial findings. *Nutrients*, 2021, 13(3): 938.
- [60] Lee S, Goodson M, Vang W, Kalanetra K, Barile D, Raybould H. 2'-fucosyllactose supplementation improves gut-brain signaling and diet-induced obese phenotype and changes the gut microbiota in high fat-fed mice. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1003.
- [61] Albermann C, Piepersberg W, Wehmeier UF. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydrate Research*, 2001, 334(2): 97–103.
- [62] 史然, 张登娅, 谷懿寰, 江正强, 杨绍青. 地杆菌  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶的分子改造及其在合成 2'-岩藻糖基乳糖中的应用. *食品科学*, 2021, 42(18): 135–142.
- Shi R, Zhang DY, Gu YH, Jiang ZQ, Yang SQ. Direct evolution of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. and its application in the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Food Science*, 2021, 42(18): 135–142. (in Chinese)
- [63] Guzmán-Rodríguez F, Alatorre-Santamaría S, Gómez-Ruiz L, Rodríguez-Serrano G, García-Garibay M, Cruz-Guerrero A. Synthesis of a fucosylated trisaccharide via transglycosylation by  $\alpha$ -l-fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(3): 681–691.
- [64] Seydametova E, Yu J, Shin J, Park Y, Kim C, Kim H, Yu SH, Park Y, Kweon DH. Search for bacterial  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferases for whole-cell biosynthesis of 2'-fucosyllactose in recombinant *Escherichia coli*. *Microbiological Research*, 2019, 222: 35–42.
- [65] Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(16): 4885–4893.
- [66] Ni ZJ, Li ZK, Wu JY, Ge YF, Liao YX, Yuan LX, Chen XS, Yao JM. Multi-path optimization for efficient production of 2'-fucosyllactose in an engineered *Escherichia coli* C41(DE3) derivative. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 611900.
- [67] Jung SM, Chin YW, Lee YG, Seo JH. Enhanced production of 2'-fucosyllactose from fucose by elimination of rhamnose isomerase and arabinose isomerase in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(9): 2412–2417.
- [68] Chin YW, Kim JY, Kim JH, Jung SM, Seo JH. Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis*. *Journal of Biotechnology*, 2017, 257: 192–198.
- [69] Huang D, Yang KX, Liu J, Xu YY, Wang YY, Wang R, Liu B, Feng L. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 23–38.
- [70] Parschat K, Schreiber S, Wartenberg D, Engels B, Jennewein S. High-titer *de novo* biosynthesis of the predominant human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose from sucrose in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(10): 2784–2796.
- [71] Chen Q, Wu HY, Ji MH, Xie YK, Li SJ, Li YQ, Shi JP, Sun JS. Engineering a colanic acid biosynthesis pathway in *E. coli* for manufacturing 2'-fucosyllactose.

- Process Biochemistry*, 2020, 94: 79–85.
- [72] Liao YX, Ni ZJ, Wu JY, Li ZK, Ge YF, Chen XS, Yao JM. Effect of acetate metabolism modulation on 2'-fucosyllactose production in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2021, 35(1): 425–436.
- [73] Li W, Zhu YY, Wan L, Guang CE, Mu WM. Pathway optimization of 2'-fucosyllactose production in engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(5): 1567–1577.
- [74] Chakrabarti T, Chen YM, Lin EC. Clustering of genes for L-fucose dissimilation by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1984, 157(3): 984–986.
- [75] Lee WH, Shin SY, Kim MD, Han NS, Seo JH. Modulation of guanosine nucleotides biosynthetic pathways enhanced GDP-L-fucose production in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(6): 2327–2334.
- [76] Zhai YF, Han DL, Pan Y, Wang SS, Fang JQ, Wang P, Liu XW. Enhancing GDP-fucose production in recombinant *Escherichia coli* by metabolic pathway engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 69: 38–45.
- [77] Lee WH, Chin YW, Han NS, Kim MD, Seo JH. Enhanced production of GDP-L-fucose by overexpression of NADPH regenerator in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(4): 967–976.
- [78] Yang B, Liang SX, Liu HH, Liu J, Cui ZZ, Wen JP. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol. *Bioresource Technology*, 2018, 267: 599–607.
- [79] Xu W, Yao J, Liu LJ, Ma X, Li W, Sun XJ, Wang Y. Improving squalene production by enhancing the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio, modifying the isoprenoid-feeding module and blocking the menaquinone pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 68.
- [80] Cui YY, Ling C, Zhang YY, Huang J, Liu JZ. Production of shikimic acid from *Escherichia coli* through chemically inducible chromosomal evolution and cofactor metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 21.
- [81] Rodriguez A, Martínez JA, Báez-Viveros JL, Flores N, Hernández-Chávez G, Ramírez OT, Gosset G, Bolivar F. Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and pykF. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 86.
- [82] 万李. 构建大肠杆菌细胞工厂生产 GDP-L-岩藻糖. 江南大学硕士学位论文, 2021.
- [83] 许曼, 江贤章, 黄建忠, 祁峰. 强化类球红细菌辅因子 NADPH 再生以提高法尼醇的产量. *生物工程学报*, 2020, 36(1): 90–99.
- Xu M, Jiang XZ, Huang JZ, Qi F. Reinforcement of *Rhodobacter sphaeroides* cofactor NADPH to increase the production of farnesol. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(1): 90–99. (in Chinese)
- [84] Shao J, Li M, Jia Q, Lu YQ, Wang PG. Sequence of *Escherichia coli* O128 antigen biosynthesis cluster and functional identification of an  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase. *FEBS Letters*, 2003, 553(1-2): 99–103.
- [85] Li M, Shen J, Liu XW, Shao J, Yi W, Chow CS, Wang PG. Identification of a new  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase involved in O-antigen biosynthesis of *Escherichia coli* O86:B7 and formation of H-type 3 blood group antigen. *Biochemistry*, 2008, 47(44): 11590–11597.
- [86] Pettit N, Styslinger T, Mei Z, Han WQ, Zhao GH, Wang PG. Characterization of WbiQ: an  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase from *Escherichia coli* O127:K63(B8), and synthesis of H-type 3 blood group antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 402(2): 190–195.
- [87] Engels L, Elling L. WbgL: a novel bacterial  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Glycobiology*, 2014, 24(2): 170–178.
- [88] 徐铮, 李娜, 朱婉莹, 张雯瑞, 陈盈利, 罗正山. 人乳寡糖 2'-岩藻糖基乳糖的生物法制备技术研究进展. *乳业科学与技术*, 2020, 43(5): 26–30.
- Xu Z, Li N, Zhu WY, Zhang WR, Chen YL, Luo ZS. Recent advances in bio-production of the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose(2'-FL). *Journal of Dairy Science and Technology*, 2020, 43(5): 26–30. (in Chinese)
- [89] Mattila P, Rabinä J, Hortling S, Helin J, Renkonen R. Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology*, 2000, 10(10): 1041–1047.

- [90] Liu JJ, Kwak S, Pathanibul P, Lee JW, Yu S, Yun EJ, Lim H, Kim KH, Jin YS. Biosynthesis of a functional human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, and l-fucose using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2529–2536.
- [91] Lee JW, Kwak S, Liu JJ, Yu S, Yun EJ, Kim DH, Liu C, Kim KH, Jin YS. Enhanced 2'-fucosyllactose production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* using xylose as a co-substrate. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 322–329.
- [92] Yu S, Liu JJ, Yun EJ, Kwak S, Kim KH, Jin YS. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 101.
- [93] Hollands K, Baron CM, Gibson KJ, Kelly KJ, Krasley EA, Laffend LA, Lauchli RM, Maggio-Hall LA, Nelson MJ, Prasad JC, Ren YX, Rice BA, Rice GH, Rothman SC. Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 232–242.
- [94] Deng JY, Gu LY, Chen TC, Huang H, Yin XQ, Lv XQ, Liu YF, Li N, Liu ZM, Li JH, Du GC, Liu L. Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis*. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2418–2427.
- [95] Christensen AS, Skov SH, Lendal SE, Hornshøj BH. Quantifying the human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose in different food applications by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Food Science*, 2020, 85(2): 332–339.
- [96] Seydametova E, Shin J, Yu J, Kweon DH. A simple enzymatic method for quantitation of 2'-fucosyllactose. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(7): 1141–1146.
- [97] Seydametova E, Shin J, Yu SH, Kim C, Kim H, Park YJ, Yang JK, Cho S, Kim HR, Moon SO, Ban C, Kweon DH. Development of a quantitative assay for 2'-fucosyllactose via one-pot reaction with  $\alpha$ -1,2-fucosidase and l-fucose dehydrogenase. *Analytical Biochemistry*, 2019, 582: 113358.
- [98] Shin J, Park M, Kim C, Kim H, Park Y, Ban C, Yoon JW, Shin CS, Lee JW, Jin YS, Park YC, Min WK, Kweon DH. Development of fluorescent *Escherichia coli* for a whole-cell sensor of 2'-fucosyllactose. *Scientific Reports*, 2020, 10: 10514.
- [99] Hanlon PR, Thorsrud BA. A 3-week pre-clinical study of 2'-fucosyllactose in farm piglets. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 74: 343–348.
- [100] Ramirez-Farias C, Baggs GE, Marriage BJ. Growth, tolerance, and compliance of infants fed an extensively hydrolyzed infant formula with added 2'-FL fucosyllactose (2'-FL) human milk oligosaccharide. *Nutrients*, 2021, 13(1): 186.
- [101] Storm HM, Shepard J, Czerkies LM, Kineman B, Cohen SS, Reichert H, Carvalho R. 2'-fucosyllactose is well tolerated in a 100% whey, partially hydrolyzed infant formula with *Bifidobacterium lactis*: a randomized controlled trial. *Global Pediatric Health*, 2019, 6: 2333794X19833995.
- [102] Reverri EJ, Devitt AA, Kajzer JA, Baggs GE, Borschel MW. Review of the clinical experiences of feeding infants formula containing the human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1346.
- [103] Phipps KR, Lynch B, Stannard DR, Gilby B, Baldwin N, Mikš MH, Lau A, Röhrig CH. Genotoxicity and neonatal subchronic toxicity assessment of a novel mixture of the human-identical milk oligosaccharides lacto-N-fucopentaose I and 2'-fucosyllactose. *Journal of Applied Toxicology*, 2021, 41(4): 632–649.
- [104] Phipps KR, Baldwin N, Lynch B, Flaxmer J, Šoltésová A, Gilby B, Mikš MH, Röhrig CH. Safety evaluation of a mixture of the human-identical milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and difucosyllactose. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 120: 552–565.
- [105] EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck D, Castenmiller J, De Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Kearney J, Maciuk A, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Pelaez C, Pentieva K, Siani A, Thies F, Tsabouri S, Vinceti M, Cubadda F, Engel KH, Frenzel T, Heinonen M, Marchelli R, Neuhäuser-Berthold M, Pötting A, Poulsen M, Sanz Y, Schlatter JR, van Loveren H, Sun Q, Turla E, Knutsen HK. Safety of 2'-fucosyllactose/difucosyllactose mixture as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 2019, 17(6): e05717.
- [106] Parschat K, Oehme A, Leuschner J, Jennewein S,

- Parkot J. A safety evaluation of mixed human milk oligosaccharides in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 136: 111118.
- [107] Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000650. <https://www.fda.gov/food/gras-notice-inventary/agency-response-letter-gras-notice-no-grn-000650>. 2016-11-23.
- [108] A1155-2'-FL and LNnT in infant formula and other products. <https://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/A1155.aspx>. 2019-12-20.
- [109] Zhu YY, Wan L, Li W, Ni DW, Zhang WL, Yan X, Mu WM. Recent advances on 2'-fucosyllactose: physiological properties, applications, and production approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020(1): 1–10.
- [110] 瓮茹茹, 卫鑫慧, 李浩正, 路福平, 李玉. 2'-岩藻糖基乳糖的微生物合成研究进展. *食品科学*, 2021, 42(17): 248–254.
- Weng RR, Wei XH, Li HZ, Lu FP, Li Y. Progress in microbial synthesis of 2'-fucosyllactose. *Food Science*, 2021, 42(17): 248–254. (in Chinese)
- [111] Zhou WT, Jiang H, Wang LL, Liang XX, Mao XZ. Biotechnological production of 2'-fucosyllactose: a prevalent fucosylated human milk oligosaccharide. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(3): 447–458.
- [112] Hegar B, Wibowo Y, Basrowi RW, Ranuh RG, Sudarmo SM, Munasir Z, Atthiyah AF, Widodo AD, Supriatmo, Kadim M, Suryawan A, Diana NR, Manoppo C, Vandenplas Y. The role of two human milk oligosaccharides, 2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose, in infant nutrition. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 2019, 22(4): 330–340.
- [113] 王永胜, 王硕, 张慧林, 李冲伟. L-岩藻糖对母乳寡糖(HMOs)合成的意义及其产业化研究进展. *中国农学通报*, 2019, 35(11): 127–132.
- Wang YS, Wang S, Zhang HL, Li CW. L-fucose: the significance to synthesis of human milk oligosaccharides (HMOs) and its research progress of industrialization. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(11): 127–132. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)