DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251114005
引用格式: 陈婷, 叶发银, 李上, 等. 母乳低聚糖高效分离纯化技术及替代物开发方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(5): 132–142.
CHEN T, YE FY, LI S, *et al*. Research progress on efficient separation and purification technology of human milk oligosaccharides and alternative development methods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(5): 132–142. (in Chinese with English abstract).

母乳低聚糖高效分离纯化技术及替代物开发方法研究进展

陈 婷[1], 叶发银[2,3], 李 上[1], 周 娇[1], 曾玉雪[1], 房翠兰[1*]

(1. 重庆市九龙坡区疾病预防控制中心, 重庆 400039; 2. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715;
3. 川渝共建特色食品重庆市重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)作为母乳中的重要功能成分, 在婴幼儿营养和健康中发挥着不可替代的作用。随着对其生物学功能认识的深入和市场需求的增长, 开发高效、经济、可持续的HMOs 分离纯化技术及其替代物已成为研究热点。本文系统综述了 HMOs 的结构分类、生物学功能、高效分离纯化技术, 包括凝胶过滤、离子交换、模拟移动床等色谱分离技术, 超滤、纳滤及膜集成工艺等膜分离技术以及溶剂沉淀/萃取、活性炭吸附、电泳等纯化分离技术的优势与局限; 同时综述了微生物发酵法、酶法合成、化学合成及新型生物制造技术等 HMOs 替代物开发方法的研究进展; 通过量化对比为技术选型提供参考, 展望了未来的研究方向, 以期为 HMOs 产业的规模化、低成本发展提供参考, 推动其在婴幼儿营养及医药保健领域的广泛应用。

关键词: 母乳低聚糖; 高效分离纯化技术; 替代物开发方法

Research progress on efficient separation and purification technology of human milk oligosaccharides and alternative development methods

CHEN Ting[1], YE Fa-Yin[2,3], LI Shang[1], ZHOU Jiao[1], ZENG Yu-Xue[1], FANG Cui-Lan[1*]

(1. *Chongqing Jiulongpo District Center for Disease Control and Prevention*, *Chongqing* 400039, *China*;
2. *College of Food Science*, *Southwest University*, *Chongqing* 400715, *China*; 3. *Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-built by Sichuan and Chongqing*, *Chongqing* 400715, *China*)

ABSTRACT: Human milk oligosaccharides (HMOs) as an important functional component in breast milk, play an irreplaceable role in the nutrition and health of infants and young children. With the deepening understanding of its biological functions and the growth of market demand, the development of efficient, economical and sustainable HMOs separation and purification technologies and their alternatives has become a research hotspot. This article

收稿日期: 2025-11-14
基金项目: 重庆市九龙坡区科技计划项目(2024-04-028-Y)
第一作者: 陈婷(1995—), 女, 工程师, 主要研究方向为食品营养与化学。E-mail: 994853889@qq.com
***通信作者:** 房翠兰(1976—), 女, 高级工程师, 主要研究方向为理化与卫生毒理。E-mail: fangcuilan@163.com

systematically reviewed the structural classification, biological functions and efficient separation and purification technologies of HMOs, including the advantages and limitations of chromatographic separation technologies such as gel filtration, ion exchange and simulated moving beds, membrane separation techniques such as ultrafiltration, nanofiltration and membrane integration processes, as well as purification and separation technologies such as solvent precipitation/extraction, activated carbon adsorption and electrophoresis. Meanwhile, this article also reviewed the research progress of HMOs alternative development methods, such as microbial fermentation, enzymatic synthesis, chemical synthesis and new biomanufacturing technologies. Through quantitative comparison, it provided a reference for technology selection, and prospected the future research directions, with the aim of providing references for the large-scale and low-cost development of the HMOs industry and promoting its wide application in the fields of infant nutrition and medical care.

KEY WORDS: human milk oligosaccharides; efficient separation and purification technology; alternative development methods

0　引　言

母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)是母乳中第三大成分, 其结构多样性和多功能性使其成为婴幼儿营养领域的研究核心[1]。近年来, 国内外对 HMOs 的研究呈现爆发式增长: 国外已实现 2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-新四糖等核心 HMOs 的商业化生产, 主要依赖微生物发酵技术[2−3]; 国内研究则聚焦于高效菌株构建、新型分离介质开发及替代物合成工艺优化, 虽已取得实验室规模的突破, 但在工业化转化效率、成本控制及产品多样性方面仍存在差距[4]。

已发表的综述多侧重单一技术方向, 缺乏对分离纯化-替代物开发全链条的系统整合, 且对新型生物制造技术的覆盖不足 HMOs 独特的益生元、免疫调节和抗感染等功能, 使其在婴幼儿配方奶粉功能食品及医药领域的需求持续攀升[5]。然而, 天然母乳中 HMOs 的提取产量极低, 直接提取难以满足规模化需求。开发高效、经济、可持续的分离纯化技术及替代物生产策略, 成为突破产业瓶颈的关键。

本文全面综述了母乳低聚糖高效分离纯化技术及替代物开发的研究进展, 系统整合了 HMOs 分离纯化与替代物开发的全链条技术进展, 填补现有综述的覆盖缺口; 明确各类技术的工业适用性、成本及优缺点; 重点突出人工智能辅助设计、无细胞合成等新兴技术的应用潜力。本研究可为相关科研人员明确技术发展现状与瓶颈, 为企业提供工业化转化的可行路径, 推动我国 HMOs 产业从实验室研究走向规模化、低成本生产, 助力婴幼儿营养产品的升级迭代。

1　母乳低聚糖

1.1　结构与分类

HMOs 是一种结构复杂的寡糖, 每个 HMO 单元由乳糖基(galactosy-β 1-4-葡萄糖)构成, 与 5 种基础单糖(包括 *D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、*L*-岩藻糖、N-乙酰葡糖胺和 N-乙酰神经氨酸)中的一个或多个单糖发生缩合反应[6]。HMOs 的分子结构图, 如图 1 所示。

HMOs 根据末端修饰基团, 可分为中性岩藻糖基化 HMOs、中性非岩藻糖基化 HMOs 和酸性唾液酸化 HMOs 3 类: (1)中性岩藻糖基化 HMOs 的结构特点是末端含有岩藻糖(如 2'-FL、3-FL、LNFP I), 其占比约为 35%~50%, 其中 2'-FL 的含量最高; (2)中性非岩藻糖基化 HMOs 的结构特点是末端含有 *N*-乙酰葡糖胺(如 LNT、LNnT), 占比 42%~55%; (3)酸性唾液酸化 HMOs 的结构特点是末端含有唾液酸残基(如 3'-SL、6'-SL、DSLNT), 占比 12%~14%[8]。HMOs 的主要结构分类与核心修饰, 如表 1 所示。

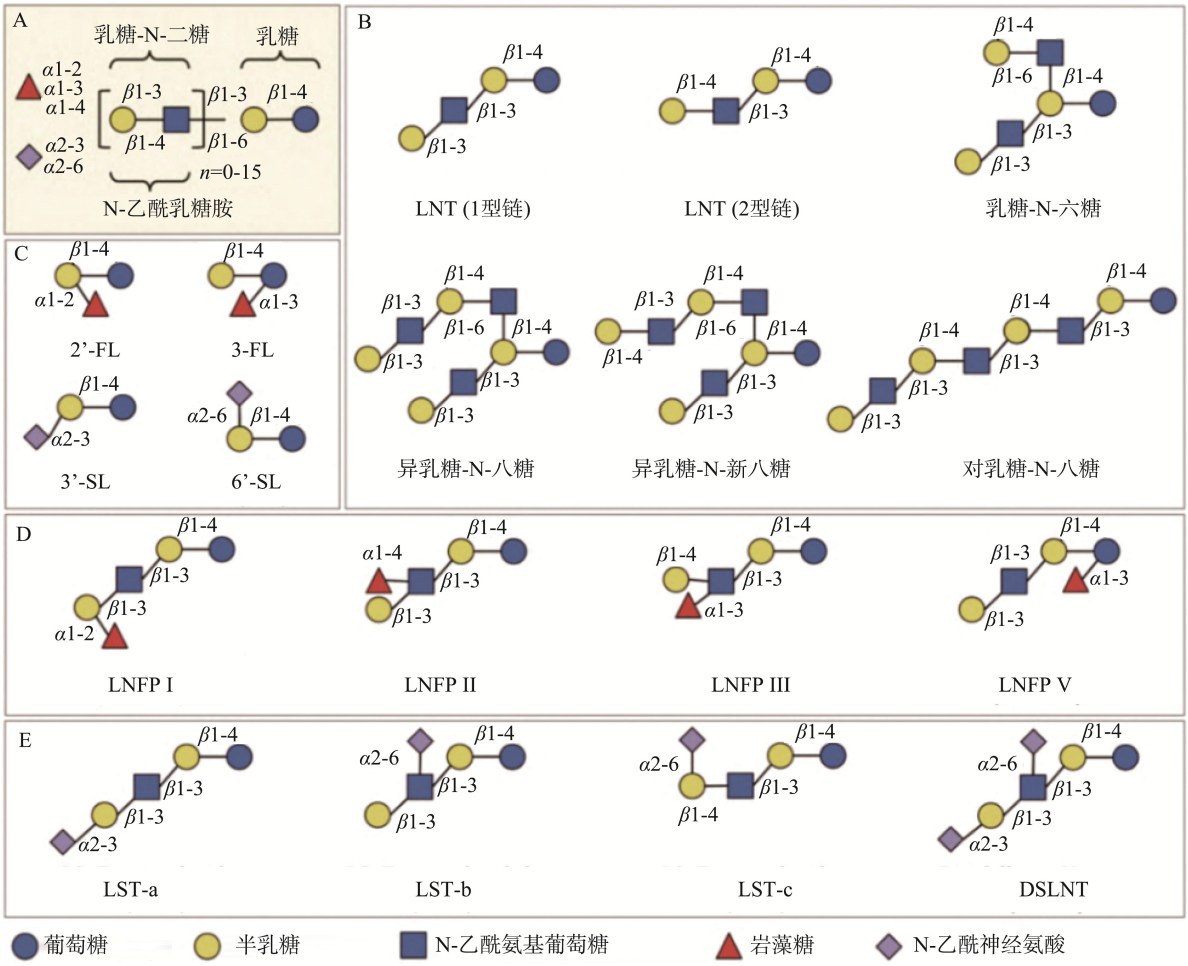
通过分析认为, HMOs 的结构多样性是其功能特异性的基础, 不同修饰类型(岩藻糖基化、唾液酸化)决定了其在益生元活性、抗病原体吸附等方面的差异。例如, 岩藻糖基化 HMOs 在婴幼儿肠道菌群调控中发挥核心作用, 而唾液酸化 HMOs 更侧重神经发育促进功能, 这一结构-功能关联为替代物的定向设计提供了理论依据。

1.2　生物学功能

HMOs 的生物学功能围绕肠道微生态调控、免疫调节及全身健康效应展开, 不同功能间存在协同作用, 且已有多项研究从体外实验、动物模型及临床队列层面验证了其有效性, 但作用机制的精细化研究仍需深入。

(1)益生元作用

HMOs 作为益生菌, 特别是双歧杆菌等有益菌种的首选碳源与能量源泉, 显著促进了这些菌群的增殖。在此过程中, 益生菌代谢产生乳酸及短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)等产物, 不仅能降低肠道环境的 pH, 抑制大肠杆菌、沙门氏菌等致病菌的定植, 还能通过肠-脑轴、肠-肝轴影响全身代谢。值得注意的是, 不同结构 HMOs



注: 乳糖-N-四糖(lacto-N-tetraose, LNT); 2'-岩藻糖基乳糖(2'-fucosyllactose, 2'-FL); 3-岩藻糖基乳糖(fucosyllactose, 3-FL); 3'-唾液酸乳糖(3'-sialyllactose, 3'-SL); 6'-唾液酸乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL); 乳糖-N-岩藻五糖(lacto-N-fucopentaose, LNFP); 二唾液酸乳糖-N-四糖(disialyllacto-N-tetraose, DSLNT); 唾液酸化乳-N-四糖(LS-tetrasaccharide, LST)。

图 1 HMOs 的分子结构[7]

Fig.1 Molecular structures of HMOs[7]

表 1 HMOs 的主要结构分类与核心修饰

Table 1 Primary structural classification and core modifications of HMOs

结构类型	代表分子	核心修饰	参考文献
中性岩藻糖基化	2'-FL	α1-2 岩藻糖基-乳糖	[7]
	3-FL	α1-3 岩藻糖基-乳糖	[7]
酸性唾液酸化	3'-SL	α2-3 唾液酸-乳糖	[8]
	6'-SL	α2-6 唾液酸-乳糖	[8]
中性非岩藻糖基化	LNnt	β1-3N-乙酰氨基葡萄糖-β 1-4 半乳糖-乳糖	[9]

注: 乳糖-N-新四糖(lacto-N-neotetraose, LNnT)。

的益生元活性存在差异: 2'-FL 对婴儿肠道双歧杆菌的增殖效果显著优于 LNnT 等中性非岩藻糖基化 HMOs, 这一特异性为功能导向型替代物开发提供了靶点[4]。通过分析认为, 当前研究多关注单一 HMO 的益生效果, 而母乳中 HMOs 是以混合物形式存在, 其协同作用机制及比例优化仍是未来研究的重点。

(2)抗病原体吸附

URASHIMA 等[10]指出, HMOs 可作为"诱饵受体"阻断细菌、病毒与宿主上皮细胞结合, 从而抑制感染; RAY 等[11]的研究进一步证实 HMOs 可直接破坏病原体细胞膜完整性, 拓展了其作用路径。不同结构 HMOs 针对的病原体具有特异性: 2'-FL 对轮状病毒、诺如病毒的抑制效果显著, 而 3'-SL、6'-SL 等唾液酸化 HMOs 则对呼吸道合胞病毒、流感病毒更具针对性; MOORE 等[12]研究发现, HMOs 可降低孕妇生殖道 B 族链球菌感染率, 间接证实其在母婴健康中的应用价值; KIM 等[13]指出 2'-FL 可通过改善肠屏障功能、调节肠道菌群, 缓解葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的溃疡性结肠炎。通过分析认为, 现有研究多集中在常见病原体, 对耐药菌株及新型病原体(如新

冠病毒)的抑制效果尚未明确, 且 HMOs 与抗生素的协同作用研究较少, 这为后续功能拓展提供了方向。

(3)免疫调节

RAY 等[11]的研究显示, HMOs 对免疫细胞的调控作用呈现多维度: HMOs 能够调节树突状细胞、Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)等免疫细胞活性, 平衡 Th1/Th2 反应, 减轻过度炎症; URASHIMA 等[10]也强调 HMOs 对全身免疫反应的调控潜力; 徐颢轩等[14]进一步总结, HMOs 能够通过调节树突状细胞、T 细胞等免疫细胞活性, 促进肠道黏膜免疫球蛋白 A 分泌, 增强黏膜屏障的免疫防御能力, 降低过敏和炎症反应; TRIPP 等[15]在小鼠模型中证明, 补充 HMOs 可显著提升结肠内乙酸、丙酸、丁酸等 SCFAs 水平, 通过激活 G 蛋白偶联受体调控免疫细胞分化, 为解释其全身免疫调节作用提供了新视角。通过分析认为, 当前免疫调节研究多基于动物模型或体外细胞实验, 临床数据相对匮乏, 且不同年龄段、健康状况人群对 HMOs 的免疫响应差异尚未明确, 需开展更多队列研究验证其适用性。

(4)促进肠道屏障功能

徐颢轩等[14]指出, HMOs 能够作为益生元选择性促进婴儿肠道中双歧杆菌等有益菌的增殖, 并通过与肠道菌群互作调节宿主的免疫反应, 间接增强屏障功能; 王果等[16]在综述中列举了多项研究, 显示 HMOs(如 2'-FL、LNnT)在体外和婴儿肠道模型中均能显著提升双歧杆菌丰度, 改善肠道微生态; BERGER 等[17]通过队列研究发现, HMOs 能够特异性促进双歧杆菌等有益菌的增殖, 并通过发酵产生 SCFAs, 改善肠道微生态; FAN 等[18]也表明 HMOs 可提升肠道菌群 α 多样性, 抑制机会致病菌; URASHIMA 等[10]总结, HMOs 通过促进黏液分泌、加强紧密连接蛋白表达, 提升肠道上皮屏障完整性, 降低早产儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)的发病风险。通过分析认为, 当前研究多聚焦于健康婴儿或动物模型, HMOs 对肠道屏障损伤(如炎症性肠病)的修复机制仍需深入, 且不同结构 HMOs 的修复效率差异较大, 需进一步筛选高效活性分子。

(5)促进脑发育

HMOs 通过肠-脑轴调控神经发育, 这一发现打破了其仅作用于肠道的传统认知。BERGER 等[17]的纵向研究表明, LNFP III 等岩藻糖基化 HMOs 与婴儿 24 月龄时的认知发育评分呈正相关; 而 FAN 等[18]进一步通过阿尔茨海默病小鼠模型发现, HMOs 能够改善学习记忆能力, 提示 HMOs 可能通过肠-脑轴对认知功能产生积极影响; URRUTIA-BACA 等[19]在斑马鱼研究中, 从分子层面证实, 唾液酸乳糖-N-四糖 b (sialyllacto-N-tetraose b, LST-b)可促进运动神经元的分化与突触形成。

然而, 当前脑发育相关研究仍处于初步阶段, HMOs 穿越血脑屏障的具体路径、关键活性成分及长期神经保护效果尚未明确, 需结合影像学、代谢组学技术开展深入研究。这些多功能特性使得 HMOs 成为婴幼儿配方食品中极具价值的添加成分, 同时也为开发各种功能性食品和医药产品提供了可能性。

2　高效分离纯化技术

2.1　层析技术

层析技术是 HMOs 分离纯化的核心手段之一, 依据分离原理可分为凝胶过滤层析、离子交换层析及模拟移动床色谱等, 各类技术的适用场景与工业化潜力差异显著。

(1)凝胶过滤层析

凝胶过滤层析(又称尺寸排阻色谱)是早期从母乳中分离 HMOs 的经典方法, 依据分子大小和形状进行分离。URASHIMA 等[10]在综述中指出, 实验室规模制备 HMOs 时, 常将粗提的 HMOs 溶液上样至葡聚糖凝胶 G-25 或聚丙烯酰胺凝胶 P-4 等凝胶柱进行分离, 观察到酸性 HMOs 先被洗脱, 随后是中性 HMOs, 这一现象与低聚糖的分子大小无关; CHEN 等[20]采用多孔石墨碳吸附结合高效液相色谱-质谱联用技术对 HMOs 进行定性与定量分析, 其前处理步骤中仍借鉴了基于分子尺寸的分离原理, 体现了凝胶过滤在 HMOs 分析流程中的基础地位; MOLLOVA 等[21]虽未直接使用传统凝胶介质, 但在 HMOs 的提取与纯化流程中保留了尺寸排阻的思想, 通过固相萃取等方式去除小分子单糖与双糖, 进一步验证了按分子大小分离策略在 HMOs 制备中的延续性。

然而, 传统凝胶过滤层析处理量小、耗时长、洗脱液体积大, 仅适用于实验室规模制备, 难以满足工业化生产需求。结合现有研究分析认为, 其核心瓶颈在于凝胶介质的孔径均一性与机械强度不足, 未来可通过改性凝胶材料(如复合多孔材料)提升分离效率与处理量, 或与膜分离技术联用, 构建初步分离-精细纯化的组合流程。

(2)离子交换层析

离子交换层析利用 HMOs 所带电荷差异进行分离, 尤其适合从复杂基质中纯化唾液酸化酸性 HMOs。ZHANG 等[22]建立了离子色谱-脉冲安培检测法, 可同时测定婴幼儿配方奶粉中的 6 种 HMOs, 包括两种唾液酸化的酸性 HMOs (3'-SL 和 6'-SL), 该方法采用碳水化合物 PA1 (CarboPac^{TM} PA1)分析柱, 以氢氧化钠-乙酸钠梯度洗脱, 能有效分离并定量酸性 HMOs, 适用于常规检测; GAN 等[3]指出该技术常与其他色谱(如亲水相互作用色谱)联用, 提升对酸性 HMOs 的选择性; PERNA 等[23]指出离子交换层析可用于纯化, 以去除反应体系中的盐分和杂质, 从而获得高纯度的酸性 HMOs; DUMAN 等[2]进一步说明离子交换层析是分离酸性 HMOs 的有效工具, 因其能依据唾液酸

残基的负电荷进行选择性吸附与洗脱。

离子交换法设备相对简单、操作方便、连续化程度高，但存在明显局限：(1) pH、离子强度等参数对分离效果影响敏感，需通过响应面法等实验设计精准优化；(2)树脂再生过程需消耗大量酸碱试剂，增加环保成本。通过分析认为，采用新型弱酸性离子交换树脂可降低酸碱消耗，且提升分离纯度，表明树脂改性是提升该技术工业化潜力的关键方向。

(3)模拟移动床色谱法

模拟移动床色谱法(simulated moving bed chromatography，SMB)是近年来发展起来的连续色谱分离技术，特别适用于二元或多元体系的工业规模分离。SMB 技术通过模拟固定相与流动相的相对运动，实现连续进料和分离，大大提高了分离效率和产物纯度，降低了溶剂消耗。VAN-IMPE 等[24]提出一种 SMB 超结构优化方法，能够同时优化柱数量、柱尺寸、切换时间与流速，相比传统固定结构的优化更为高效；李凌等[25]研究了基于模糊策略的 SMB 控制方法，针对多变量耦合的系统特点设计模糊控制器，提升纯度控制的鲁棒性；CHEN 等[26]利用增强型 SMB 方案实现 3 组分分离，在阳离子交换捕获步骤中有效去除杂质，提高了单克隆抗体等生物大分子的纯度；凌山等[27]综述了 SMB 及其变体(如变色、电源输入、梯度 SMB)的优化进展，指出顺序式模拟移动床(sequential simulated moving bed, SSMB)在减少返混、提高分离经济性方面的优势；JAFARZADEH 等[28]系统总结了 SMB 在单克隆抗体纯化中的应用，指出其相比批次色谱具有更高生产率、更低溶剂消耗的特点。

SMB 技术对结构相似的 HMOs 异构体分离显示出独特优势，但该技术存在两大瓶颈：(1)设备投资较高，限制了中小企业的应用；(2)耦合性强，优化难度大。通过分析认为，结合人工智能(artificial intelligence，AI)算法构建参数优化模型，可显著降低调试周期，而开发模块化 SMB 设备则能降低投资门槛，推动其在中小规模生产中的应用。

2.2 膜分离技术

膜分离技术凭借其操作简便、能耗低、无相变、易于放大等优势，已成为 HMOs 分离纯化的重要技术，主要包括超滤、纳滤及其组合工艺。

(1)超滤技术

超滤技术通常用作预处理步骤，依据分子量截留特性去除蛋白质、大分子杂质和微生物。GUO 等[29]研究了超滤膜在模拟发酵液中对总糖(包括寡糖)的分离性能，比较了再生纤维素膜，截留分子量 30 kDa (RC-30)、RC-50、RC-100 和聚醚砜膜，截留分子量 50 kDa (PES-50) 4 种超滤膜在不同操作压力下的纯水通量以及对蛋白质、总糖和乳酸的过滤效率，为超滤在糖类分离中的应用提供了实验依据；PERNA 等[23]开发了在牛乳中直接酶法合成 HMOs 的方法，并指出在后续纯化中可采用膜过滤(包括超滤)去除大分子杂质，从而实现 HMOs 的高效分离；URASHIMA 等[10]在综述中系统总结了 HMOs 的工业化纯化流程，其中细胞分离步骤采用膜过滤(包括超滤)与离心相结合，从发酵液中分离细胞及不溶性物质，为超滤技术在 HMOs 规模化提取中的应用提供了工艺支持；BARNUM 等[30]在植物平台生产 HMOs 的研究中，建立了从植物组织中提取、纯化 HMOs 的流程，其中涉及水提取后的过滤步骤，虽未直接命名超滤，但膜分离技术在去除多糖、色素等杂质方面发挥关键作用。

然而，由于某些 HMOs 与乳糖分子量接近(如二糖与三糖)，单独使用超滤分离效果有限，通常需要与纳滤、色谱等技术联用。通过分析认为，超滤技术的核心价值在于预处理阶段的高效除杂，降低后续工艺的负荷，其工业化应用的关键在于膜材料的抗污染性能优化，可通过表面改性(如亲水性涂层)提升膜的使用寿命。

(2)纳滤技术

纳滤技术凭借其介于超滤和反渗透之间的截留分子量(200~1000 Da)，在 HMOs 分离纯化中表现出独特优势，纳滤膜可有效分离单糖、二糖与低聚糖，实现 HMOs 的浓缩和纯化。WANG 等[31]研究了基于大肠杆菌发酵产生的 2’-FL 的纯化工艺，采用膜过滤(包括纳滤)结合活性炭吸附，成功将 2’-FL 纯度提升至 90%以上，为工业化下游纯化提供了新方案；HOFMANN 等[32]针对乳糖与乳清渗透液的浓缩开展了纳滤膜筛选与放大研究，虽然研究对象为乳糖而非专指 HMOs，但其纳滤工艺对寡糖的截留与浓缩机制对 HMOs 的分离具有参考价值；ZSCHERPE 等[33]开发了反渗透-纳滤膜级联系统，用于生产脱脂乳浓缩物，展示了纳滤在乳成分分离中的集成应用潜力，为 HMOs 的高效分离提供了工程借鉴。

纳滤膜过程无需相变，操作温度温和，有利于保持 HMOs 的生物活性，但面临膜污染、选择性不足等挑战。通过对比不同纳滤膜的分离效果发现，陶瓷纳滤膜的抗污染性和稳定性优于有机膜，但成本较高；而有机膜的规模化应用更具经济性，需通过优化操作参数平衡分离效率与膜寿命。

(3)膜集成工艺

膜集成工艺将不同膜过程有机结合，充分发挥各自优势，实现 HMOs 的高效分离纯化，常见的组合模式包括超滤-纳滤、纳滤-渗滤等。王雨奇等[34]采用陶瓷膜两阶段切向工艺处理山羊乳酪乳清和浓缩乳清，分别通过 10 kDa 超滤后再经过 750 Da 纳滤处理，最终分离获得低聚糖含量分别为 63.80%和 96.45%的产品；纳滤-渗滤两种膜技术结合用于低聚糖的分离纯化也较为广泛，可显著提高产品纯度和回收率。

膜集成工艺优化了分离流程，提高了整体效率，但增

加了设备投资和操作复杂度。通过分析认为, 超滤-纳滤是当前最具工业化潜力的膜集成方案, 可实现 除杂-浓缩-分离的连续化操作, 其关键在于各单元工艺参数的匹配优化(如超滤截留分子量与纳滤截留分子量的协同), 以达到最佳的分离效果和经济性。

2.3　其他分离技术

除了层析和膜分离技术, 还有其他多种方法用于 HMOs 的分离纯化, 各具特色和适用场景, 本文主要综述以下 3 种其他分离技术。

(1)溶剂沉淀/萃取法

溶剂沉淀/萃取法利用 HMOs 在不同溶剂中溶解度的差异进行分离纯化。MOLLOVA 等[21]采用乙醇沉淀结合固相萃取从母乳中提取 HMOs, 该研究提出了一套完整的 HMOs 提取流程, 首先通过离心去除脂肪, 随后加入 2 倍体积的乙醇在 4 ℃沉淀蛋白质, 再经 β-半乳糖苷酶处理去除乳糖, 最后利用固相萃取纯化寡糖; URRUTIA-BACA 等[19]开发水相萃取法高效提取 2'-FL, 针对传统有毒溶剂萃取的问题, 该团队优化了以水为溶剂的萃取条件(包括离心时间、水体积、孵育时间等), 实现了 2'-FL 的高效回收, 方法比传统方法快 50%且更经济; CHEN 等[20]结合沉淀与吸附技术测定 HMOs, 研究采用脱脂、脱蛋白(含乙醇沉淀步骤)预处理母乳样本, 随后通过多孔石墨碳吸附与高效液相色谱-质谱联用技术对多种 HMOs 进行定性与定量分析, 展示了溶剂沉淀在样品前处理中的关键作用。

溶剂法操作简单, 成本较低, 但通常选择性不高, 且可能引入有机溶剂残留问题。建议在工业化应用中可优先选择乙醇等低毒溶剂, 并通过后续洗涤、干燥步骤控制残留; 对于高纯度要求的产品, 溶剂沉淀法仅适用于前处理, 需与色谱、膜分离等技术联用。

(2)活性炭吸附法

活性炭吸附法利用活性炭对糖类分子的吸附特性进行分离, 在 HMOs(尤其是 2'-FL)的下游纯化中具有明确的应用价值, 主要用于去除单糖、色素等杂质, 且常与膜过滤、离子交换等技术联用, 以提升产品纯度与回收率。WANG 等[31]系统研究了膜过滤与活性炭吸附联用对发酵产生的 2'-FL 的纯化效果, 采用 3000 Da 和 500 Da 膜组件分别去除大分子杂质和浓缩目标产物, 随后利用活性炭色谱去除单糖等小分子杂质, 并使用 10 %乙醇进行洗脱, 该组合工艺使 2'-FL 的纯度提升至 90.09 %以上, 证明了活性炭吸附在去除单糖类杂质方面的有效性, 并指出后续需进一步提高活性炭的吸附容量与稳定性以适应规模化生产; URASHIMA 等[10]在综述中提到, 在发酵法生产 HMOs 的工艺中, 活性炭常被用于脱色以及去除培养液中的有色物质, 属于纯化流程中的常规步骤之一。

活性炭吸附成本低, 操作简便, 但吸附容量有限, 再生困难, 不适合大规模连续生产。通过分析认为, 活性炭吸附的核心应用场景是下游脱色和微量杂质去除, 可通过优化活性炭孔径、吸附温度和洗脱条件提升吸附容量; 未来可开发改性活性炭, 实现吸附剂的高效回收与再生, 降低成本。

(3)电泳技术

电泳技术(如毛细管电泳)主要用于 HMOs 的分析检测, 而非制备型分离。CHEN 等[20]指出毛细管电泳与液相色谱均为 HMOs 的常用分离手段, 可用于对中性与酸性寡糖的分离; LÜ 等[35]在综述中提及, 毛细管电泳是解析 HMOs 组成的重要技术之一, 常与衍生化试剂(如 2-氨基吖啶酮)结合使用, 以实现中性及酸性寡糖的高效分离。

尽管电泳技术可实现高效分离和灵敏检测, 但对设备要求高, 处理量极小, 主要用于实验室分析鉴定。通过分析认为, 电泳技术的价值在于 HMOs 的结构鉴定和纯度检测, 而非规模化制备, 其未来发展方向是与质谱等检测技术联用, 提升定性定量的准确性。

2.4　集成化与序列化分离工艺

单一分离技术往往难以同时满足高纯度、高回收率、低成本和规模化生产的要求, 因此集成多种分离技术的序列化工艺成为 HMOs 分离纯化的发展趋势。典型的集成工艺通常包括以下步骤: 预处理(去除蛋白质、脂肪等大分子杂质)→初步分离(如膜分离、沉淀等)→精细纯化(如色谱分离)→浓缩(如纳滤、蒸发)→最终处理(如干燥、灭菌)。URASHIMA 等[10]指出在工业规模生产中, 集成化工艺通常按照细胞分离-脱盐脱杂-脱色-粉末化的流程进行, 综合运用膜过滤、离心、电渗析、离子交换、活性炭吸附、结晶和喷雾干燥等多种技术。

结合现有研究总结, 当前最成熟的集成工艺为预处理(超滤+离心)→初步分离(纳滤)→精细纯化(离子交换层析/SMB)→深度处理(活性炭吸附+纳滤浓缩)→成品化(喷雾干燥), 该流程可将 HMOs 纯度提升至 95%以上, 回收率达 80%左右, 适合规模化生产。未来集成工艺的发展方向是绿色化与智能化: 通过采用低能耗膜技术、可再生吸附剂降低环境负荷; 借助 AI 算法实时优化工艺参数, 提升产品质量稳定性。

HMOs 主要分离纯化技术比较, 如表 2 所示。

3　替代物开发方法研究

3.1　微生物发酵法

微生物发酵法是生产 HMOs 替代物的主流技术, 通过基因工程改造微生物(如大肠杆菌、酵母菌)的代谢途径, 使其能够合成特定结构的 HMOs。

表 2 HMOs 主要分离纯化技术比较

Table 2 Comparison of main separation and purification techniques for HMOs

技术类型	代表方法	核心优势	主要局限	适用场景	工业化潜力	参考文献
层析技术	凝胶过滤层析法	操作简单、对生物活性影响小	处理量小、耗时长	实验室制备	低	[10]
	离子交换层析法	选择性高、连续化程度高	需优化 pH/离子强度、环保成本高	酸性 HMOs 纯化	中	[3,22–23]
	SMB	分离效率高、溶剂消耗低	设备投资高、参数复杂	结构相似异构体分离	高	[24,26–27]
膜分离技术	超滤法	能耗低、可初步除杂	分离选择性有限	预处理(除蛋白、大分子)	高	[29–30]
	纳滤法	可浓缩+分离、条件温和	膜污染严重、选择性不足	单糖/低聚糖分离、浓缩	高	[31–32]
	膜集成工艺(超滤-纳滤)	流程优化、回收率高	设备复杂、操作成本高	规模化生产	中-高	[34]
其他技术	溶剂沉淀/萃取法	成本低、操作简便	有机溶剂残留、选择性差	样品前处理	低	[19–21]
	活性炭吸附法	脱色效果好、成本低	吸附容量有限、再生困难	脱色、除单糖杂质	中(辅助工艺)	[10,31]
	电泳技术	分离效率高、检测灵敏	处理量极小、设备要求高	实验室分析鉴定	无	[20,35]

(1)基因工程菌株构建

基因工程菌株构建是微生物发酵法的核心。通过引入外源基因(如糖基转移酶基因、合成酶基因)、敲除竞争性代谢途径、优化调控元件等策略，构建高效生产特定 HMOs 的工程菌株。ZHANG 等[36]使用来自蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的新型岩藻糖基转移酶 FutCB，构建了能够以葡萄糖为唯一碳源从头合成 2'-FL 的重组大肠杆菌，该菌株敲除了 *β*-半乳糖苷酶基因与庚基转移酶 II 编码基因，并过表达了鸟苷二磷酸(guanosine diphosphate, GDP)-*L*-岩藻糖合成途径的关键基因 GDP-*D*-甘露糖 4,6-脱水酶、磷酸甘露糖变位酶、GDP-4-酮基-6-脱氧-D-甘露糖-3,5-差向异构酶-4-还原酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酰转移酶，在补料分批发酵 64 h 后，2'-FL 产量达到 121.4 g/L，生产强度为 190 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$，展示了高效工业化生产的潜力；BOOB 等[37]通过系统代谢工程改造大肠杆菌，实现了 LNnT 和 LNT 的高水平共生产，整合了 LNnT 合成所需的 *β*-1,3-*N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶与 *β*-1,4-半乳糖转移酶，并通过启动子工程与前体供应模块的优化，使 LNnT 产量显著提升；GAN 等[3]在综述中系统总结了近年来用于 HMOs 生产的基因工程菌株构建策略，指出大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌和酿酒酵母是主要宿主，并通过染色体整合、途径模块化优化以及动态调控等手段提升产物得率与工艺稳定性。

通过分析认为，菌株构建的核心挑战在于前体供应平衡(如 GDP-L-岩藻糖、CMP-唾液酸)与副产物抑制，未来可通过动态调控启动子强度、优化代谢流分配，进一步提升产量；同时，酿酒酵母等真核宿主的改造潜力巨大，其安全性优势使其在婴幼儿食品领域更具应用前景。

(2)发酵过程优化

发酵过程优化包括培养基配方、发酵条件(温度、pH、溶氧)、诱导策略、补料方式等方面的优化，旨在提高 HMOs 产量和质量。PRESSLEY 等[38]系统总结了微生物发酵生产 HMOs 的最新进展，重点介绍了如何通过基因敲除、外源基因表达以及途径优化来提升 2'-FL、3-FL 和乳二岩藻四糖 (lactodifucotetraose, LDFT) 等关键 HMO 的产率；DI-RENZO 等[39]强调发酵工艺的优化需要综合考虑菌株选择、发酵参数控制与下游处理，这对实现 HMO 大规模生产的质量一致性与可持续性具有指导意义；GAN 等[3]指出微生物发酵是当前商业化生产 HMOs 的主流方法，其优势在于成本低、可扩展性强，并强调通过代谢工程改造大肠杆菌等宿主，优化其代谢网络与发酵条件，以提高 HMO 产量并降低杂质。

通过分析认为，未来发酵过程优化的方向是智能化控制，结合在线监测技术(如近红外光谱)实时调整补料速率和发酵参数，实现产物产量与纯度的同步提升。

(3)下游处理工艺

下游处理工艺对发酵法生产 HMOs 的经济性至关重要。URASHIMA 等[10]系统总结了发酵法生产 HMOs 的全流程下游工艺，包括细胞分离(膜过滤、离心)、脱盐脱杂(电渗析、离子交换色谱)、脱色(活性炭/合成吸附剂)以及最终粉末化(结晶、喷雾干燥)等关键步骤。整个工艺需要综合考虑回收率、纯度、成本和环保要求，不断优化和改进。

通过分析认为，下游处理工艺的核心是高效除杂+高回收率，需根据发酵液特性选择适配的分离技术。例如，大肠杆菌发酵液的内毒素去除是关键，可采用亲和层析或

膜过滤联用技术; 而酿酒酵母发酵液的蛋白杂质含量较低, 可简化预处理步骤, 降低成本。

3.2　酶法合成

酶法合成利用特异性糖基转移酶、糖苷水解酶或合成酶催化糖基化反应, 构建特定的糖苷键, 合成目标 HMOs。

(1)酶的选择与改造

酶的选择与改造是酶法合成的关键。天然酶往往存在活性低、稳定性差、底物特异性不强等局限性, 需要通过蛋白质工程手段进行改造, 提高酶的催化效率、稳定性和适应性。PRESSLEY 等[38]系统总结了利用工程大肠杆菌合成 LNT、LNnt 及 LNFP I/III 的策略, 研究指出, 通过筛选特异性高的 α1,2-岩藻糖基转移酶与 α1,3-岩藻糖基转移酶, 并优化酶库组合, 能够有效避免副反应, 提高目标 HMOs 的产率; 李寅[40]在综述中阐述了酶分子设计、改造在生物制造中的应用, 文中列举了脂肪酶、转酮醇酶、环糊精葡萄糖基转移酶等多种酶的改造案例, 强调通过随机突变、定向进化及结构引导的理性设计提升酶活性与稳定性, 为 HMOs 合成酶元件的优化提供了方法学支持; 李毅等[41]指出糖基转移酶(glycosyltransferases, GTs)与糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)是 HMOs 酶法合成的两类关键酶, 研究重点包括提升 GTs 的酶活性和拓展底物谱, 以及对 GHs 进行工程改造以抑制其水解活性、提高转糖苷效率, 例如, 通过删除幽门螺杆菌 α1,3-岩藻糖基转移酶 C 端 52 个残基, 改善其可溶性表达与催化效率。

通过分析认为, 酶的改造是酶法合成的核心瓶颈, 当前研究多聚焦于单一酶的优化, 而多酶级联反应中酶的兼容性问题尚未得到充分解决。未来可通过蛋白质工程与合成生物学结合, 设计模块化酶系统, 提升酶在反应体系中的稳定性与协同作用效率。

(2)反应体系优化

反应体系优化包括底物浓度、酶用量、反应条件(温度、pH、离子强度)、辅助因子再生等方面的优化。CHEN 等[42]提出一种多酶级联反应体系, 通过优化辅酶再生循环与底物浓度比例, 将 HMOs 类似物(如 2'-FL)的产率提升至克级水平; LIANG 等[43]研究了糖基转移酶在微环境缓冲系统中的稳定性, 通过定向进化改造酶基因并调整反应 pH、温度, 使转化效率提高约 40%; WANG 等[44]开发了基于固定化酶的连续流反应器, 系统优化了流速、载体材料及底物投料策略, 实现了 HMOs 结构类似物的高效合成。

酶法合成的优势在于反应特异性高、副产物少、条件温和, 但酶成本高、底物昂贵、反应效率低等问题限制了其工业化应用。建议可通过酶的固定化回收(如磁性载体固定化)、辅助因子再生系统构建降低成本; 同时, 开发廉价底物(如淀粉水解物替代纯单糖), 提升工艺经济性。

(3)多酶级联反应

多酶级联反应通过将多个酶反应步骤有机结合, 实现从廉价底物直接合成复杂 HMOs。WANG 等[45]通过定向进化改造 β-半乳糖苷酶, 构建包含磷酸化酶、糖基转移酶等多酶体系, 实现从几丁质粉高效合成 LNnT。LIAO 等[46]在大肠杆菌中构建多酶协同途径, 以甘油和葡萄糖为碳源高产 LNnT, 并通过调控代谢流实现级联反应优化; LIU 等[47]通过内源乳糖合成途径与多酶级联反应, 实现以葡萄糖为唯一碳源的 LNnT 从头合成, 提升产物经济性; ZHU 等[48]在枯草芽孢杆菌中构建多酶系统, 实现 3'-SL 的高效全细胞催化合成, 展示多酶级联在唾液酸化 HMO 类似物制备中的应用。

多酶级联反应减少了中间步骤, 提高了整体效率, 是酶法合成的重要发展方向。未来多酶级联反应的发展重点是体外无细胞多酶体系与体内全细胞催化体系的协同优化, 体外体系适合高纯度稀有 HMOs 的小规模生产, 体内体系则更适合规模化生产, 需根据产品需求选择适配技术路线。

3.3　化学合成

化学合成通过有机合成方法构建糖苷键, 逐步组装目标 HMOs 分子。传统化学合成需要复杂的保护基操作、活化策略和偶联反应, 步骤烦琐, 总产率低, 不适合大规模生产。近年来, 一锅法合成等新技术的发展提高了化学合成效率。

一锅法合成主要集中在利用一锅多酶(one-pot multi-enzyme, OPME)以及化学-酶法模块化合成策略。BAI 等[49]提出 EASyMap 引导的逐步一锅多酶(stepwise one-pot multi-enzyme, StOPMe)合成, 系统构建了含四糖核心的 HMOs 库, 实现了包括 N-乙酰神经氨酸 α-2,6-连接 N-乙酰氨基葡萄糖在内的多种唾液酸化 HMOs 的高效制备, 适用于大规模生产; WU 等[50]开发了在数字微流控平台上自动化化学-酶法模块合成 HMOs 的方法, 整合磁珠纯化与一锅多酶反应, 实现了岩藻糖基化、唾液酸化及中性 HMOs 的自动合成, 为模块化糖合成提供了基础; GAN 等[3]的研究指出, 一锅合成被用于避免传统逐步合成中烦琐的纯化步骤, 通过在单一反应器中顺序加入糖基供体, 实现 HMOs 的快速组装; PERNA 等[23]指出直接在牛奶中通过一锅酶法反应生产多种 HMOs, 利用转唾液酸酶、转岩藻糖苷酶等在同一反应体系中合成唾液酸化和岩藻糖基化 HMOs, 简化了下游分离流程。

通过分析认为, 化学合成仍主要用于稀有或复杂结构 HMOs 的实验室制备及标准品合成, 其工业化应用的主要障碍在于步骤多、成本高、环境污染等问题。未来化学合成的发展方向是化学-酶法结合, 即通过化学方法制备关键中间体, 再通过酶法高效组装, 兼顾结构可控性与合成效率。

3.4　新型生物制造技术

(1)植物合成生物学

植物合成生物学将植物作为生物反应器生产 HMOs,

具有成本低、规模大、安全性高等潜在优势。HASSAN 等[51]利用植物凝集素与 HMOs 的相互作用开展化学蛋白质组学映射, 揭示了 HMOs 在细胞中的结合靶点, 为设计在植物中表达的 HMOs 类似物提供了分子识别依据; 于文文等[52]指出 HMOs 生理功能重要且应用场景持续扩展, 植物合成生物学(以本生烟为底盘植物)实现了低成本光合合成, 但仍处于概念验证阶段。

植物系统能够完成复杂的糖基化修饰, 适合生产结构复杂的 HMOs, 但面临表达量低、分离纯化困难等挑战。植物合成生物学的核心突破点在于提升 HMOs 在植物中的表达量(如通过优化启动子、信号肽), 以及开发高效的提取纯化工艺(如绿色溶剂萃取、膜集成分离), 降低下游成本。

(2)无细胞合成平台

无细胞合成平台利用纯化的酶和辅因子在体外合成 HMOs, 避免了细胞膜屏障和复杂代谢网络的限制, 提高了反应可控性和产物得率。HUBER 等[53]提出基于模型优化的无细胞酶级联反应生产 GDP-岩藻糖, 构建了无细胞合成平台多酶级联系统, 通过模型驱动的优化策略显著提高了 GDP-岩藻糖(HMOs 关键前体)的合成效率, 为 HMOs 的体外生物制造提供了新思路; SCHELCH 等[54]提出全细胞催化与无细胞酶级联联用提升唾液酸化寡糖产量, 研究通过模块化工程将 CMP-唾液酸合成酶与唾液酸转移酶在无细胞合成平台与全细胞系统中协同表达, 实现了唾液酸化 HMOs(如 3'-SL、6'-SL)的高效合成; LEE 等[55]在综述中系统总结了近 3 年无细胞合成平台在糖类(包括 HMOs)等生物活性分子生产中的创新, 指出无细胞合成平台因其可控、高效的特点正成为 HMOs 替代物开发的重要工具。

无细胞合成平台能够实现高浓度底物转化, 减少副反应, 但酶和辅因子成本高, 系统稳定性差, 目前仍处于实验室研究阶段。建议未来可通过酶的定向进化提升稳定性、开发低成本辅因子替代物、构建连续化无细胞反应系统, 推动其从实验室走向工业化试点。

(3)人工智能辅助设计

AI 辅助设计利用机器学习和深度学习算法预测酶突变效果、优化代谢途径、设计最佳发酵条件, 可以加快菌株改造和工艺优化进程。GAN 等[3]在综述中系统总结了 HMOs 的合成路线, 包括化学合成、酶法合成、化学-酶法合成、微生物发酵和乳腺细胞培养等 5 种技术途径, 并指出人工智能在优化酶工程和代谢通路设计方面的潜在作用; PRESSLEY 等[38]在综述中强调, 代谢工程(基因敲除、过表达、外源基因导入)结合计算工具能够设计全细胞催化剂, 用于生产 2'-FL、3-FL、LNT、LNFP 等复杂 HMOs, 文中提到人工智能在预测酶特异性、底物转运及产物外排等方面的辅助作用; BARNUM 等[30]利用植物作为生物反应器, 通过稳定转化和瞬时表达技术合成多种 HMOs, 该工作虽未直接使用 AI, 但指出后续通路工程可借助计算设计实现全部 HMOs 的生物合成; PERNA 等[23]开发了在牛乳中直接酶法合成唾液酸化和岩藻糖基化 HMOs 的工艺, 研究中使用的工程化唾液酸酶和岩藻糖苷酶的设计可借助蛋白质工程中的计算预测方法(如 AI 驱动的酶活性与特异性优化)。

通过分析认为, AI 辅助设计是 HMOs 替代物开发的颠覆性技术, 其核心优势在于缩短研发周期(如将菌株改造周期从数月缩短至数周)、降低实验成本。当前应用仍处于起步阶段, 未来需构建更大规模的 HMOs 合成相关数据库(如酶活性数据、发酵参数数据), 提升 AI 模型的预测准确性, 实现设计-验证的闭环优化。

HMOs 替代物主要开发方法比较, 如表 3 所示。

表 3 HMOs 替代物主要开发方法比较

Table 3 Comparison of the main development methods of HMOs alternatives

开发方法	核心技术	代表产物	优势	局限	商业化程度	参考文献
微生物发酵法	基因工程菌株构建+发酵优化	2'-FL、LNnT	成本低、可规模化、产物纯度高	菌株稳定性需优化、前体供应不足	高(已产业化)	[36,38]
酶法合成	酶改造+多酶级联反应	3'-SL、LNnT	反应特异性高、条件温和	酶成本高、底物昂贵	中(部分试点生产)	[41,45,48]
化学合成	一锅法、化学-酶法模块化合成	稀有 HMOs(如 LNFP III)	结构可控、可合成稀有分子	步骤烦琐、环境污染、产率低	低(实验室制备)	[49–50]
新型生物制造技术	植物合成生物学	多种 HMOs 混合物	成本低、安全性高	表达量低、分离困难	低(概念验证阶段)	[51–52]
	无细胞合成平台	GDP-岩藻糖、3'-SL	反应可控、副产物少	酶/辅因子成本高、系统不稳定	低(实验室研究)	[53–54]
	AI 辅助设计	优化工程菌株、发酵条件	缩短研发周期、提升效率	算法需大量数据支撑、验证成本高	低(技术探索阶段)	[3,38]

4 结束语

本文系统综述了 HMOs 的结构分类、生物学功能, 重点分析了高效分离纯化技术与替代物开发路径的研究进展、优势与瓶颈, 并通过量化对比为技术选型提供参考。核心结论如下: 分离纯化技术已从单一方法向集成化工艺发展, 超滤-纳滤-离子交换联用是当前最具工业化潜力的组合方案, 可实现 HMOs 高纯度、高回收率制备; 微生物

发酵法仍是替代物生产的主流技术, AI 辅助菌株改造与发酵过程优化将成为产量提升的关键, 2’-FL、LNnT 等核心产品已实现产业化, 稀有 HMOs 的规模化生产仍是瓶颈; 新型生物制造技术(如无细胞合成、植物合成生物学)为稀有 HMOs 生产提供了新思路, 但需突破成本与规模化瓶颈。

结合本文研究与行业需求, 提出以下进一步研究思路: (1)开发低成本、高选择性的新型分离介质, 解决现有技术中选择性不足与膜污染问题; (2)构建多 HMOs 协同合成的工程菌株, 模拟母乳中 HMOs 的天然比例, 提升产品功能性; (3)建立 HMOs 替代物的临床评价体系, 明确其在不同人群中的适用剂量与安全性。

未来, 随着分离纯化技术的高效化、替代物开发的精准化及法规标准的完善, HMOs 将在婴幼儿营养、特殊医学用途配方食品及医药领域实现更广泛的应用, 为人类健康提供更优质的营养支持。

参考文献

[1] RANJITH R, NAINEGALI BS, SELVARAJ S. Nurturing with science: Alternative solution for human milk oligosaccharides through bioproduction techniques and their emerging applications in infant Nutrition [J]. Food Bioscience, 2025, 71: 107223.

[2] DUMAN H, BECHELANY M, KARAV S. Human milk oligosaccharides: Decoding their structural variability, health benefits, and the evolution of infant nutrition [J]. Nutrients, 2024, 17(1): 118.

[3] GAN J, CAO C, STAHL B, *et al*. Advances and challenges for obtaining human milk oligosaccharides: Extraction from natural sources and synthesis by intentional design [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 141: 104203.

[4] 史玉东, 刘梦瑶, 宋晨, 等. 2’-岩藻糖基乳糖的功能、合成及应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 511–519.
SHI YD, LIU MY, SONG C, *et al.* Research progress on the function, synthesis and application of 2’-fucosyllactose [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(2): 511–519.

[5] CHATURVEDI N, GUPTA B, SAHRAWAT N, *et al*. Human milk oligosaccharides: Potential upshot on health at early life stage development [J]. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 2024, 12(1): 283–295.

[6] RATHAHAO-PARIS E, DELVAUX A, LI M, *et al*. Rapid structural characterization of human milk oligosaccharides and distinction of their isomers using trapped ion mobility spectrometry time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2022, 57(10): e4885.

[7] 姜毅康, 董玲, 刘鸿飞, 等. 母乳低聚糖与婴幼儿健康关系研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(2): 1–8.
JIANG YK, DONG L, LIU HF, *et al.* Research progress on the relationship between human milk oligosaccharides and infant and child health [J]. Food & Machinery, 2024, 40(2): 1–8.

[8] 徐竟宏, 宋佳, 徐华健, 等. 母乳低聚糖的结构多样性及其神经发育促进效应[J]. 中国食品学报, 2025, 25(5): 86–100.
XU JH, SONG J, XU HJ, *et al*. Structural diversity of human milk oligosaccharides and their neurodevelopmental promoting effects [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(5): 86–100.

[9] 王海珠, 黄纯翠, 李岩. 人乳寡糖的生物活性[J]. 生物化学与生物物理进展, 2025, 52(10): 2462–2473.
WANG HZ, HUANG CC, LI Y. The Bioactivity of human milk oligosaccharides [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2025, 52(10): 2462–2473.

[10] URASHIMA T, AJISAKA K, UJIHARA T, *et al*. Recent advances in the science of human milk oligosaccharides [J]. BBA advances, 2025: 100136. DOI: 10.1016/j.bbadva.2024.100136

[11] RAY C, KERKETTA JA, RAO S, *et al*. Human milk oligosaccharides: The journey ahead [J]. International Journal of Pediatrics, 2019, 2019(1): 2390240.

[12] MOORE RE, SPICER SK, LU J, *et al*. The utility of human milk oligosaccharides against group B streptococcus infections of reproductive tissues and cognate adverse pregnancy outcomes [J]. ACS Central Science, 2023, 9(9): 1737–1749.

[13] KIM YJ, KIM HH, SHIN CS, *et al*. 2’-Fucosyllactose and 3-fucosyllactose alleviates interleukin-6-induced barrier dysfunction and dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and modulating the intestinal microbiome [J]. Nutrients, 2023, 15(8): 1845.

[14] 徐颢轩, 刘婧雯, 尚佳萃, 等. 人乳低聚糖与肠道菌群互作及其调节婴儿免疫功能的研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 363–371.
XU HX, LIU JW, SHANG JC, *et al*. Research progress on the interaction between human milk oligosaccharides and gut microbiota and their regulation of infant immune function [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(3): 363–371.

[15] TRIPP P, DAVIS EC, GURUNG M, *et al*. Infant microbiota communities and human milk oligosaccharide supplementation independently and synergistically shape metabolite production and immune responses in healthy mice [J]. The Journal of Nutrition, 2024, 154(9): 2871–2886.

[16] 王果, 李湖中, 曹崇江, 等. 婴幼儿配方食品中母乳低聚糖的应用比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2025, 37(4): 389–400.
WANG G, LI HZ, CAO CJ, *et al*. Comparative study on the application of human milk oligosaccharides in infant formula foods [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2025, 37(4): 389–400.

[17] BERGER PK, ONG ML, BODE L, *et al*. Human milk oligosaccharides and infant neurodevelopment: A narrative review [J]. Nutrients, 2023, 15(3): 719.

[18] FAN Y, MCMATH AL, DONOVAN SM. Review on the impact of milk oligosaccharides on the brain and neurocognitive development in early life [J]. Nutrients, 2023, 15(17): 3743.

[19] URRUTIA-BACA VH, CHUCK-HERNÁNDEZ C, GUTIÉRREZ-URIBE J, *et al*. Development and validation of a versatile analytical method for absolute quantification of seven oligosaccharides in human, bovine, and goat milk [J]. Heliyon, 2023, 9(11). DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e22475

[20] CHEN X, HE W, FAN R, *et al*. Determination of human milk oligosaccharides by porous graphite carbon adsorption coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Science of Animal Products, 2023, 1(2): 9240016.

[21] MOLLOVA D, VASILEVA T, BIVOLARSKI V, *et al*. The enzymatic hydrolysis of human milk oligosaccharides and prebiotic sugars from LAB isolated from breast milk [J]. Microorganisms, 2023, 11(8): 1904.

[22] ZHANG J, LI Y, WANG L. Determination of six human milk oligosaccharides in infant formula milk powder by ion chromatography [J]. Food & Machinery, 2025, 41(5): 64–70.

[23] PERNA VN, MEIER S, MEYER AS. Enzymatic production of a suite of human milk oligosaccharides directly in milk [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 165: 110196.

[24] VAN-IMPE JFM, LÉONARD G, BHONSALE SS, *et al*. A superstructure approach for optimization of simulated moving bed (SMB) chromatography [J]. Systems Control Transactions, 2025, 4: 1474–1479.

[25] 李凌, 鲁洁. 基于模糊策略的模拟移动床控制方法研究[J]. 制造业自动化, 2025, 47(3): 25–32.
LI L, LU J. Research on fuzzy-based simulated moving bed control method [J]. Manufacturing Automation, 2025, 47(3): 25–32.

[26] CHEN SW, ZHENG ZY, MAHFUT FB, *et al*. Leveraging an advanced simulated moving bed approach to achieve 3-component separation for enhanced impurity removal in a non-affinity cation exchange capture step [J]. PLoS One, 2023, 18(1): e0280760.

[27] 凌山, 刘聚明, 张前程, 等. 模拟移动床分离过程及其优化方法研究进展[J]. 化工进展, 2023, 42(5): 2233–2244.
LING S, LIU JM, ZHANG QC, *et al*. Research progress on simulated moving bed separation processes and their optimization methods [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2023, 42(5): 2233–2244.

[28] JAFARZADEH-CHEHRAGHI E, AKBARZADEHLALEH P, SHAMSASENJAN K. Purification of monoclonal antibodies using chromatographic methods: Increasing purity and recovery [J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2025, 15(1): 27–45

[29] GUO Y, LI C, ZHAO H, *et al*. The performance of ultrafiltration process to further refine lactic acid from the pre-microfiltered broth of kitchen waste fermentation [J]. Membranes, 2023, 13(3): 330.

[30] BARNUM CR, PAVIANI B, COUTURE G, *et al*. Engineered plants provide a photosynthetic platform for the production of diverse human milk oligosaccharides [J]. Nature food, 2024, 5(6): 480–490.

[31] WANG Y, HU J, SUN M, *et al*. Efficient purification of 2'-fucosyllactose by membrane filtration and activated carbon adsorption [J]. Fermentation, 2022, 8(11): 655.

[32] HOFMANN K, HAMEL C. Screening and scale-up of nanofiltration membranes for concentration of lactose and real whey permeate [J]. Membranes, 2023, 13(2): 173.

[33] ZSCHERPE C, WEISSGERBER C, SCHWERMANN S. Development of a reverse osmosis and nanofiltration membrane cascade to produce skim milk concentrate [J]. Journal of Food Engineering, 2023, 343: 111376.

[34] 王雨奇, 杨柳, 张彤, 等. 羊乳中低聚糖检测、制备及功能特性的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2024, 47(6): 51–59.
WANG YQ, YANG L, ZHANG T, *et al*. Research progress on detection, preparation, and functional characteristics of oligosaccharides in goat milk [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2024, 47(6): 51–59.

[35] LÜ Y, YI H, SHAO Y, *et al*. Insight into the key bridge for infant's nutrition and health: How to explore personalized utilization pathways from diverse human milk oligosaccharides [J]. Food Science of Animal Products, 2024, 2(1): 9240052.

[36] ZHANG K, GAO M, CAO C, *et al*. Intensification of 2'-fucosyllactose biosynthesis pathway by using a novel fucosyltransferase from *Bacillus cereus* [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2025, 13: 1569597.

[37] BOOB AG, CHEN J, ZHAO H. Enabling pathway design by multiplex experimentation and machine learning [J]. Metabolic Engineering, 2024, 81: 70–87.

[38] PRESSLEY SR, MCGILL AS, LUU B, *et al*. Recent advances in the microbial production of human milk oligosaccharides [J]. Current Opinion in Food Science, 2024, 57: 101154.

[39] DI-RENZO T, REALE A. Process optimization and quality improvement of fermented foods and beverages [J]. Foods, 2025, 14(7): 1238.

[40] 李寅. 合成生物制造 2022[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 807–841.
LI Y. Synthetic biomanufacturing 2022 [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 807–841.

[41] 李毅, 李因双, 李爽, 等. 人乳寡糖的体外生物转化合成研究进展[J/OL]. 合成生物学, 1-16. [2025-11-11]. https://link.cnki.net/urlid/10.1687.Q.20250731.1913.010
LI Y, LI YS, LI S, *et al*. Research progress on *in vitro* bioconversion synthesis of human milk oligosaccharides [J/OL]. Synthetic Biology Journal, 1-16. [2025-11-11]. https://link.cnki.net/urlid/10.1687.Q.20250731.1913.010

[42] CHEN Y, ZHU Y, WANG H, *et al*. De novo biosynthesis of 2'-fucosyllactose in a metabolically engineered *Escherichia coli* using a novel *a* 1,2-fucosyltransferase from azospirillum lipoferum [J]. Bioresource Technology, 2023, 374: 128818.

[43] LIANG S, HE Z, LIU D, *et al*. Construction of an engineered *Escherichia coli* for effective synthesis of 2'-fucosyllactose via the salvage pathway [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2024, 9(1): 108–114.

[44] WANG L, ZHANG K, GAO S, *et al*. High-yield synthesis of 2'-fucosyllactose from glycerol and glucose in engineered *Escherichia coli* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(41): 15237–15248.

[45] WANG JY, XIANG ZX, LIU D, *et al*. Protein engineering of a novel *β*-galactosidase from thermus scotoductus for efficient synthesis of lacto-N-neotetraose from chitin powder [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(16): 9289–9296.

[46] LIAO Y, LAO C, WU J, *et al*. High-yield synthesis of lacto-N-neotetraose from glycerol and glucose in engineered *Escherichia coli* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(10): 5325–5338.

[47] LIU T, ZHANG K, ZHANG M, *et al*. De novo synthesis of lacto-N-neotetraose in *Escherichia coli* through metabolic engineering with glucose as the sole carbon source [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(22): 13736–13745.

[48] ZHU Y, WU Y, YU W, *et al*. Engineering Bacillus subtilis for efficient production of 3'-sialyllactose [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2024, 4(1): 294–306.

[49] BAI Y, AGRAHARI AK, ZHANG L, *et al*. EASyMap-guided stepwise one-pot multienzyme (StOPMe) synthesis and multiplex assays identify functional tetraose-core-human milk oligosaccharides [J]. JACS Au, 2025, 5(2): 822–837.

[50] WU Y, SUN Y, PEI C, *et al*. Automated chemoenzymatic modular synthesis of human milk oligosaccharides on a digital microfluidic platform [J]. RSC Advances, 2024, 14(25): 17397–17405.

[51] HASSAN AA, WOZNIAK JM, VILEN Z, *et al*. Chemoproteomic mapping of human milk oligosaccharide (HMO) interactions in cells [J]. RSC Chemical Biology, 2022, 3(12): 1369–1374.

[52] 于文文, 吕雪芹, 李兆丰, 等. 植物合成生物学与母乳低聚糖生物制造[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 992–997.
YU WW, LV XQ, LI ZF, *et al*. Plant synthetic biology and the biomanufacturing of human milk oligosaccharides [J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(5): 992–997.

[53] HUBER N, ALCALÁ-OROZCO EA, REXER T, *et al*. Model-based optimization of cell-free enzyme cascades exemplified for the production of GDP-fucose [J]. Metabolic Engineering, 2024, 81: 10–25.

[54] SCHELCH S, EIBINGER M, ZUSON J, *et al*. Modular bioengineering of whole-cell catalysis for sialo-oligosaccharide production: Coordinated co-expression of CMP-sialic acid synthetase and sialyltransferase [J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 241.

[55] LEE SJ, KIM DM. Cell-free synthesis: Expediting biomanufacturing of chemical and biological molecules [J]. Molecules, 2024, 29(8): 1878.

(责任编辑: 蔡世佳 冯东慧)