

观点

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-020

生物制造的PE值与PX值：定义与应用

张以恒^{1,2}, 陈雪梅², 韩平平^{1,2}

(¹ 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津 300308; ² 中国科学院天津工业生物技术研究所, 体外合成生物学中心, 天津 300308)

摘要: 生物制造是战略新兴产业的典型代表, 是生物经济的新质生产力。作者曾提出“道法术器”对工业生物制造的哲学指导意义。为进一步阐述生物制造中“术以立策”的原则, 本文首次提出衡量生物催化剂(即“术”)水平的关键经济指标——PE值(product-to-enzyme ratio)与PX值[product-to-X (cell) ratio]。这两个指标具有简单、透明且量化的属性。PE值表示产品与非细胞催化剂(酶分子或多酶分子机器, 以下简称“多酶机器”)的质量比值, 也可通过技术指标总转换数(total turn-over number, TTN)计算其理论值。PX值应用于细胞工厂发酵, 表示产品与细胞催化剂的质量比。基于PE值与PX值, 可以快速估算不同生物制造过程中的生物催化剂成本, 进而指导降低降本增效的关键路径。作者汇总了生物制造的产业案例及文献数据, 展示了酶分子及多酶分子机器PE值、细胞工厂PX值的特点。研究表明, 淀粉酶水解淀粉的PE值是纤维素酶水解纤维素的50~100倍; 在固态纤维素水解过程中, 纤维素酶的超大用量是非粮生物质糖化与利用的最大经济障碍。最后, 本文探讨了PE值的技术改进路径, 特别是多酶共固定技术的潜力, 并明确了工业酶皇冠——纤维素酶研究的新方向。PE值与PX值的分析将为生物制造战略新兴产业的发展提供全新的视角, 深化了对生物制造中关键“芯片”——生物催化剂成本的理解, 为未来技术的发展提供重要参考与指导。

关键词: 生物制造; PE值; PX值; 道法术器; 多酶分子机器

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

PE and PX values in biomanufacturing: definitions and applications

ZHANG Yi-Heng P. Job^{1,2}, CHEN Xuemei², HAN Pingping^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; ² In vitro Synthetic Biology Center, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: Biomanufacturing is one of the representatives of strategic emerging industries and represents a new quality productive force for the upcoming bioeconomy. The authors used to propose the philosophical guiding

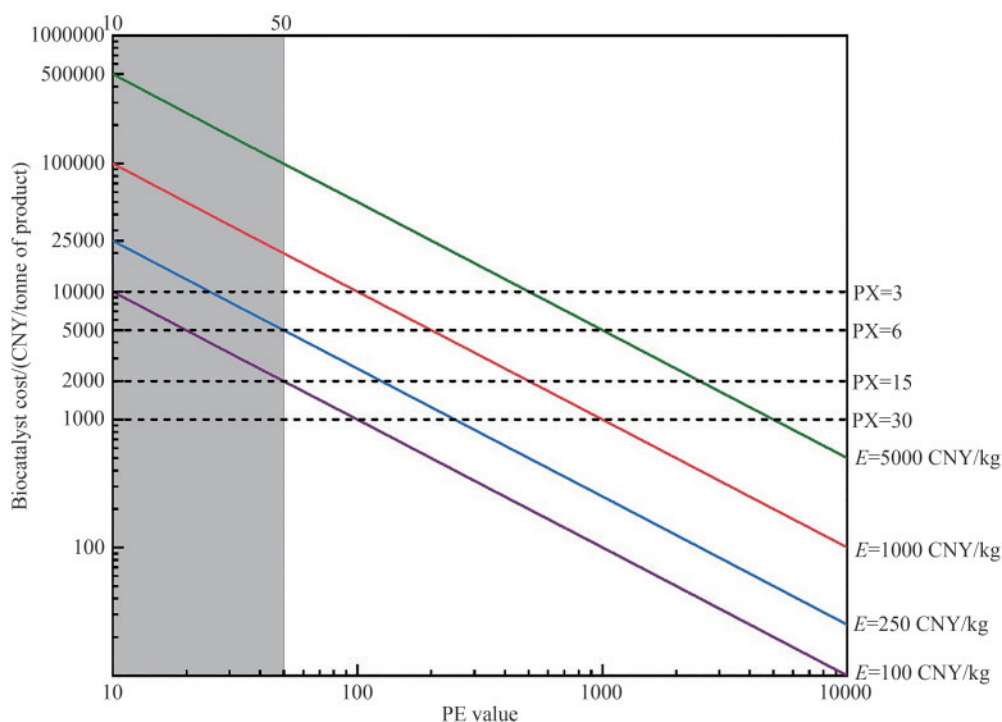
收稿日期: 2025-03-20 修回日期: 2025-04-29

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项(2022YFA0912300); 国家自然科学基金面上项目(NSFC32271544); 合成生物学海河实验室颠覆性创新项目(22HHSWSS000155); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-CXRC-067)

引用本文: 张以恒, 陈雪梅, 韩平平. 生物制造的PE值与PX值: 定义与应用[J]. 合成生物学, 2025, 6(4): 715-727

Citation: ZHANG Yi-Heng P. Job, CHEN Xuemei, HAN Pingping. PE and PX values in biomanufacturing: definitions and applications[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(4): 715-727

significance of “Tao-Fa-Shu-Qi” for industrial biomanufacturing. To further elaborate on the principle of “Shu is techniques” in biomanufacturing, for the first time this opinion paper introduces the new concepts of “Product-to-Enzyme Ratio” (abbreviated as PE value) that is the weight ratio of the product to the non-cell biocatalysts (i.e., enzyme (s)), such as enzyme molecules and multiple-enzyme molecular machines, and of “Product-to-X(Cell) Ratio” (abbreviated as PX value) that is the weight ratio of the product to cell mass. Both values feature simple, clear and quantitative properties. The PE value can be applied to enzyme-based biocatalysis or *in vitro* biotransformation; PX value can be applied to cell-based fermentation. Theoretical PE values can be calculated from total-turn-over number (TTN) of enzyme. First, the author defines and calculates the PE value. Second, authors summarize and classify industrial biomanufacturing cases and literature data catalyzed by enzymes, multiple-enzyme molecular machines, and cells. It was found that enzymatic starch-hydrolyzing enzymes has a PE value 50–100 times of that of enzymatic cellulose hydrolysis, resulting in an extremely high cellulase dosage. This ultra-high enzyme cost is the biggest obstacle to the industrialization of the second-generation biorefineries that are based on the biological conversion and utilization of lignocellulosic biomass. Lastly, the PE/PX values can be used to quickly estimate and compare the costs of biocatalysts, such as enzyme molecules, multiple-enzyme molecular machines, and microbial cells in the biomanufacturing process, guiding the development path for further decreasing the cost of biocatalysts. Increasing PE values by enzyme (co-)immobilization could greatly decrease biocatalyst costs, surpassing cell-based fermentation. Cellulase could be the largest industrial enzyme with a potential market size of 500 billion RMB by considering the huge supplies of non-food lignocellulosic biomass and potential markets of renewable biocommodities and artificial food/feed. The calculation and analysis of the PE/PX values would provide a new perspective for the future development of the strategic emerging industry of biomanufacturing, deepen the understanding of the cost of biocatalysts in biomanufacturing, promote the high-quality development of the bioeconomy, predict the future cost trend of biological products, and evaluate the industrialization potential of emerging biotechnologies.



Keywords: biomanufacturing; PE value; PX value; Tao-Fa-Shu-Qi; multiple-enzyme molecular machine

1 背景

生物制造是基于生命科学与生物技术，利用生物体（如植物、动物、微生物、细胞工厂、酶分子、多酶机器等）的机能进行物质加工与合成以及能源转换的绿色生产方式，将广泛赋能能源、医药、健康、食品、材料、农业、林业等产业，推动生物经济高质量发展^[1-4]。

2024年，作者提出应用中国哲学的“道法术器”思想“道以明向，法以立本，术以立策，器以成事”，阐明顶层设计对工业生物制造的哲学指导意义^[5]。2025年，为深入阐释生物制造领域中“法以立本”的精髓，作者提出了“市本率（PC值）”新方法学工具，将产品价格与原料成本的比值作为量化指标，以从市场角度更直观地理解生物制造产品的分类，预测技术演进趋势与产业化前景，为生产要素的创新配置提供战略指导^[6]。

为深入阐述生物制造中“术以立策”的原则，本文进一步提出PE值（product-to-enzyme ratio）与PX值 [product-to-X (cell) ratio] 新概念，利用该量化指标，可以快速分析生物制造过程中生物催化剂（如酶分子、多酶机器，细胞工厂）的成本，并为生物制造路径的选择与发展提供重要决策参考。

2 PE值、PX值的定义与应用

2.1 PE值与PX值的定义

对于基于非细胞（酶）催化的生物制造，作者提出一个新评估指标——PE值（product-to-enzyme ratio），即产品与非细胞催化剂（酶）质量的比值，计算公式如下：

$$PE = \frac{\text{产品质量}}{\text{非细胞催化剂质量}} = \frac{\text{产品质量}}{\text{单酶(多酶)/多酶分子机器质量}} \quad (1)$$

式中，非细胞催化剂包括酶催化中的单酶分子、混合酶或级联多酶分子，以及体外生物转化（*in vitro* biotransformation, ivBT）中的多酶分子机器^[4, 6]，这些催化剂以游离或固定化、细胞裂解液

或纯化形式存在。为便于讨论，本文将固定化酶的PE值又称为PiE值（product-to-immobilized-enzyme ratio）。简单来说，PE值或PiE值表示每千克非细胞催化剂在其生物制造周期中能够生产目标产品的质量（千克）。

在工业酶领域，长期习惯采用酶活单位（U）作为催化活性及发酵水平的关键参数，比如体积酶活（U/mL）或比酶活（U/mg），而避免直接使用酶（蛋白质）质量（mg）作为指标，其内在原因是酶质量容易受到不同蛋白质测量方法的影响，还可能存在人为因素干扰，如额外添加杂蛋白或者含氮化合物（如尿素、三聚氰胺等），或诱发菌体自发裂解等。然而，酶活虽能反映特定工业酶的固有性质，可作为酶发酵的技术评估指标，难以成为一个通用参数来关联酶制造成本，无法作为生物制造中不同品种酶的横向评估指标。

PE值以酶（蛋白质）质量作为关键参数。一方面，工业上制备分泌酶或胞内酶，其生产成本客观且可量化，目前一般为每千克酶干重100~1000元^[1, 7-8]；另一方面，产品与酶的质量比值可综合反映酶催化效率与使用寿命，PE值越高，显然酶用量越少。可见，利用PE值能够简单估算生物制造过程中用酶成本，进而透明、高效地衡量生物制造实际水平。

PE值也可扩展到细胞催化（细胞工厂发酵）生物制造的真实评估，即PX值 [product-to-X (cell) ratio]，定义为产品与细胞的质量比值，计算公式如下：

$$PX = \frac{\text{产品质量}}{\text{细胞质量}} = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} \quad (2)$$

当发酵过程中细胞不被循环使用，PX值可以简化为产品浓度与细胞干重浓度的比值；PX值也可通过产品得率 $Y_{p/s}$ （产品质量/碳源消耗量）与细胞得率 $Y_{x/s}$ （细胞干重/碳源消耗量）的比值计算而得，二者均为细胞工厂研究中衡量碳源利用的关键参数，相关数据可在生化工程的经典教科书中查阅^[9-10]。

2.2 PE值与TTN值的转换

酶的总转化数TTN（total turn-over number）是评估酶在理想条件下效率与稳定性的重要指标，

表示在酶失活前能够催化底物转化为产物的总次数。TTN值的简单估算公式如下^[11]:

$$TTN = \frac{k_{cat}}{k_d} \quad (3)$$

式中, k_{cat} 为酶催化常数, 即转化数 (turn-over number), 可以理解为1个酶分子在1s内转化底物获得目标产物的分子数, s^{-1} ; k_d 为酶失活常数, 用于描述酶在催化过程中失去活性的速率, s^{-1} 。

本文提出的PE理论值可与TTN建立简单换算关系, 如下:

$$PE = TTN \times \frac{MW_p}{MW_e} \quad (4)$$

式中, MW_p 为目标产品分子量; MW_e 为酶(单体)分子量。

可见, PE值与酶的催化活性、稳定性成正比, 酶催化效率越高, 失活速度越慢, 固定化工艺越优, 持续稳定催化次数越多, 则PE值越高。

2.3 生物制造的生物催化剂成本

与生物制造领域常用的酶活单位、底物转化率、产品得率和细胞得率等指标相比, PE值与PX值应用上的突出优势在于能够简便地估算生物催化剂成本, 具有较强的产业实用价值。

对于非细胞催化剂的生物制造而言, 工业酶成本至关重要。常见的生物制造方法包括: ①天然酶提取, 如从动物或植物中提取牛胃凝乳酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等; ②遗传修饰微生物发酵产天然酶, 典型代表如谷氨酰胺转氨酶

(TG酶); ③分泌酶表达, 常用表达底盘主要包括遗传修饰枯草芽孢杆菌、毕赤酵母、马克斯克鲁维酵母及丝状真菌(如里氏木霉、黑曲霉等); ④胞内酶表达, 常用表达宿主如遗传修饰大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞、植物细胞等。随着合成生物学与生物制造技术的快速发展, 监管体系日趋科学规范, 遗传修饰微生物表达分泌酶或胞内酶, 凭借其生长周期短、产量高、受时间和空间限制小、生产成本低、提取方便等优势, 已成为工业酶制造领域的重要平台。

表1展示了利用微生物发酵生产分泌酶与胞内酶的差异。分泌酶典型代表为淀粉液化酶、糖化酶、蛋白酶、纤维素酶、植酸酶等水解酶, 占据了工业酶的最大市场, 通过筛选宿主细胞, 优化信号肽及改进培养条件等策略, 可显著提高目标蛋白质的分泌效率和产量, 酶制备成本低至100元/kg酶干重^[1, 7-8]; 然而, 受限于酶分子内在性质, 以及基因操作相对复杂, 表达不确定性高, 分泌表达系统对大多数胞内代谢相关酶并不适用。胞内酶典型代表为木糖异构酶、核酸酶等, 制造成本约为250~1000元/kg酶干重^[1, 7-8], 且胞内表达系统更为普适于大多数酶分子。目标酶(蛋白)表达水平达到5~10 g/L可视为分泌酶与胞内酶表达体系选择的阈值: 当目标蛋白表达水平高于该阈值, 分泌酶表达体系具有规模化生产与成本效益的明显优势; 而表达水平低于该阈值时, 胞内表达体系则因其技术简单、易于操作, 也是适宜的选择。

表1 工业酶的分泌与胞内表达生产方法比较

Table 1 Comparison of production methods for industrial enzymes: secretion versus intracellular expression

比较内容	分泌酶	胞内酶
代表性菌	毕赤酵母、里氏木霉、枯草芽孢杆菌、黑曲霉	大肠杆菌、枯草芽孢杆菌
代表性酶制剂	植酸酶、纤维素酶、木聚糖酶、蛋白酶、液化酶、糖化酶、脂肪酶、果胶酶、漆酶等	木糖异构酶、核酸酶、SOD、甲酸脱氢酶、醇脱氢酶等
蛋白表达水平	200 g/L(最高), 一般在10~50 g/L左右	5~10 g/L(最高), 大多数在1~5 g/L左右
蛋白制造成本 ^[1, 7-8]	约100元/kg酶干重	约250~1000元/kg酶干重
酶分离难易程度	容易, 低成本	比较贵
目标酶	有限制, 与底盘细胞的分泌同源酶序列高度相似	普适性
技术难点	基因操作难, 要长期(几年以上)系统优化	基因操作相当容易
蛋白表达的比喻	牛产奶	杀牛产肉

图1(实线)示例性提供了基于4种酶制备成本, PE值随技术改进而提升, 酶用量则相应下降, 结果显示生物催化剂成本可在极宽范围内不断降低, 例如市场上成熟应用的淀粉酶、固定化葡萄糖异构酶PE值均高达5000以上, 催化剂成本在生物制造全成本中的占比几乎可以忽略不计。

对于细胞工厂发酵的生物制造, 按照大规模工业发酵经验, 发酵成本可依据工业发酵培养基中最大成分——碳源的消耗来测算, 具体可拆分为两部分: 生物催化剂(细胞工厂, 消耗碳源用于细胞本身的生长), 以及发酵获得产品(消耗碳源用于产物合成)。其中, 作为生物催化剂的细胞制备成本约为10元/(m³·OD), 当细胞干重浓度(DCW)为1kg/m³时, 细胞制备成本可视为30元/kg(3OD=1kgDCW/m³), 主要包括碳源、氮源以及

动力成本。我们可以合理假设发酵用细胞催化剂成本的4个典型示例(图1虚线): ①一般水平, 20m³发酵液可生产1吨产品, 即产品浓度50g/L, 细胞干重浓度为16.7g/L, 即PX值为3, 计算可知细胞催化剂成本为10000元/吨产品; ②优秀水平, 产品浓度提升至100g/L, 细胞干重浓度维持16.7g/L, PX值提升到6, 则细胞催化成本下降至5000元/吨产品; ③极优秀水平, 产品浓度维持100g/L, 细胞干重浓度下降到6.7g/L, PX值达到15, 细胞催化成本可下探到2000元/吨产品; ④产品浓度达到200g/L, 细胞干重浓度维持6.7g/L, PX值提升到30, 细胞催化成本低至1000元/吨产品, 这显然属于极高水平的微生物发酵, 大多数基于细胞工厂的生物制造难以企及该指标(表2)。

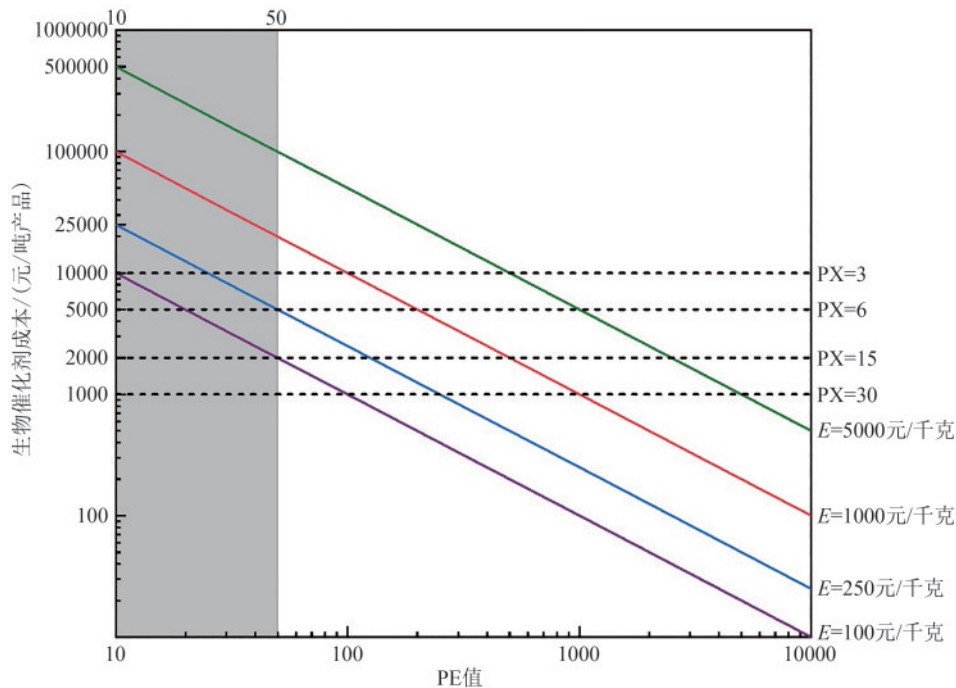


图1 微生物发酵与体外生物转化(ivBT)的生物催化剂成本

[x轴—PE值, 计算公式为: PE=产品质量/酶干重; y轴—生物催化剂成本(元/吨产品), 即细胞催化剂成本或酶成本; 虚线—细胞催化剂成本(元/吨产品), 计算公式为: 细胞催化剂成本=细胞制备成本/PX, 其中虚线由上至下PX值分别为3、6、15、30, 细胞制备成本为30元/kg; 实线—酶成本(元/吨产品), 计算公式为: 酶成本=酶制备成本/PE, 其中实线由上至下酶制备成本(E)分别为5000元/kg、1000元/kg、250元/kg、100元/kg]

Fig. 1 Biocatalyst costs of microbial fermentation and *in vitro* biotransformation (ivBT)

[X-axis-PE value, calculated as: PE = product mass/enzyme dry weight. Y-axis-Biocatalyst cost (CNY/tonne of product), referring to either the cell cost or enzyme cost. Dashed line-Cell cost (CNY/tonne of product), calculated as: Cell cost = Cell preparation cost×1000 (kg/tonne)/PX, where PX values are 3, 6, 15, and 30 (top to bottom), and the cell preparation cost is 30 CNY/kg dry cell weight. Solid line-Enzyme cost (CNY/tonne of product), calculated as: Enzyme cost = Enzyme preparation cost×1000 (kg/t)/PE, where enzyme preparation costs (E) are 5000, 1000, 250, and 100 CNY/kg (top to bottom).]

表2 细胞工厂生物制造代表性产品的PX值现状
Table 2 Current PX values for representative products in cell factory biomanufacturing

产物	细胞工厂	PX值
重组蛋白	大肠杆菌	0.1~0.2
全蛋白(可食用)	SCP生产菌	0.4~0.65
α -淀粉酶	枯草芽孢杆菌	0.5~2
糖化酶	黑曲霉	0.5~2
植酸酶	毕赤酵母	1
青霉素	产黄青霉	1~2
蛋白酶	枯草芽孢杆菌	1~3
丁二酸	大肠杆菌	2~3
纤维素酶	里氏木霉	2~4
赖氨酸	大肠杆菌	2~4
谷氨酸	谷氨酸棒杆菌	3~4
乙醇	酿酒酵母	5~10
乳酸	大肠杆菌	5~10
柠檬酸	黑曲霉	8~10
L-丙氨酸	大肠杆菌	约10

进一步对比非细胞、细胞的生物催化剂成本(图1),整体可见,对适合非细胞催化的特定产品而言,其催化剂成本的下降潜力明显高于细胞催化剂。以作者研发团队建立的体外生物转化(ivBT)平台多酶机器制备成本250元/kg为例,当PE值为10时,ivBT生物催化剂成本为25000元/吨产品;当PE值提升至25时,ivBT制造成本即优于一般细胞工厂(10000元/吨产品);当PE值大于50时,大多数细胞工厂的发酵技术(5000元/吨产品)则难以与其竞争。预测对于PC值在5~20之间的增值产品^[6],PE值达到10~50区间,将是ivBT技术产业化的关键阈值。

2.4 PE值与PX值的典型案例

基于生物制造产业案例及文献数据,汇总了酶分子、多酶机器、细胞工厂的PE值实际数据[式(1)]、PE值理论数据[式(4)]以及PX值实际数据[式(2)],可帮助分析技术特点及应用前景(表3)。显然,PE值实际数据一定小于理论数据,因为在产业上,通常不会通过延长生产时间来榨取酶的全生命周期催化能力。

PE值影响因素包括酶的固有性质,如催化反应类型、来源、催化活性、稳定性等,也包括酶

制剂的形式,如用酶的数量及组合方式、固定化工艺等。高 k_{cat} 、低 k_d 酶的TTN值及PE理论值较高,如D-塔格糖-3-差向异构酶、木糖异构酶、青霉素G酰胺酶等;固定化技术可以大幅提高酶的稳定性,即降低 k_d 值,进而提升PE值10~100倍,显著降低工业化生产成本。

对于混合酶(多酶级联、多酶机器)催化,如多酶或ivBT中的多酶机器,其PE值相较单酶偏低,主要原因包括:①混合酶中单个酶的 k_{cat} 、 k_d 值不同,每一步均可能成为限速步骤,中间产物浓度低导致下游酶无法发挥最大催化能力;②混合酶的 k_d 值必然取决于其中最不稳定的酶;③酶活性位点的空间排布可能相互制约,且各步骤热力学的匹配可能降低催化效率,整体上也导致TTN降低。多酶机器催化技术处于技术发展初期,有着巨大改进空间,如2019年ivBT技术实现第一个肌醇产业落地,游离的多酶机器以淀粉原料合成肌醇,其实际PE值约为13,但新技术已能够凭借显著的成本优势,助力公司从零起步,快速占据全球市场超50%的份额;目前二氧化碳人工合成淀粉PE值为1,预期未来PE值将很快提升到超过100。

细胞工厂产品丰富,包括初级代谢产物(如乙醇、氨基酸、有机酸等)、次级代谢产物(如抗生素等)以及生物大分子(如工业酶、重组蛋白)。作者结合产业实际,梳理了相关PX值(表2)。胞内产品的PX值通常小于1,难以进一步提升;分泌产品,如初级代谢产物、青霉素、分泌酶等,PX值一般可超过1,但难以突破20,仍远低于非细胞催化的PE值。究其原因,细胞工厂包括几千个酶、DNA、RNA与细胞膜等,只有约5~20个酶与目标产品的制造有关;利用纯的酶分子或多酶机器进行制造,将大幅减少与生物制造无关的酶、核酸与细胞膜等细胞成分的质量,故而PE值可提高2~3个数量级。对于微生物发酵生产的产品而言,开发高PX值产品的细胞工厂是降低生物催化剂成本的重要途径,关键策略之一是以厌氧发酵替代好氧发酵^[6, 38],以及菌体循环或固定化使用^[39-40]。

特别需要指出,PE值虽是一个简洁的量化分析工具,但其适用于纯酶,如涉及载体、保护剂、稳定剂等其他助剂,因其材料种类、配比、价格

表3 酶催化生物制造代表性产品的PE值现状

Table 3 Current PE values for representative products in enzyme-catalyzed biomanufacturing

酶类别	酶名	底物	产物	酶形式	酶数量	k_{cat}/s^{-1}	k_d/s^{-1}	TTN	MW _P /Da	MW _E /kDa	PE值 ^① (理论)	PE值 ^② (实际)	参考 文献
异构酶	葡萄糖磷酸 异构酶	果糖-6-磷酸	葡萄糖-6-磷酸	游离	1	2765	8.0×10^{-5}	$3.4E \times 10^7$	260.14	48	1.9×10^5	NA	[12]
				固定化	1	2198	1.0×10^{-6}	2.2×10^9	260.14	67	8.4×10^6	NA	[12]
	D-塔格糖-3- 差向异构酶	D-果糖	D-阿洛酮糖	游离	1	55.1	1.7×10^{-4}	3.3×10^5	180	33	1.8×10^3	NA	[13]
				固定化	1	93.4	3.9×10^{-5}	2.4×10^6	180	33	1.3×10^4	1000	[13]
	木糖异构酶	D-葡萄糖	D-果糖	游离	1	30	7.7×10^{-6}	3.9×10^6	180	46	1.5×10^4	NA	[14]
				固定化	1	27	1.0×10^{-6}	2.7×10^7	180	46	1.1×10^5	1.0×10^5	[15]
水解酶	青霉素G 酰胺酶	青霉素G	6-氨基青霉烷酸	游离	1	44.6	1.1×10^{-4}	4.0×10^5	216.25	88	9.8×10^2	NA	[16- 17]
				固定化	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	600	[16, 18]
	脂肪酶	油脂+醇类	脂肪酸酯	游离	1	500	4.1×10^{-5}	1.2×10^7	250	43	6.9×10^4	150	[16, 19]
				固定化	1	NA	NA	NA	NA	NA	1000~ 5000	[16]	
异构酶	核糖磷酸 异构酶	核酮糖- 5-磷酸	核糖-5-磷酸	游离	1	540	2.7×10^{-6}	2.0×10^8	230.1	15.9	2.9×10^6	NA	[20]
	葡萄糖磷酸 变位酶	葡萄糖- 1-磷酸	葡萄糖-6-磷酸	游离	1	190	2.7×10^{-6}	7.1×10^7	260.14	64.9	2.8×10^5	NA	[21]
水解酶	果糖-1,6- 二磷酸酶	果糖-1,6- 二磷酸	果糖-6-磷酸	游离	1	8.57	1.4×10^{-7}	5.9×10^7	260.14	28	5.5×10^5	NA	[22]
	β -糖苷酶	纤维二糖	葡萄糖	游离	1	208	3.5×10^{-5}	6.0×10^6	180	62.78	1.7×10^4	NA	[23]
氧化 还原酶	肉桂醇 脱氢酶	肉桂醇	肉桂醛	游离	1	18	2.00×10^{-3}	9.0×10^3	132.159	80	15	NA	[24]
	氢酶	H ⁺	氢气	游离	1	1030	2.7×10^{-6}	3.9×10^8	2	110	7.0×10^3	NA	[25]
	胺脱氢酶	NAD ⁺	NADH	游离	1	167	1.1×10^{-6}	1.5×10^8	663.43	45	2.1×10^6	NA	[26]
	6-磷酸葡萄 糖酸脱氢酶	葡萄糖-6- 磷酸	6-磷酸葡萄糖酸	游离	1	325	1.4×10^{-6}	2.4×10^8	495.3	53	2.2×10^6	NA	[27]
转移酶	转醛缩酶	果糖-6-磷酸, 赤藓糖- 4-磷酸	景天糖-7-磷酸	游离	1	22.3	1.5×10^{-5}	1.5×10^6	290.16	24	1.8×10^4	NA	[28]
混合酶	伊沙替韦酶	2-乙酰甘油	伊沙替韦	游离	9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	[29]
	PHB合成	淀粉	PHB	游离	19~20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	[30]
	合成淀粉多 酶机器	CO ₂ +H ₂	合成淀粉	游离	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	[31]
	单萜烯酶	葡萄糖	单萜烯	游离	27	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	[32]
	肌醇多酶 机器	淀粉	肌醇	游离	4~6	1.1	2.0×10^{-5}	5.5×10^4	180	50	196	13	[33]
				固定化	4~6	1.2	3.5×10^{-6}	3.4×10^5	180	50	1242	60~80	[34]
	D-塔格糖多 酶机器	淀粉	D-塔格糖	游离	5~6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	35	[35]
				固定化	4~6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	103	[35]
纤维素酶 (混合)	(预处理) 生物质	D-葡萄糖	游离	3~10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	50~100	[36- 37]	
淀粉酶 (混合)	(糊化) 淀粉	D-葡萄糖	游离	2~3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5000	[18]	

①采用式(4)计算。

②采用式(1)计算。

差异巨大且（商业）信息不完整，故本文仅对若干固定化酶提供了实际PiE值（换算为纯酶）。当多酶催化反应与体外生物转化（ivBT）涉及辅酶[如NAD(P)⁺/NAD(P)H、ATP、辅酶A等]时，则需要额外考虑其成本。为简化分析，本文在PE值计算中未予纳入，研究范围局限于水解酶、异构酶、磷酸酶等组合催化的无需辅酶参与的级联反应。

3 讨论

3.1 提升PE值的方法

对于酶分子与多酶机器催化的生物制造，PE值是衡量生物催化剂成本的最关键参数。常见的PE值提升途径包括：①挖掘超稳定酶元件^[41-42]；②酶工程改造提升酶分子稳定性^[43-44]；③开发酶固定化技术；④优化催化反应条件^[45-46]。

这里着重讨论新技术——多酶共固定技术。这是将多种酶通过物理或化学方法共同固定在特定载体或空间内的生物技术，旨在实现多酶之间的高效协同作用，限制中间产物的扩散，提高催化系统的效率与稳定性^[47]。多酶共固定技术相较游离多酶优势显著^[48-50]，如：①提高重复使用性，固定化多酶易于分离回收，可多次重复使用，进而降低工业应用成本；②提升稳定性，固定化为多酶提供良好的微环境，保护多酶免受极端pH、高温、有机溶剂等不利环境的影响，延长酶使用寿命；③增强催化活性，酶在载体或限域空间上的邻近排布能够缩短底物扩散路径，减少中间产物损失，同时利用底物通道效应提高整体反应速率；④减少副产物生成，共固定化多酶限制中间产物的扩散，降低副反应发生概率，提高目标产物的纯度；⑤实现复杂级联反应，多酶高效协同催化可实现单一酶无法实现的复杂反应，如CO₂转化为甲醇^[51]。

多酶共固定化技术可分为有载体和无载体两种类型。在有载体共固定化体系中，载体可选自壳聚糖、二氧化硅等仿生材料、纳米颗粒、纳米纤维、聚合物材料、自组装蛋白支架、核酸支架、有机-无机杂化材料等^[47]。多酶分子通过吸附、包

埋、共价结合、交联等作用共固定化在上述载体中，分布状态包括随机分布、定向分布和分隔室分布三种形式。无载体共固定化多酶体系主要包括酶交联聚集体、多酶复合体和多酶自组装体等^[52-53]，该体系无需使用载体材料，减少非催化物质的引入，可显著降低生产成本，同时避免载体对酶活性中心的干扰，基于催化剂质量的比酶活性更高。

当前，多酶共固定技术处于技术发展初期，属于“试错法（trial-and-error）”阶段，面临诸多挑战，如：

（1）载体设计与适配性问题。忽视实际应用的功能需求，仅孤立关注载体本身的性能，缺乏对载体物理化学性质与酶匹配性的深入研究，适配性差导致酶负载量低或活性损失显著。

（2）酶活性与稳定性的权衡与共提升。固定化酶的活性与稳定性权衡本质是“酶构象自由度”与“结构刚性”的博弈，需要探索巧妙的固定化策略，实现具体应用场景下的共提升。

（3）规模化生产的技术瓶颈。非标准化的“试错法”使不同批次固定化酶性能差异大，且研发阶段对载体材料与制备成本、固定化酶应用稳定性等关注较少，导致多酶共固定化技术在工业应用的竞争力不足。

作者研究团队针对上述挑战，从制备产品的应用场景出发，设计并构建多种不同种类的共同固定化多酶体系，满足产业上高稳定、高活性、批间均一、低成本的规模化制备需求。例如，在肌醇多酶机器制备中，万吨级产线的实际PE值约为13，团队针对酶稳定性与负载量问题，以仿生硅矿化微囊构建适配肌醇多酶机器的共同固定化多酶体系，PE值进一步提升到60~80，可降低生物催化剂成本大约75%^[34]；针对酶活性与稳定性需求，基于SpyTag/SpyCatcher蛋白相互作用和蛋白寡聚作用，研制高效、稳定的无载体多酶共固定化体系，PE值提升到高达400，可降低生物催化剂成本97%，显著提升肌醇生产的经济性。未来，借助跨学科融合，多酶共固定技术有望加速突破载体设计、系统控制及规模化等关键瓶颈，推动技术向高效、智能、实用化方向发展。

3.2 底物-酶的传质对PE值的影响

酶催化效率高度依赖底物与酶的物理接触机会，故而底物的可溶解性质影响PE值十分显著。

工业上，绝大多数酶催化反应是基于可溶性底物与可溶性游离酶（图2，左上象限）。以淀粉酶水解为例，在淀粉水解之前，糊化作用破坏了淀粉颗粒的晶体结构，几乎全部 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键暴露在水溶液中，显著提高了淀粉酶对底物 α -糖苷键的可及性（accessibility），进而实现高效酶水解，也就是低酶用量。当前，市售淀粉酶制剂（含糖化酶与液化酶，分开使用）价格约100元/kg酶干重（一般是蛋白含量10%的酶溶液，售价大约10元/升），其PE值高达5000左右，即每吨淀粉水解仅需要0.2 kg酶干重，用酶成本低至20~50元。显然，由于淀粉复合酶制剂用量极少且成本低廉，进一步酶固定化将产生不必要的额外成本，缺乏实际应用价值。

对于其他可溶性底物，酶固定化能够提升酶稳定性，进而显著提升TTN及PE值，同时便于固态酶与可溶性产物/底物分离，故仍是一个重要的技术提升方向（图2，右上象限）。固定化葡萄糖异构酶是商业上最成功的酶固定化案例之一，其

可将葡萄糖转化为果糖，支撑全球年产果葡糖浆超过2000万吨。目前，每千克固定化葡萄糖异构酶能够在58℃催化合成约15 t F42果葡糖浆产品（对应6.3 t果糖），PiE值约6300，而固定化葡萄糖异构酶成本约300元/kg，即生产每吨F42果葡糖浆的酶成本仅20元^[14, 54]。固定化葡萄糖异构酶中纯酶含量约6%，即基于纯酶的PiE值高达100 000左右，该案例充分展现酶固定化技术在提升PE值，降低催化剂成本方面的可观潜力。

纤维素酶水解是非粮生物质水解的最大挑战之一。基于当前的技术水平，纤维素酶的PE值仅50~100（图2，左下象限），即获得每吨目标产品需要消耗10~20 kg纤维素酶，是淀粉水解酶用量（0.2 kg/t）的50~100倍，使得生产每吨生物质糖的纤维素酶成本高达1000~2000元，显然是第二代生物炼制工厂的经济可行性差的重要原因。

显然，非粮生物质酶水解的产业化挑战是如何大幅降低纤维素酶用量。相当多的学术论文聚焦于研究纤维素酶的固定化策略^[55-59]，期望有效回收并反复利用纤维素酶。然而，根据第一性原理（固态催化剂与固态底物难以实现有效的传质反应），我们明确指出，利用纤维素酶固定化水解固态纤维素是错误方向（图2，右下象限）。事实上，

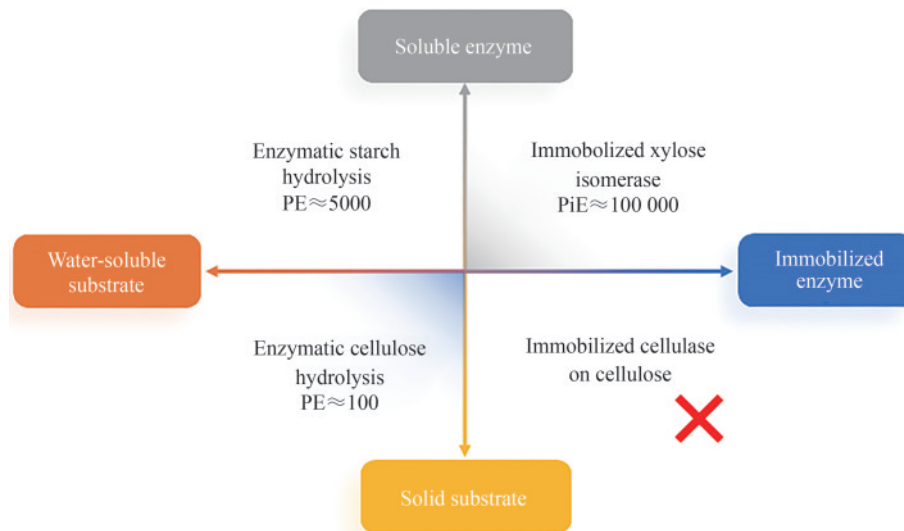


图2 酶催化产品的代表性PE值与底物-酶的可溶性

(Soluble enzyme—游离酶；Water-soluble substrate—水溶性底物；Immobilized enzyme—固定化酶；Solid substrate—固态底物；Enzymatic starch hydrolysis—淀粉酶水解；Immobilized xylose isomerase—葡萄糖-果糖异构酶；Enzymatic cellulose hydrolysis—纤维素酶水解；Immobilized cellulase on cellulose—固定化纤维素酶水解纤维素，数据来源参见表3)

Fig. 2 Representative PE values of enzyme-catalyzed products and the solubility of substrate-enzyme

(Data source: refer to Table 3)

固定化并非纤维素酶重复使用的唯一路径，简单吸附即可实现固态底物对可溶纤维素酶的反复利用^[36-37, 60]，同时避免催化过程中的传质问题。

3.3 工业酶的皇冠——纤维素酶

基于对生物经济的巨大期望、对可再生糖资源的巨大需求以及未来技术发展趋势的预判，纤维素酶大概率将是未来最大的工业酶品种，其酶用量有望到达1000万吨酶干重（或1亿吨液态酶，蛋白含量10%），市场规模达到5000亿元人民币，是当前所有工业酶市场之和（64亿美元，2021年^[61]）的10倍以上。以上预测是基于三个假设：①生物质纤维素酶水解的PE值从当前的100提高到300，每吨生物质原料的纤维素酶用量下降2/3；②纤维素酶生产成本从目前的100元/kg降低至50元/kg酶干重^[8]；③预期全球非粮生物质通过纤维素酶水解与利用的总量将超过30亿吨，实际上全球非粮生物质产量2000亿吨^[62]，包括中国秸秆年产量9亿吨，美国非粮生物质产量超过10亿吨，可利用资源极其丰富。

在过去半个世纪的纤维素酶研究中，诸多国际酶公司〔如诺维信、丹尼斯可（杜邦）、Codexis等〕以及知名酶专家（如Frances Arnold、Mike Himmel等）致力于探索非粮生物质的酶水解技术，但核心的产业化瓶颈始终未能突破，目前生物质糖生产成本仍高于淀粉糖，且质量低于淀粉糖。文献综述表明大多数纤维素酶研究者机械地局限于单个纤维素酶工程研究，使用水溶性模拟底物去筛选新的纤维素酶，但是固态底物水解完全不同于可溶性底物的水解（图1）^[63]。实际上，纤维素酶筛选与改造必须与生物质固态底物（非均相）性质（如纤维素酶可接触的比表面积）的研究紧密结合^[64-65]。结构化数学模型帮助提升生物质酶水解的新认知^[66]，模型预测显示，固态底物纤维素的低比表面积是酶水解的最大限制性因素。随后，定量纤维素比面积测量技术^[64-65]清晰表明，纤维素酶无法接触到绝大部分 β -1,4-糖苷键，因此纤维素酶水解是底物限制的酶水解过程，酶无法充分发挥其催化潜力。固态纤维素酶水解过程完全不同于大多数酶催化可溶性底物反应（如淀粉

水解、葡萄糖异构等反应），这些反应的所需酶量远远低于底物量，每种酶均能展现其最大催化能力。纤维素溶剂法（如COSLIF^[67]）是能够最有效提高纤维素比表面积的技术^[67-68]，充分预处理纤维素原料能让纤维素酶充分接触底物，使其得以全面有效释放催化能力，能够降低纤维素酶用量至原来的1/10~1/100，进而大幅提升PE值^[69-70]。例如，利用0℃（冰水孵育）浓磷酸预处理纤维素，能够溶解纤维素纤维，但是不降解纤维素分子，添加水或有机溶剂可以沉淀纤维素，得到高纤维素比表面积的再生非结晶纤维素（regenerated amorphous cellulose, RAC）^[71]。以RAC为底物，可以减少纤维素酶用量至原来的1/100，将PE值提升到5000以上^[69]。COSLIF预处理不同性质与来源的生物质（如玉米秸秆、芦苇、芒草、竹子等），纤维素酶用量可以降低原来的1/10，将PE值提升到500^[70]。尽管现在纤维素溶剂法还是太昂贵，难以实现产业化，但是有效增加纤维素的比表面积是减少酶用量的方向。开发经济可行的新预处理技术（如更有效去除木质素等）以及使用更高比酶活的纤维素酶^[72]，未来将PE值从目前的50~100提升至300前景可期。

4 结 论

生物制造成本主要包括原料、生物催化剂、产品分离、动力、人工以及设备折旧等成本，当前估算方法极度依赖生物制造的工业经验。我们希望推动生物制造从传统非标准化的作坊式生产向模块化协同制造转型，其中量化经济分析工具是助力生物制造产业化的利器。

我们已提出PC值新方法学工具^[6]，将原料对生物制造成本的估算简单透明化。本文进一步基于第一性原理提出PE值，从经济维度量化生物催化剂（即“术”）的效率，并可拓展到PX值，以评估微生物发酵中细胞工厂的性能。PE值、PX值的可计算性、直观性，为实验室技术指标向工厂成本控制模型的转化提供了新参考。

值得关注的是，体外生物转化（ivBT）平台技术可通过酶挖掘、改造，低成本制备以及酶固定化等技术快速提升PE值，实现生物催化剂制造

成本指数级下降,同时体外多酶途径与酶催化体系对工程设备要求低,分离纯化更容易,能够大幅降低产品分离成本,有望成为推动生物制造从经验驱动迈向工程驱动的新质生产力。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Y H P, SUN J B, MA Y H. Biomanufacturing: history and perspective[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(4/5): 773-784.
- [2] 马延和. 生物制造产业是生物经济重点发展方向[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(5): 4-5.
MA Y H. Biomanufacturing industry: a priority development direction in bioeconomy [J]. *China Biotechnology*, 2022, 42(5): 4-5.
- [3] 李寅. 合成生物制造 2022[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(3): 807-841.
LI Y. Biomanufacturing driven by engineered organisms(2022) [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(3): 807-841.
- [4] 石婷, 宋展, 宋世怡, 等. 体外生物转化(ivBT): 生物制造的新前沿[J]. *合成生物学*, 2024, 5(6): 1437-1460.
SHI T, SONG Z, SONG S Y, et al. *In vitro* bio transformation (ivBT): a new frontier of industrial biomanufacturing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(6): 1437-1460.
- [5] 张以恒. 中国哲学思想“道法术器”对生物制造的启示[J]. *合成生物学*, 2024, 5(6): 1231-1241.
ZHANG Y H P. The enlightenment of the Chinese philosophy “Tao-Fa-Shu-Qi” to industrial biomanufacturing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(6): 1231-1241.
- [6] 张以恒, 陈雪梅, 石婷. 生物制造的市本率(PC值): 定义与应用[J]. *合成生物学*, 2025, 6(1): 8-17.
ZHANG Y H P, CHEN X M, SHI T. Price to cost-of-raw-materials ratio (PC) of biomanufacturing: definition and application[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2025, 6(1): 8-17.
- [7] YE J, LI Y J, BAI Y Q, et al. A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 56.
- [8] LIU G, ZHANG J, BAO J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(1): 133-140.
- [9] BAILEY J E, OLLIS D F. *Biochemical engineering fundamentals*[M]. New York: McGraw-Hill, 1986.
- [10] CLARK D S, BLANCH H W. *Biochemical Engineering [M/OL]*. 2nd Edition. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis, CRC Press, 1997. (1997-02-14) [2025-01-01]. <https://doi.org/10.1201/9780429258732>.
- [11] ROGERS T A, BOMMARIUS A S. Utilizing simple biochemical measurements to predict lifetime output of biocatalysts in continuous isothermal processes[J]. *Chemical Engineering Science*, 2010, 65(6): 2118-2124.
- [12] MYUNG S, ZHANG X Z, PERCIVAL ZHANG Y H P. Ultra-stable phosphoglucose isomerase through immobilization of cellulose-binding module-tagged thermophilic enzyme on low-cost high-capacity cellulosic adsorbent[J]. *Biotechnology Progress*, 2011, 27(4): 969-975.
- [13] GAO X, FANG S B, MA X Z, et al. Customized self-assembled bimetallic hybrid nanoflowers promoting the robustness of D-allulose 3-epimerase[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 484: 149453.
- [14] JIA D X, ZHOU L, ZHENG Y G. Properties of a novel thermostable glucose isomerase mined from *Thermus oshimai* and its application to preparation of high fructose corn syrup [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 99: 1-8.
- [15] JIA D X, WANG T, LIU Z J, et al. Whole cell immobilization of refractory glucose isomerase using tris(hydroxymethyl) phosphine as crosslinker for preparation of high fructose corn syrup at elevated temperature[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(2): 176-182.
- [16] WANG L H, LIU X L, JIANG Y J, et al. Silica nanoflowers-stabilized Pickering emulsion as a robust biocatalysis platform for enzymatic production of biodiesel[J]. *Catalysts*, 2019, 9(12): 1026.
- [17] RAJENDHRAN J, GUNASEKARAN P. Molecular cloning and characterization of thermostable β -lactam acylase with broad substrate specificity from *Bacillusadius*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103(5): 457-463.
- [18] PERCIVAL ZHANG Y H P. Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: challenges and opportunities[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105(4): 663-677.
- [19] MOSBAH H, SAYARI A, HORCHANI H, et al. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosus* lipase: a study with emulsified substrate[J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 55(1): 31-39.
- [20] SUN F F, ZHANG X Z, MYUNG S, et al. Thermophilic *Thermotoga maritima* ribose-5-phosphate isomerase RpiB: optimized heat treatment purification and basic characterization [J]. *Protein Expression and Purification*, 2012, 82(2): 302-307.
- [21] WANG Y, ZHANG Y H P. A highly active phosphoglucomutase from *Clostridium thermocellum*: cloning, purification, characterization and enhanced thermostability[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(1): 39-46.
- [22] MYUNG S, WANG Y R, ZHANG Y H P. Fructose-1,6-bisphosphatase from a hyper-thermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: characterization, metabolite stability, and its implications[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(12): 1882-1887.
- [23] DAS A, PAUL T, GHOSH P, et al. Kinetic study of a glucose

- tolerant β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9 entrapped into alginate beads[J]. Waste and Biomass Valorization, 2015, 6(1): 53-61.
- [24] PATEL P, GUPTA N, GAIKWAD S, et al. *Leucaena* sp. recombinant cinnamyl alcohol dehydrogenase: purification and physicochemical characterization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 63: 254-260.
- [25] YOON K S, FUKUDA K, FUJISAWA K, et al. Purification and characterization of a highly thermostable, oxygen-resistant, respiratory [NiFe]-hydrogenase from a marine, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(12): 7081-7088.
- [26] KONG W X, ZHANG J W, ZHOU L Y, et al. Activation and stabilization of engineered amine dehydrogenase by fatty acids for bioprocess intensification of asymmetric reductive amination[J]. ACS Catalysis, 2025, 15(1): 34-43.
- [27] WANG Y R, ZHANG Y H P. Overexpression and simple purification of the *Thermotoga maritima* 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Escherichia coli* and its application for NADPH regeneration[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8: 30.
- [28] HUANG S Y, ZHANG Y H P, ZHONG J J. A thermostable recombinant transaldolase with high activity over a broad pH range[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2403-2410.
- [29] HUFFMAN M A, FRYSZKOWSKA A, ALVIZO O, et al. Design of an *in vitro* biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir[J]. Science, 2019, 366(6470): 1255-1259.
- [30] WEI X L, YANG X, HU C C, et al. ATP-free *in vitro* biotransformation of starch-derived maltodextrin into poly-3-hydroxybutyrate *via* acetyl-CoA[J]. Nature Communications, 2024, 15: 3267.
- [31] CAI T, SUN H B, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. Science, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [32] KORMAN T P, OPGENORTH P H, BOWIE J U. A synthetic biochemistry platform for cell free production of monoterpenes from glucose[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15526.
- [33] YOU C, SHI T, LI Y J, et al. An *in vitro* synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of *myo*-inositol from starch[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(8): 1855-1864.
- [34] HAN P P, YOU C, LI Y J, et al. High-titer production of *myo*-inositol by a co-immobilized four-enzyme cocktail in biomimetic mineralized microcapsules[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 461: 141946.
- [35] HAN P P, WANG X Y, LI Y J, et al. Synthesis of a healthy sweetener D-tagatose from starch catalyzed by semiartificial cell factories[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(8): 3813-3820.
- [36] LEE D, YU A H C, SADDLER J N. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1995, 45(4): 328-336.
- [37] QI B K, CHEN X R, SU Y, et al. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 2881-2889.
- [38] JARBOE L R, ZHANG X L, WANG X, et al. Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology[J]. BioMed Research International, 2010, 2010(1): 761042.
- [39] XU J R, HE L Y, LIU C G, et al. Genome sequence of the self-flocculating strain *Saccharomyces cerevisiae* SPSC01[J]. Genome Announcements, 2018, 6(20): e00367-18.
- [40] CHANG W L, HOU W J, XU M M, et al. High-rate continuous *n*-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* from glucose and butyric acid in a single-pass fibrous-bed bioreactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(12): 3474-3486.
- [41] BURKHARDT C, BARUTH L, MEYER-HEYDECKE N, et al. Mining thermophiles for biotechnologically relevant enzymes: evaluating the potential of European and Caucasian hot springs[J]. Extremophiles, 2023, 28(1): 5.
- [42] WOHLGEMUTH R, LITTLECHILD J, MONTI D, et al. Discovering novel hydrolases from hot environments[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(8): 2077-2100.
- [43] XU K J, FU H R, CHEN Q M, et al. Engineering thermostability of industrial enzymes for enhanced application performance[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 291: 139067.
- [44] BERGESON A R, ALPER H S. Advancing sustainable biotechnology through protein engineering[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2024, 49(11): 955-968.
- [45] MYUNG S, ZHANG Y H P. Non-complexed four cascade enzyme mixture: simple purification and synergetic co-stabilization[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61500.
- [46] SPERL J M, SIEBER V. Multienzyme cascade reactions: status and recent advances[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(3): 2385-2396.
- [47] REN S Z, LI C H, JIAO X B, et al. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 373: 1254-1278.
- [48] XU K L, CHEN X X, ZHENG R C, et al. Immobilization of multi-enzymes on support materials for efficient biocatalysis [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 660.
- [49] HWANG E T, LEE S. Multienzymatic cascade reactions *via* enzyme complex by immobilization[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(5): 4402-4425.
- [50] BILAL M, HUSSAIN N, AMÉRICO-PINHEIRO J H P, et al. Multi-enzyme co-immobilized nano-assemblies: bringing enzymes together for expanding bio-catalysis scope to meet

- biotechnological challenges[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 186: 735-749.
- [51] WANG X L, LI Z, SHI J F, et al. Bioinspired approach to multienzyme cascade system construction for efficient carbon dioxide reduction[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(3): 962-972.
- [52] PENG F, CHEN Q S, ZONG M H, et al. Sequential co-immobilization of multienzyme nanodevices based on SpyCatcher and SpyTag for robust biocatalysis[J]. *Molecular Catalysis*, 2021, 510: 111673.
- [53] WILSON L, ILLANES A, OTTONE C, et al. Co-immobilized carrier-free enzymes for lactose upgrading[J]. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2022, 33: 100553.
- [54] ZHANG Y H P. Simpler is better: high-yield and potential low-cost biofuels production through cell-free synthetic pathway biotransformation (SyPaB)[J]. *ACS Catalysis*, 2011, 1(9): 998-1009.
- [55] SUN L Q, XU C Z, TONG S S, et al. Enhancing cellulose hydrolysis via cellulase immobilization on zeolitic imidazolate frameworks using physical adsorption[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2024, 47(7): 1071-1080.
- [56] XU C Z, TONG S S, SUN L Q, et al. Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: an all-inclusive review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 321: 121319.
- [57] TÉBÉKA I R M, SILVA A G L, PETRI D F S. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase[J]. *Langmuir*, 2009, 25(3): 1582-1587.
- [58] CHANG R H, JANG J, WU K C W. Cellulase immobilized mesoporous silica nanocatalysts for efficient cellulose-to-glucose conversion[J]. *Green Chemistry*, 2011, 13(10): 2844-2850.
- [59] AHMED I N, YANG X L, DUBALE A A, et al. Hydrolysis of cellulose using cellulase physically immobilized on highly stable zirconium based metal-organic frameworks[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 377-382.
- [60] XU X X, ZHANG W, YOU C, et al. Biosynthesis of artificial starch and microbial protein from agricultural residue[J]. *Science Bulletin*, 2023, 68(2): 214-223.
- [61] BORGES S, BRASSESCO M E, CUNHA S A, et al. Recent trends in biocatalysis and its application in the food industry [M]//Enzymatic processes for food valorization. Amsterdam: Elsevier, 2024: 265-284. (2024-06-28)[2025-01-01]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95996-4.00016-2>.
- [62] ZHANG Y H P. Next generation biorefineries will solve the food, biofuels, and environmental trilemma in the energy-food-water nexus[J]. *Energy Science & Engineering*, 2013, 1(1): 27-41.
- [63] ZHANG Y H P, HIMMEL M E, MIELENZ J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(5): 452-481.
- [64] HONG J, YE X H, ZHANG Y H P. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications[J]. *Langmuir*, 2007, 23(25): 12535-12540.
- [65] ROLLIN J A, ZHU Z G, SATHITSUKSANO N, et al. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(1): 22-30.
- [66] ZHANG Y H P, LYND L R. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(5): 888-898.
- [67] ZHANG Y H P, DING S Y, MIELENZ J R, et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(2): 214-223.
- [68] SATHITSUKSANO N, GEORGE A, ZHANG Y H P. New lignocellulose pretreatments using cellulose solvents: a review [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2013, 88(2): 169-180.
- [69] ZHANG Y H P, LYND L R. Determination of the number-average degree of polymerization of cellooligosaccharides and cellulose with application to enzymatic hydrolysis[J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(3): 1510-1515.
- [70] SATHITSUKSANO N, ZHU Z G, HO T J, et al. Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loadings[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4926-4929.
- [71] ZHANG Y H P, CUI J B, LYND L R, et al. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by *o*-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(2): 644-648.
- [72] SANTOS C A, MORAIS M A B, MANDELLI F, et al. A metagenomic 'dark matter' enzyme catalyses oxidative cellulose conversion[J]. *Nature*, 2025, 639(8056): 1076-1083.



第一作者及通讯作者：张以恒（1971—），低碳合成工程生物学国家重点实验室主任，中国科学院天津工业生物技术研究所体外合成生物学中心主任，曾经任美国弗吉尼亚理工大学终身正教授。他是体外合成生物学的奠基人之一与产业化领跑者，创建体外生物转化(ivBT)技术平台，率先提出“人工多酶分子机器”概念并实现产业化突破。在秸秆制粮、体外无细胞呼吸作用（无氧呼吸作用产氢、有氧呼吸作用制电）、人工合成淀粉、淀粉制塔格糖与肌醇等方向取得了一系列原创性突破。

E-mail: zhang_xw@tib.cas.cn