

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-056

## 体外多酶组装与生物级联催化：进展与展望

马牧青, 吴彦, 曲茂华, 卢夏锋, 曹敏, 杜峰, 季荣涛, 董磊迟, 罗志波  
(杭州微远生物科技有限公司, 浙江 杭州 310024)

**摘要:** 在全球碳中和战略背景下, 绿色生物制造正加速取代传统高污染、高能耗的化工生产方式。多酶级联反应 (multi-enzyme cascade reaction, MECR) 作为新一代生物催化平台技术, 通过模块化酶网络实现“一锅式”高效转化, 展现出卓越的原子经济性、显著降低的能耗以及突出的环境友好性。本综述明确聚焦于体外多酶级联催化系统 (*in vitro* multi-enzyme systems), 涵盖以下研究范畴: ①体外多酶级联体系的定义; ②体外多酶级联体系的分类; ③体外多酶级联体系的相关技术及应用。系统解析了体外多酶组装与生物级联催化的分子机制与技术体系: 基于反应拓扑学特征, 提出四类级联模型 (线性/趋同/平行/循环), 阐明其动力学优势; 突破性技术涵盖 AI 驱动的酶理性设计、纳米限域空间组织及光/电辅因子再生系统。通过智能适配设计理念, 本文深入解析了跨尺度酶模块的拓扑优化与催化耦合机制, 整合了计算流体力学建模、载体界面分子工程及微环境传质调控等关键技术。产业化实践表明, 该技术已成功实现手性药物中间体、高值天然产物等的高效绿色合成, 推动医药、材料等领域的工艺革新。展望未来, 动态微环境精准适配、人工智能辅助的酶网络设计及连续流规模化制备等方向将引领技术发展, 为绿色生物制造的产业化升级提供重要理论支撑与技术路径。

**关键词:** 多酶级联反应; 多酶组装; 生物级联催化; 绿色生物制造; 拓扑优化; 酶工程

中图分类号: Q814 文献标志码: A

## Extracellular multi-enzyme assembly and biocatalytic cascade: advances and prospects

MA Muqing, WU Yan, QU Maohua, LU Xiaofeng, CAO Min, DU Feng, JI Rongtao, DONG Leichi, LUO Zhibo  
(Hangzhou Weiyuan Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310024, Zhejiang, China)

**Abstract:** Amidst the accelerating global efforts toward carbon neutrality, sustainable biomanufacturing has emerged as a crucial alternative for energy-intensive and environmentally harmful chemical synthesis. Within this transformative landscape, Multi-Enzyme Cascade Reactions (MECRs) represent a paradigm-shifting biocatalytic platform, harnessing the orchestrated activity of spatially organized enzyme modules to enable efficient, one-pot transformations with inherent cofactor recycling capabilities. This comprehensive review synthesizes cutting-edge advances in the design,

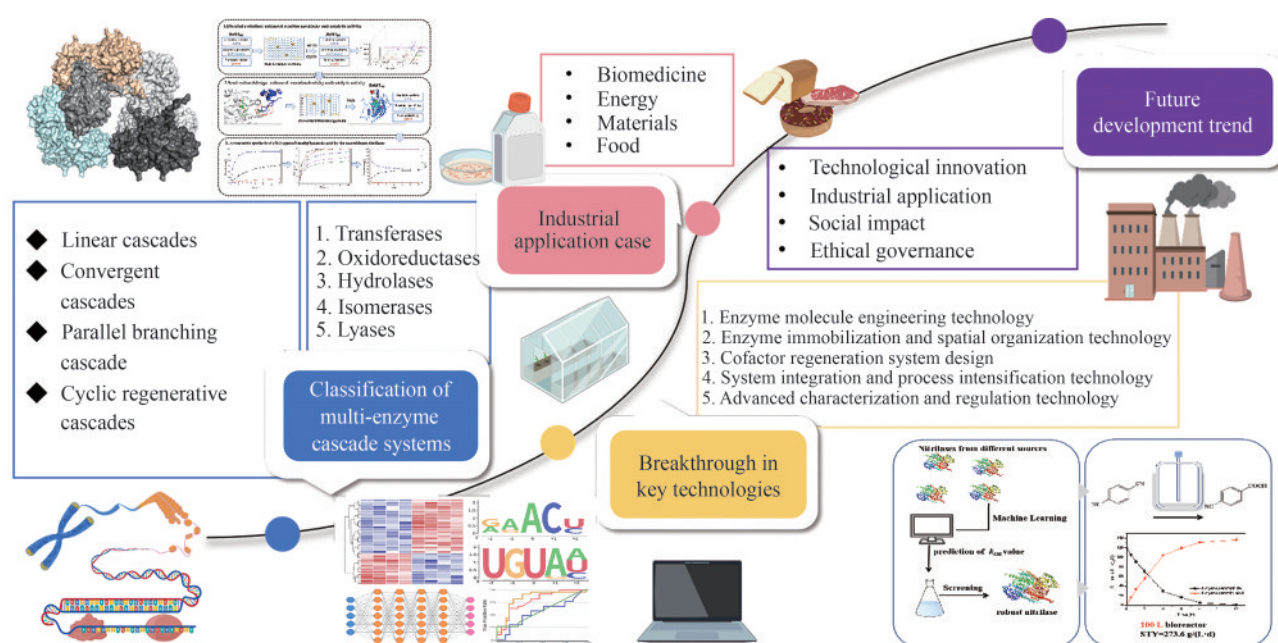
收稿日期: 2025-06-06 修回日期: 2025-06-30

基金项目: 杭州市农业与社会发展领域公益性科研引导项目 (20241029Y103)

引用本文: 马牧青, 吴彦, 曲茂华, 卢夏锋, 曹敏, 杜峰, 季荣涛, 董磊迟, 罗志波. 体外多酶组装与生物级联催化: 进展与展望[J]. 合成生物学, 2025, 6(4): 920-939

Citation: MA Muqing, WU Yan, QU Maohua, LU Xiaofeng, CAO Min, DU Feng, JI Rongtao, DONG Leichi, LUO Zhibo. Extracellular multi-enzyme assembly and biocatalytic cascade: advances and prospects[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(4): 920-939

optimization, and deployment of MECRs, offering a unified analysis across molecular, technological, and application dimensions. We critically dissect the mechanistic foundations of MECRs, including enzyme-enzyme synergy, substrate channeling phenomena, and allosteric regulation governing reaction flux. A systematic classification framework delineates cascade topologies—linear, convergent, parallel, and cyclic systems—elucidating their distinct kinetic advantages and thermodynamic constraints. Transformative technological innovations are highlighted, encompassing AI-driven de novo enzyme design, advanced co-immobilization strategies (such as protein scaffolds and biomimetic mineralization), nano-confined spatial organization for enhanced mass transfer, and novel cofactor regeneration systems utilizing light or electrical energy. The integration of computational fluid dynamics (CFD) modeling with microenvironmental optimization (such as pH and ionic strength gradients) has been shown to significantly enhance biocatalytic efficiency, stability, and operational lifetime. The relevance of industrial application is substantiated by compelling case studies that demonstrate the synthesis of high-value compounds driven by MECR, including optically pure pharmaceutical intermediates, bio-based polymers, and platform chemicals. These processes achieve superior atom economy (>90%), significant reductions in the E-factor, and near-quantitative yields under mild aqueous conditions. The inherent competitive advantages of MECRs—unmatched stereoselectivity, ambient operational parameters, and intrinsic sustainability—are rigorously contrasted against conventional chemocatalytic processes. Persistent challenges in enzyme inactivation, cofactor economics, and reactor scalability are objectively evaluated, alongside emerging mitigation strategies such as continuous-flow membrane bioreactors, artificial metabolon engineering, and machine learning-guided network optimization. Forward-looking perspectives outline a roadmap for next-generation MECRs, prioritizing dynamic spatiotemporal control of microenvironments, AI-accelerated evolution of hyperstable enzymes, and modular continuous manufacturing platforms. The strategic convergence of synthetic biology, computational enzyme engineering, and intelligent process control is poised to unlock programmable biocatalytic systems for complex, multi-step syntheses. This review establishes a foundational framework for advancing MECRs from bench-scale curiosities to industrially robust, environmentally transformative technologies, ultimately positioning enzyme cascades as a cornerstone of carbon-negative manufacturing and a pivotal enabler of global net-zero ambitions.



**Keywords:** multi-enzyme cascade reaction; multi-enzyme assembly; bio-catalytic cascade; green biomanufacturing; topology optimization; enzyme engineering

随着全球能源枯竭和生态恶化问题日益严峻,绿色生物制造的推广应用已刻不容缓<sup>[1]</sup>。在“双碳”目标背景下,传统高耗能、高污染的生产模式亟待变革。多酶级联反应凭借其“一锅法”高效转化优势,已成为绿色生物制造的核心技术之一<sup>[2]</sup>。该技术通过精确设计的酶级联网络,可实现较高的原子经济性(部分体系可达90%左右)<sup>[3]</sup>,较传统化学法降低能耗50%~80%<sup>[4]</sup>,并显著减少废弃物排放<sup>[5]</sup>,展现出显著的可持续发展优势。

在全球绿色转型的背景下,中国生物制造产业展现出强劲的发展势头,年均增速达12%,2023年产值已突破8000亿元<sup>[6]</sup>。但值得注意的是,当前产业仍面临严峻挑战,如在1,4-丁二醇等300余种关键化学品的生产中,高达75%的产能仍依赖传统石油基化学合成工艺,由此每年产生数百万吨高危废弃物<sup>[7]</sup>。这一现状正在被多酶级联技术的突破性进展所改变。以尼龙前体己二酸的合成为例,最新研发的智能七酶级联系统实现了常温常压条件下的高效制备,相较传统工艺可减少82%的碳足迹<sup>[8]</sup>。这种仿生催化模式的应用版图正在快速扩展:在医药领域成功应用于阿托伐他汀中间体的绿色合成<sup>[9]</sup>;在材料领域实现了PEF塑料单体的生物制造<sup>[10]</sup>;在食品领域则推动了高果糖浆等产品的工艺革新<sup>[11]</sup>。这些产业化案例充分展现了多酶级联技术在替代传统高污染工艺方面的巨大潜力。

## 1 体外多酶级联反应

### 1.1 多酶级联反应的定义

多酶级联反应(multi-enzyme cascade reaction, MECR),亦称多酶组装,是指通过多个酶协同作用,将底物逐步转化为目标产物的生物催化过程。与传统的单酶催化相比,多酶级联反应具有更高的催化效率和产物选择性,能够实现复杂化合物的高效合成<sup>[12]</sup>。特别需要说明的是,虽然体内代谢工程(*in vivo* metabolic pathway engineering)与多酶催化具有概念相关性,但本综述聚焦体外合成生物学策略,重点讨论人工多酶组装体的理性

设计、过程强化技术以及产业化挑战,不涉及体内代谢工程等复杂宿主调控系统,以保持对体外生物催化前沿进展的专业探讨。

根据中间代谢物的反应机制,生物催化反应可分为以下两类:①当中间代谢产物在反应体系中能自发进行后续转化直至生成终产物时,该过程定义为“级联反应”(cascade);②当底物至产物的转化涉及多个酶催化的连续反应且在同一反应体系中进行时,该过程称为“串联反应”(tandem)<sup>[13]</sup>。随着研究的深入,现代生物催化领域将包含 $\geq 2$ 个酶促步骤的反应系统统称为“多酶级联反应”,其完整反应系统则定义为“多酶级联反应体系”。这一分类体系反映了对酶催化网络化反应机制的深入认知,其中级联反应强调热力学自驱性,而串联反应突出多酶协同性,二者共同构成了现代生物制造的核心技术基础。

多酶级联反应的核心竞争力在于其“三协同”效应:①能量协同(级联反应自发驱动);②代谢协同(底物通道效应减少损耗);③时空协同(酶固定化载体同时解决酶稳定性衰减和传质限制两个核心问题)<sup>[14]</sup>。这种三协同效应的实现,本质上依赖于模块化设计策略。一个工业的代表性案例是维生素B<sub>5</sub>前体的高效多酶级联合成,基于计算机辅助设计的转氨酶-醛缩酶-脱氢酶三酶体系,使其合成步骤从9步缩减至3步,收率提升至95%<sup>[15]</sup>。

### 1.2 多酶级联反应分类

多酶级联反应体系依据催化机制可分为三类典型系统:多酶催化体系(multi-enzymatic catalytic systems)、化学-酶法杂化体系(chemo-enzymatic hybrid systems)以及酶触发自发性级联体系(enzyme-initiated spontaneous cascade systems)<sup>[16-17]</sup>。本综述将系统阐述多酶催化体系的架构特征,该体系可进一步基于反应网络拓扑结构划分为四种亚型:线性级联(linear cascades)、趋同级联(convergent cascades)、平行分支级联(parallel branching cascade)以及循环再生级联(cyclic regenerative cascades)<sup>[18]</sup>。这种分类体系反映了多酶催化在反应路径设计上的多样性,其中每种架

构都具有独特的动力学特征和优势，为复杂生物催化过程的精准调控提供了理论基础（图1）。

### 1.2.1 线性级联

线性级联是最基础的多酶反应模式，其核心特征是由多个酶按照严格顺序催化单向不可逆反应，形成连续的代谢流。绝大多数多酶催化体系采用线性单向催化路径设计，以特定底物为起始，通过一系列酶促反应实现中间代谢物的顺序转化，最终生成目标产物，如图1(a)所示<sup>[20]</sup>。该体系的核心优势在于其“一锅式”反应（one-pot reaction）特性，可显著简化传统多步合成中的分离纯化流程，降低工艺复杂度，并减少人工干预需求<sup>[4]</sup>。从反应动力学角度分析，中间代谢物的即时转化有效避免了高活性或有毒中间体的累积，使工艺安全性提升。这些特性使该体系在GMP（Good Manufacturing Practice）级药物中间体（如西格列汀前体）生产中展现出显著优势，较传统工艺有机溶剂用量减少70%~90%<sup>[21]</sup>。

这类级联通常由热力学有利的起始反应〔如

ATP依赖的激酶反应或NAD(P)<sup>+</sup>依赖的氧化反应〕驱动，后续步骤可通过底物通道效应（如酶复合体共定位）或微环境工程（如载体空间限域）实现高效传递<sup>[22-23]</sup>。典型代表是1,4-丁二醇的合成路径：葡萄糖首先通过己糖激酶（HK）磷酸化，经糖酵解途径生成甘油醛-3-磷酸，再通过一系列还原酶（如醛缩酶、脱氢酶）逐步转化为目标产物。该体系的优势在于反应方向明确、副产物少，在化工中间体（如己二酸生物合成碳效率达92%，较石油路线提升40%）、药物前体〔如D-氨基酸生产时空产率28 g/(L·d)，较化学法提升5倍〕生产中应用广泛<sup>[24-26]</sup>。最新研究通过酶固定化技术（如金属有机框架封装）使线性级联的时空产率提升3~5倍，例如将葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶和糖酸脱氢酶共固定在ZIF-8中，可实现维生素C前体的连续生产<sup>[27]</sup>。

### 1.2.2 趋同级联

趋同级联是一类将多个独立的生物催化或信号传导路径整合到一个共同终点的反应网络设计。

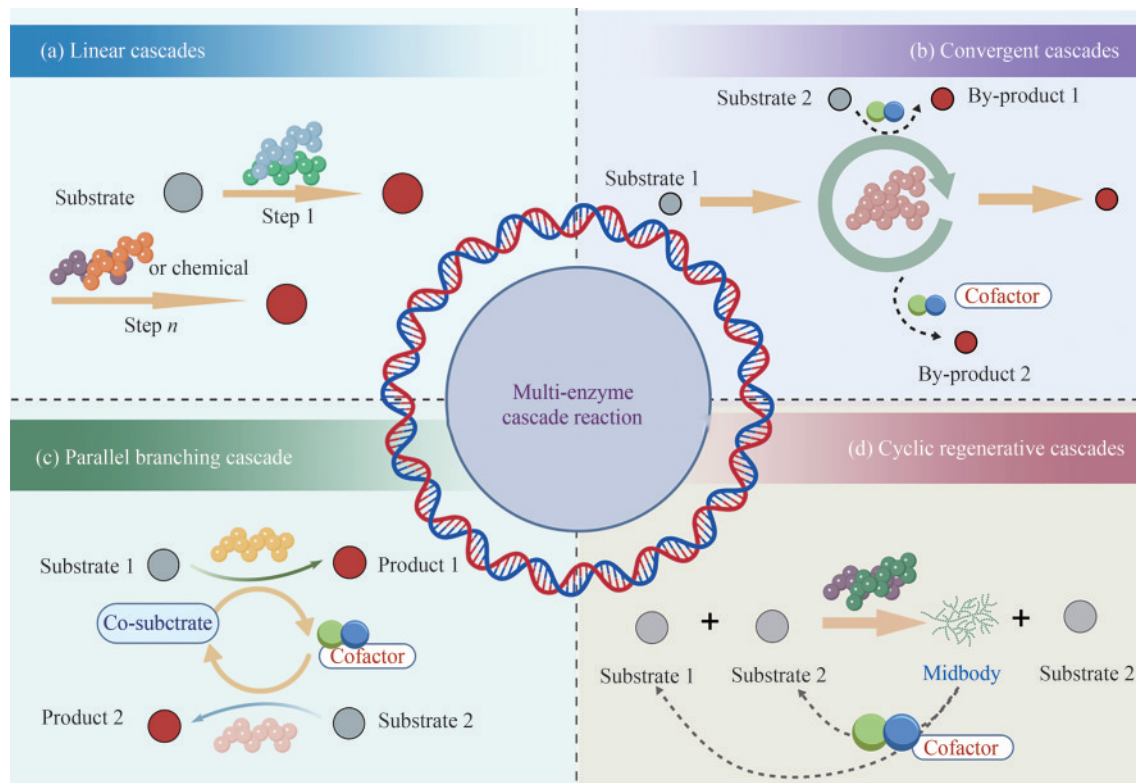


图1 多酶级联催化体系的4种类型<sup>[19]</sup>

(图1使用BioGDP.com制作)

Fig. 1 Four types of multi-enzyme cascade catalytic systems<sup>[19]</sup>

(Fig.1 was Created with BioGDP.com)

这类级联包括主反应和辅酶循环反应，适用于需要辅酶参与的催化过程 [如图1(b)所示]，通过整合多组底物的独立转化路径，实现复杂分子的模块化组装，其设计理念类似于化工中的“分子拼接”<sup>[28]</sup>。在D-氨基酸生产中，通过整合L-氨基酸脱氢酶和甲酸脱氢酶(FDH)两条独立路径，实现NADH的高效循环利用，使D-苯甘氨酸生产效率提升至28 g/(L·d)<sup>[29]</sup>。在阿托伐他汀侧链合成中，将酮还原酶(KRED)与葡萄糖脱氢酶(GDH)路径趋同，NADPH再生效率提升3.2倍<sup>[30]</sup>。交叉式酶催化路线设计是针对传统线性催化路径的局限性所提出的系统性优化策略。该设计不仅包含基础的单向催化路径，更整合了必需的辅因子再生系统。研究表明，约67%的工业用酶(如氧化还原酶EC 1类、转移酶EC 2类)需要辅因子[ATP、NAD(P)H、FAD等]参与才能维持催化活性<sup>[31]</sup>。

在工程化设计中，辅因子循环系统可分为三类：①基础循环(如ATP/ADP通过多聚磷酸激酶再生)<sup>[32]</sup>；②复合循环(如SAM循环涉及甲硫氨酸腺苷转移酶、S-腺苷高半胱氨酸核苷酶等3~5个酶协同)<sup>[33]</sup>；③延伸循环(通过上游路径耦合廉价底物，如以葡萄糖替代直接ATP输入)<sup>[34]</sup>。这种多层级联设计使生产成本大幅降低。通过反应热力学耦合和动力学匹配，交叉式体系在工业规模应用中展现出显著优势，尤其适用于高附加值手性氨基酸的绿色合成<sup>[35]</sup>。

### 1.2.3 平行分支级联

平行分支级联通过构建竞争性反应网络，使单一底物分流生成不同产物，其核心价值在于实现资源的高效利用和产物谱调控。多个独立的催化路线通过中间代谢产物的共用或循环实现协同作用，如图1(c)所示。值得注意的是，这种共用机制与天然代谢网络的本质区别在于：天然代谢中间体的传递往往依赖细胞区室化结构和转运系统，而人工体系通过理性设计的载体材料或微环境工程实现更高效的分子传递。平行式酶催化体系构建了多路径协同的复杂反应网络，通过共享中间代谢物实现各催化路径的紧密偶联。这种设计突破了传统单一路径的局限性，建立了仿生分流与汇流的动态平衡机制，使副产物能够高效循环利用。其核心优势体现在三方面：一是通过

精确调控各路径酶动力学参数实现反应协同；二是利用热力学耦合驱动反应完全；三是显著提升原子经济性。典型应用包括非消旋醇-亚砷联产系统，该系统通过5个酶的级联催化使一系列手性亚砷产率和e.c.值分别达到86%~99%和89%~99%，实现了手性化合物的高效合成<sup>[36]</sup>。这种网络化设计为高附加值化合物的绿色制造提供了创新解决方案，代表了生物催化技术的重要发展方向。

### 1.2.4 循环再生级联

循环级联通过建立辅因子或关键中间体的再生回路，解决生物催化中最大的成本瓶颈——辅因子依赖问题。如图1(d)所示，通过闭环回路实现底物的循环利用，适用于外消旋反应和手性化合物的合成。该催化体系采用闭环级联设计，通过构建酶催化与化学还原协同的杂化反应网络，实现底物的动态循环转化与对映体选择性富集。其核心机制在于：①立体选择性酶催化步骤实现特定构型底物的定向转化；②非选择性化学还原步骤完成底物原位再生；③多轮循环驱动目标对映体持续积累<sup>[37]</sup>。典型应用如酒石酸的动态动力学拆分，L-氨基酸氧化酶选择性氧化L-构型底物，经化学还原剂循环再生后，可使D-对映体富集至光学纯度>99%<sup>[38]</sup>。这种化学-酶法协同策略有效整合了生物催化的立体选择性与化学催化的广谱反应性，为手性化合物的高效制备提供了创新方法。

## 1.3 多酶级联催化反应涉及的主要酶类

多酶级联催化反应通过整合多种功能互补的酶类构建高效的生物催化系统。这类反应体系通常包含转移酶、氧化还原酶、裂合酶、水解酶和异构酶等主要酶类，它们通过精密的协同作用实现复杂的生物转化过程。这些酶类的组合不是简单叠加，而是经过系统设计和优化，形成具有特定功能的催化模块，能够在温和条件下高效驱动多步反应的连续进行。通过模块化组装策略，研究人员可以灵活配置不同酶的组合方式，构建定制化的级联反应通路，实现从简单前体到目标产物的高效转化。这种多酶协同催化的优势在于能够显著提升反应效率、降低能量消耗，并减少中

间产物的分离纯化步骤，为绿色可持续的生物制造提供了重要技术支撑<sup>[39]</sup>。随着合成生物学和酶工程技术的发展，多酶级联催化系统正在医药、化工、能源等领域展现出广阔的应用前景。

### 1.3.1 转移酶

转移酶催化各类官能团的精准转移，构建目标产物的分子骨架。转氨酶作为重要的转移酶，能够高效催化羰基到氨基的转化，在药物合成中展现出巨大潜力。工业上主要应用 $\omega$ -转氨酶和 $\alpha$ -转氨酶，分别作用于非羧酸邻位胺和 $\alpha$ -氨基酸的氨基<sup>[40]</sup>。然而，转氨反应的可逆性限制了其转化效率。通过将转氨酶整合到多酶级联催化体系中，可以打破反应平衡，推动反应向目标产物方向进行。例如，Savile等<sup>[41]</sup>在*Science*报道的里程碑式研究中，将 $\omega$ -转氨酶与乳酸脱氢酶偶联，成功实现了抗糖尿病药物西他列汀中间体的高效合成。该级联系统通过副产物丙酮酸的及时清除，使转化率达到99%以上，对映体过量值(e.e.)>99.9%，完美克服了转氨反应平衡限制。这一突破性案例为手性伯胺的工业化生产提供了高效的生物催化新范式。

### 1.3.2 氧化还原酶

氧化还原酶是催化电子在供体与受体间转移的关键酶类，涵盖脱氢、加氧及过氧化等反应，主要分为依赖辅因子（如NAD<sup>+</sup>/FAD）的脱氢酶（如乳酸脱氢酶）、以氧气为受体的氧化酶（如葡萄糖氧化酶）、分解活性氧的过氧化物酶（如辣根过氧化物酶）。在多酶级联体系中，其协同机制包括底物通道效应（如丙酮酸脱氢酶复合体直接传递中间产物）、辅因子再生系统（如NAD<sup>+</sup>循环耦合甲酸脱氢酶）及热力学驱动的级联设计，确保反应高效进行。

氧化还原酶的多酶级联体系在工业催化与生物技术中展现出显著优势。例如，手性药物中间体合成中，Huang等<sup>[42]</sup>报道了一种由酮还原酶（KRED）与葡萄糖脱氢酶（GDH）组成的级联系统，利用葡萄糖原位再生NADPH，实现*S*-苯乙醇的合成，产率达98%，e.e.值>99.9%，时空产率为12.8 g/(L·h)，较单酶体系提升5倍。在生物传感器领域，Nguyen团队<sup>[43]</sup>开发了基于葡萄糖氧化酶（GOx）和辣根过氧化物酶（HRP）的双酶电化学

传感器，通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导信号放大，检测限低至0.1 μmol/L（葡萄糖），线性范围达0.5~20 mmol/L，响应时间<3 s，重复使用50次后活性保留90%。氧化还原酶作为多酶级联的“电子枢纽”，其高效协同依赖于合理的级联设计、辅因子管理及系统兼容性优化。随着合成生物学与酶工程的发展，这类体系在绿色化学、精准医疗及可持续能源中的潜力将进一步释放。

### 1.3.3 水解酶

水解酶是催化底物水解反应（如酯键、糖苷键或肽键断裂）的一类酶，主要包括脂肪酶、糖苷酶、蛋白酶和磷酸酶等。在多酶级联体系中，水解酶常通过底物接力、产物导向或信号放大实现协同。典型实例包括：生物质转化中，将内切纤维素酶、外切纤维素酶与 $\beta$ -葡萄糖苷酶共固定化，使木质纤维素水解效率提升8倍<sup>[44]</sup>；药物合成中，脂肪酶与转氨酶级联催化动态动力学拆分，实现手性胺e.e.值>99%<sup>[45]</sup>。这些体系通过空间限域效应或pH自适应设计解决单酶条件不兼容问题，凸显水解酶在级联反应中的通用性与模块化优势。

### 1.3.4 裂合酶

裂合酶是一类能够催化底物分子中特定化学键（如C—C、C—O或C—N键）断裂，并伴随新双键或环状结构形成的酶。与水解酶不同，裂合酶的反应通常不依赖水分子参与，而是通过消除或加成机制实现底物转化。常见的裂合酶包括醛缩酶、脱羧酶和脱水酶等，它们在代谢途径和生物合成中扮演关键角色。例如，在天然产物合成中，苯丙氨酸氨裂合酶（PAL）能够高效催化苯丙氨酸脱氨生成肉桂酸，这一反应被广泛应用于植物次生代谢研究和药物中间体制备<sup>[46]</sup>。此外，在人工设计的多酶体系中，裂合酶常与其他酶（如激酶或还原酶）协同，通过底物定向传递或中间体捕获提高整体催化效率。这种策略在CO<sub>2</sub>生物固定和手性化合物合成中展现出独特优势<sup>[47]</sup>。

### 1.3.5 异构酶

异构酶负责催化分子内原子或基团的重新排列，从而改变底物的立体构型或官能团位置，但不改变其分子组成。这类酶在生物体内广泛参与糖代谢、氨基酸转化和信号传导等过程，主要包

括差向异构酶、变位酶和顺反异构酶等。例如，葡萄糖异构酶能够将葡萄糖转化为果糖，这一反应在食品工业中用于生产高果糖浆，具有重要的经济价值<sup>[48]</sup>。在多酶级联反应中，异构酶的作用尤为突出，它能够调整底物构型以适应后续酶促反应的需求，从而提高整体转化率<sup>[49]</sup>。通过优化反应条件或引入辅因子再生系统，异构酶的催化效率可进一步提升，使其在合成生物学和绿色化学中的应用更加广泛。

#### 1.4 多酶级联催化体系所涉及的相关技术

构建高效的多酶级联催化体系需要多学科技术的协同创新，其关键技术主要包括：①酶分子工程技术，如定向进化和理性设计，用于优化关键酶的催化性能；②酶固定化与空间组织技术，包括纳米载体固定化和人工细胞器构建，以提升酶的稳定性和底物传递效率；③辅因子再生系统设计，涵盖光/电驱动再生和仿生能量传递系统；④系统集成与过程强化技术，如微流控反应器和智能响应系统的开发；⑤先进表征与调控技术，包括原位监测和高通量筛选平台的建立。这些技术的突破与融合，极大地推动了多酶级联催化体系从基础研究向工业化应用的转化。

##### 1.4.1 酶分子工程技术

酶分子设计与改造技术已成为构建高效多酶级联催化体系的关键驱动力。其核心价值在于突破天然酶的性能限制并创造全新的催化功能，通过精准的蛋白质工程手段，可以定向优化酶的催化活性、选择性和底物适应性，同时显著增强其热稳定性和操作稳定性，使酶分子能够耐受工业生产的严苛条件。融合酶设计和底物通道工程的创新方法有效解决了多酶协同中的传质瓶颈，大幅提升了级联反应的效率。对酶辅因子依赖性的成功改造不仅降低了催化体系的运行成本，还拓展了非天然反应的可能性。

目前主要技术路径包括定向进化、理性设计和半理性设计三大类，其中定向进化通过易错PCR、DNA shuffling等方法模拟自然进化过程，Frances Arnold团队<sup>[50]</sup>利用该技术成功改造P450-BM3酶，使其对非天然底物的羟化能力提升

300倍。理性设计则基于AlphaFold2等结构预测工具进行精准改造，如Xu等<sup>[51]</sup>设计的葡萄糖异构酶突变体使木质纤维素转化率提升至92%。半理性设计结合两者优势，Wu团队<sup>[52]</sup>开发的“热点区”聚焦突变策略使脂肪酶活性提高20倍。

酶技术与计算机辅助设计的交叉融合正在成为当前研究的重要发展方向之一。Hyster课题组<sup>[53]</sup>构建的光驱动还原酶融合蛋白实现了无辅因子催化，而David Baker团队<sup>[54]</sup>通过AI算法从头设计出全新Kemp消除酶。这些技术进步显著提升了多酶级联体系的性能，如改造后的P450-GDH耦合系统使反应转化率突破 $10^6$ <sup>[55]</sup>。当前面临的筛选瓶颈、结构预测精度等挑战，正通过微流控分选和AlphaFold-Multimer等创新方法逐步解决<sup>[56-57]</sup>。

随着合成生物学与人工智能的深度融合，酶分子设计正朝着“定制化催化”方向发展。QM/MM多尺度模拟等先进技术的应用，使研究者能够更精准地调控酶的催化特性，为构建复杂多酶网络提供了强大工具<sup>[58]</sup>。这些突破不仅推动着基础研究的进步，更为生物制造、绿色化学等领域的工业化应用奠定了坚实基础。

##### 1.4.2 酶固定化与空间组织技术

酶固定化与空间组织技术是多酶级联催化体系实现高效协同催化的关键工程技术。近年来，该领域已发展出多种创新方法，主要包括载体固定化、纳米反应器构建和区室化分隔三大类技术路线，如图2所示。在载体固定化方面，金属有机框架材料(MOF)因其可调的孔径结构和表面特性成为研究热点，清华大学戈钧教授课题组<sup>[59]</sup>通过仿生矿化技术，成功构建了皱褶假丝酵母脂肪酶与MOF的复合催化材料。在极端有机相反应体系中，MOF衍生物及复合物展现出显著的溶剂耐受性，其残余酶活高达初始活性的96%~98%<sup>[59-60]</sup>。值得注意的是，有报道了葡萄糖氧化酶/过氧化氢酶双酶系统在氨基化磁性纳米颗粒上的共固定化，其固定化效率达80%以上，在连续使用15批次后仍能保持85%的催化活性<sup>[61]</sup>。此外，D-氨基酸氨基转移酶(DAAT)/甲酸脱氢酶(FDH)/乳酸脱氢酶(LDH)三酶级联在ZIF-8载体中的共固定化可实现一锅法一步完成D-氨基酸的合成，相比化学法合成工艺，具有合成步骤少、反应条件

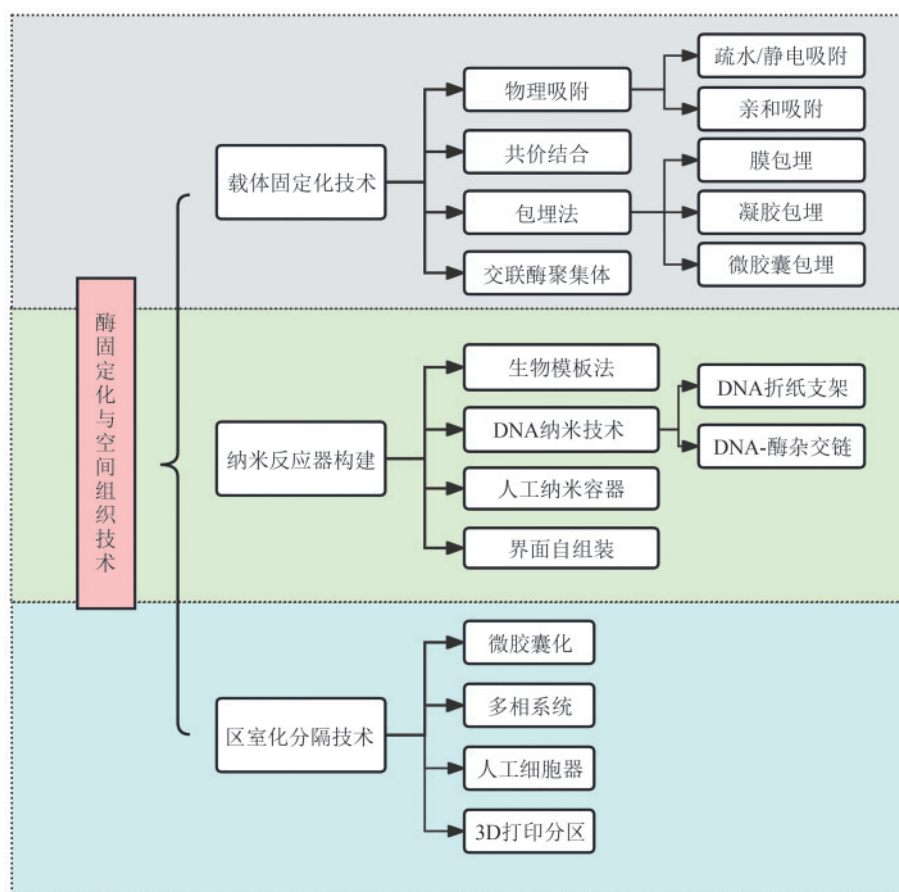


图2 固定化技术的固定化方法和机理

Fig. 2 The immobilization methods and mechanisms of immobilization technology

温和、收率高的优势，并已成功应用于200 L规模的手性药物中间体生产<sup>[62]</sup>。

纳米级空间组织技术为多酶级联提供了更精密的调控手段。Kim团队<sup>[63]</sup>利用DNA折纸技术构建了边长20 nm的三角形支架，精确控制葡萄糖代谢三酶（己糖激酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）的间距在10~15 nm范围内，使代谢通量提升8倍。类似地，病毒样颗粒（VLP）作为天然纳米反应器展现出独特优势，Wang课题组<sup>[64]</sup>将纤维素水解酶封装在豇豆花叶病毒衣壳内，不仅保护酶免受蛋白酶降解，还通过静电作用富集底物，使纤维素转化率提高12倍。这些纳米级空间组织技术通过模拟细胞内酶微环境，显著提升了级联反应的传质效率。

区室化分隔技术有效解决了不相容酶系的协同难题。Li等<sup>[65]</sup>设计了一种pH响应型聚合物微胶囊，将最适pH差异较大的酸性纤维素酶（pH 4.5）和碱性木糖异构酶（pH 8.0）分别封装在不

同隔室中，通过调控微环境pH使二者协同效率达到游离酶混合体系的6倍。更精巧的区室化设计来自合成生物学，Maria Godoy-Gallardo团队<sup>[66]</sup>构建了基于脂质体的“人工细胞器”，将产过氧化氢的氧化酶与分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的过氧化氢酶分室隔离，既维持了反应平衡，又避免了酶失活。这些空间组织技术正在推动多酶级联体系从简单混合向仿生智能系统发展。

当前该领域面临的主要挑战包括规模化制备的均一性控制和复杂反应条件的精准调控。最新突破显示，3D打印技术可实现固定化酶反应器的定制化构建，如He等<sup>[67]</sup>开发的酶支架固定化载体成功实现了青霉素G酰化酶、糖苷酶、蛋白酶及脂肪酶的固定，酶活保留率达92.8%。随着表征技术的进步，冷冻电镜和超分辨显微镜已能直接观察固定化酶的构象变化，为理性设计提供了新工具。

在产业化应用层面，固定化方法的选择直接

影响工艺效能。目前工业界主要采用共价结合、吸附、包埋和交联四类技术路线。以固定化脂肪酶生产生物柴油为例，采用疏水性大孔丙烯酸树脂作为载体，酶负载量可达200 mg/g，在10 m<sup>3</sup>批次反应器中连续反应72 h，生物柴油得率提高30%以上<sup>[68]</sup>。此外，连续流反应器的设计也直接影响工艺效率，如固定床反应器在青霉素酰化酶生产6-APA的工艺中可稳定运行30 d，酶活性保留率达80%以上<sup>[69]</sup>。

固定化酶的产业化应用效果显著体现在操作稳定性和经济效益两方面。研究表明，不同固定化方法的酶半衰期差异显著：共价结合的脂肪酶、吸附固定的葡萄糖异构酶和交联-包埋的纤维素酶均展现出优异的稳定性，这得益于载体改性、添加剂保护和工艺优化等策略<sup>[70-71]</sup>。从经济角度看，固定化工艺使酶成本占比从40%~60%降至10%~20%，下游分离成本显著降低，如固定化乳糖酶生产低乳糖牛奶的投资回报周期仅3年，同时减少50%~70%的酶用量和废水负荷<sup>[72]</sup>。

#### 1.4.3 辅因子再生系统设计

辅因子再生是多酶级联设计的核心环节，其重要性主要体现在三个方面：第一，辅因子[如NAD(P)H、ATP等]作为电子或能量载体，在多酶级联反应中往往需要化学计量消耗，若不进行再生将大幅提高生产成本；第二，辅因子再生系统可以打破反应平衡限制，推动级联反应向目标产物方向进行；第三，高效的再生技术能够提升整体催化效率，使级联体系具备工业化应用价值。

在技术发展历程中，酶偶联再生系统率先取得突破。甲酸脱氢酶(FDH)因其高稳定性成为NADH再生的黄金标准，Yao团队<sup>[73]</sup>通过定向进化获得的FDH变体，并成功应用于甲酸脱氢酶和L-亮氨酸脱氢酶的共表达，实现L-苯丙氨酸的工业化生产。电化学再生作为外源能量输入手段，需与酶级联反应界面耦合，其效率取决于生物-非生物界面的传质优化。Goran等<sup>[74]</sup>开发了氮掺杂碳纳米管电极，通过表面羧基定向固定NAD<sup>+</sup>分子，实现NADH再生法拉第效率98%，电流密度达15 mA/cm<sup>2</sup>。这些再生技术的突破使得辅因子成本从占总成本的70%降至不足5%，大幅提升了级联体系的经济性。

#### 1.4.4 系统集成与过程强化技术

系统集成与过程强化技术通过优化反应器设计、改善传质传热效率以及实现精准过程控制，显著提升了级联催化体系的整体性能。近年来，该领域主要形成了三大技术方向：微反应器技术、智能响应系统和模块化集成策略。

微反应器技术因其优异的传质性能和精确的停留时间控制，成为多酶级联过程强化的首选方案。如Shi团队<sup>[75]</sup>设计一种新型的全液体微控流芯片，通过层叠组装策略及多糖多层修饰微通道技术，极大地提高了酶固定化时微通道的机械性能，并提供了一种可生物降解的环境友好微环境。智能响应系统通过环境刺激调控酶活性，实现了催化过程的动态优化。福州大学林子庵课题组<sup>[76]</sup>利用供体-受体COF作为光响应氧化酶模拟物，建立可视化检测平台，应用于复杂生物体系中痕量谷胱甘肽(GSH)的高灵敏检测；而pH敏感型多酶复合体(如组氨酸标签修饰的转氨酶)能自适应底物浓度变化，在pH微环境中自发组装，转化率提升3.2倍<sup>[77]</sup>。这类系统特别适用于需要实时调节的多底物转化过程。模块化集成策略则大幅提升了系统灵活性，Kightlinger等<sup>[78]</sup>开发的平台基于碳代谢、碳同化、蛋白质糖基化和非核糖体多肽合成等四类具有代表性的新型人工构建的主反应模块，使不同级联路径的切换时间从72 h缩短至4 h。这些创新技术正在推动多酶级联催化从实验室规模向工业化生产快速转化，为绿色生物制造提供了强有力的技术支撑。

#### 1.4.5 先进表征与调控技术

先进表征与调控技术为多酶级联催化体系的精准设计和实时优化提供了关键工具，其核心价值在于实现了从宏观反应现象到分子机制的多尺度解析与精确控制。在表征技术层面，高时空分辨技术的突破性发展使得研究人员能够实时捕捉酶-底物相互作用、中间体传递和辅因子循环等关键过程。在调控技术层面，新兴的生物正交化学工具和智能响应材料为多酶体系的动态调控提供了全新手段。Lou等<sup>[79]</sup>开发的新型体外多酶级联催化系统，可通过不同波长光照可逆地激活或抑制特定酶活性，实现七酶级联反应的时序控制。这项技术进步不仅深化了对多酶协同机制的理解，

更使催化体系的性能调控从经验试错迈向理性设计。

尽管多酶级联催化技术发展迅速，当前体系仍面临多重技术瓶颈：定向进化过程中普遍存在的“功能-稳定性”权衡效应。研究表明，当通过易错 PCR 获得活性提升 3~5 倍的突变体时，约 65% 的变异株会出现 DNA 解链温度 ( $T_m$  值) 降低 5~15 °C 的现象<sup>[80]</sup>。另外，固定化技术虽然提高了酶的重复利用性，但共价固定化易导致初始活性损失，而物理吸附法则导致酶脱落率变高。除此以外，辅因子再生系统的能量转换效率仍是瓶颈，即便是最先进的光驱动体系其量子效率也仅维持在 12%~15% 范围<sup>[81]</sup>。这些技术短板严重制约了多酶级联体系在工业化场景中的实际应用效能。

### 1.5 体外多酶级联反应在绿色生物制造领域的竞争性优势

传统反应体系在绿色生物制造中存在的显著缺陷主要体现在三个方面。第一，以微生物发酵法为代表的传统生物制造工艺虽然具有操作简单的优势，但其产物分离纯化工艺复杂、产率受限等问题突出。由于培养基成分复杂，下游分离往往需要过膜处理等多道工序，大幅推高生产成本；同时细胞内复杂的代谢网络会导致中间代谢物被生长消耗，严重影响终产物得率。第二，化学合成法虽然可以避免生物法的一些局限，但面临着原子经济性差、反应条件苛刻等问题，不仅能耗大，还会产生大量含重金属的废弃物。第三，无论是发酵法还是化学合成法，都面临着严重的环境可持续性问题：发酵法会产生大量废水，而化学法则每年导致约 3000 吨催化剂污染环境，同时产生大量碳足迹。这些根本性缺陷使得传统反应体系在产物纯度、生产灵活性和综合成本等方面都难以满足现代绿色制造的要求<sup>[82]</sup>。体外多酶级联反应作为绿色生物制造的核心技术，正在重塑现代工业生产模式。

#### 1.5.1 原子经济性与高选择性

通过精确控制酶催化序列，可实现近 100% 的原子利用率，大幅减少副产物生成。相较于传统化学合成，避免使用重金属催化剂和有机溶剂。

以 Merck 公司开发的抗糖尿病药物西格列汀生物合成路线为例，转氨酶级联系统将每生产 1 kg 期望产品与同时产生的废物质量的比值从传统工艺的 52 降至 0.3，同时消除了重金属催化剂的使用<sup>[83]</sup>。这种精准催化特性使生产过程基本不产生有毒副产物，完美契合“零排放”的绿色化学原则。

#### 1.5.2 温和反应条件

在能源效率和反应条件方面，多酶级联展现出传统化工无法比拟的优势。典型的酶催化反应在常温常压下即可高效进行，能耗仅为同类化学工艺的 30%~50%。例如利用脂肪酶级联系统生产生物柴油，反应温度从化学法的 220 °C 降至 35 °C，年节省蒸汽消耗 15 万吨<sup>[84]</sup>。更重要的是，这些温和条件使生产过程无需耐高压设备，大幅降低了基础设施投资成本，为中小型企业采用绿色制造技术提供了可能。

#### 1.5.3 可持续性优势

从可持续发展维度看，多酶级联技术实现了全方位的绿色革新。研究表明，与传统工艺相比，酶级联工艺可减少 80%~90% 的碳足迹，节约 95% 的有机溶剂用量。酶本身完全可生物降解的特性，彻底解决了化学催化剂的重金属污染问题<sup>[85]</sup>。更关键的是，这些系统可以直接利用农林废弃物等可再生原料，浙江大学团队开发的纤维素酶级联系统能将玉米秸秆高效转化为平台化学品，原料成本降低 70%<sup>[86]</sup>。

## 2 多酶级联反应的实验思路和流程设计

### 2.1 多酶级联反应的实验思路

多酶级联反应的实验设计需遵循“模块化构建、协同化优化、系统化集成”的原则。首先要从反应路径的合理规划入手，基于生物合成原理设计可行的酶催化序列，并通过热力学分析确保各步骤的能量可行性。在酶元件选择方面，需要综合考虑催化效率和特异性，必要时通过蛋白质工程技术对关键酶进行改造优化。同时要特别关注不同酶之间的协同作用，包括最佳配比确定和反应条件协调。

Li 等<sup>[87]</sup>在胞苷一磷酸 (CMP) 的生物合成路

径设计中采用了创新的简化策略。与传统的以葡萄糖为起始底物的全合成路径不同,该研究直接选用胞苷作为前体物质,通过构建精简的两酶级联系统实现高效转化。该系统的核心在于:①胞嘧啶核苷激酶(CK)催化胞苷的磷酸化反应生成CMP;②为克服ATP消耗的能障,创造性引入ADP激酶(PPK)构建ATP再生循环。这种精巧的路径设计不仅将酶的种类数量最小化,而且通过辅因子循环系统显著提升了反应的经济性,如图3(a)所示。该研究为核苷酸类化合物的高效生物合成提供了范式转变,展示了级联反应设计中“少即是多”的优化理念。另外,实现多酶系统最佳配比和反应条件协调需要采取多维度优化策略。基于约束基平衡分析和动力学模拟可以进行理论预测,如采用的代谢通量分析和酶动力学建模可直接用于预测多酶级联中的限速步骤(如酪氨酸途径中的TyrA或HpaB酶),为最佳酶比例提供理论依据<sup>[88]</sup>。

其次,在反应体系构建阶段,固定化技术的选择至关重要。不同的载体材料和固定化方法会显著影响酶的活性和稳定性,需要根据具体反应特性进行针对性设计。反应器的选型和参数控制同样关键,良好的传质传热性能是保证反应效率的基础。工艺优化则需要从动力学、热力学和经济性等多个维度进行综合评估,建立科学合理的评价体系。以Emam等<sup>[89]</sup>的研究为例,在构建葡萄糖异构化级联反应时,比较了共价固定与包埋固定两种策略:前者实现了85%的活性保留率但载酶量较低,后者载酶量可达50 mg/g但存在底物扩散限制。该团队最终开发了分级多孔载体,完美平衡了载酶量与传质效率。

最后,性能验证和放大生产是检验级联反应可行性的关键环节。在实验室规模验证达到预期指标后,需要按照规范的放大原则逐步扩大生产规模,同时持续监测关键参数的变化。当前该领域正在向智能化方向发展,机器学习等新技术的引入为酶组合预测和工艺优化提供了新工具。如Zhao等<sup>[90]</sup>开发的Deep Cascade平台,通过机器学习分析超过10 000组酶组合数据,预测准确率达89%,成功指导了新型 $\beta$ -内酰胺抗生素级联路线的设计。

这种系统化的设计思路已经在多个重要化合

物的绿色合成中取得成功应用,展现出显著的技术优势。未来随着表征技术和调控手段的进步,多酶级联反应将在更广阔的领域实现产业化应用,为绿色制造提供新的技术解决方案。创新的反应器设计和过程强化技术将进一步提升反应效率和经济性。

## 2.2 多酶级联反应的整体流程设计

多酶级联反应体系的构建需要采用系统工程的思维,重点围绕三个核心环节展开:首先,在催化路线设计阶段,需综合考虑各步反应的底物/产物匹配度及其理化性质、成本和产率等关键因素,可借鉴现有细胞代谢网络进行合理性评估和动态调整;其次,在酶元件挖掘环节,应结合反应机理分析和生物信息学工具,从现有数据库中筛选和鉴定合适的生物催化剂;最后,通过定向进化、理性设计等方法对关键酶进行改造优化,并系统调整反应条件参数,实现整体催化性能的提升。这种多尺度协同优化的设计理念,将推动多酶级联体系从基础研究向产业化应用转化。

### 2.2.1 智能调控驱动的实验设计思路

多酶级联反应的创新设计需要融合合成生物学、酶工程与过程工程的多学科策略。在分子尺度上,人工智能辅助的酶设计正成为研究热点。例如,中国科学院微生物研究所的吴边团队<sup>[91]</sup>通过使用人工智能计算技术,对芽孢杆菌来源的天冬氨酸酶进行了分子重设计,成功获得了一系列具有绝对位置选择性与立体选择性的人工 $\beta$ -氨基酸合成酶。利用Rosetta、FoldX设计丝氨酸水解酶活性位点、立体选择性和热稳定性的方法,通过QM/MM模拟和特异性打分函数优化,实现了药物合成、环境修复等领域的酶性能突破(如对硝基苯酯酶活性提升400倍、乙酰胆碱酯酶突变体催化阿托品中间体不对称合成e.e.值达98%等),相比传统方法显著缩短开发周期60%~80%<sup>[54]</sup>。

### 2.2.2 多尺度耦合的流程构建

在纳米-微米尺度,酶的空间组织化研究取得重要突破。丁宝全团队<sup>[92]</sup>利用DNA折纸技术构建了精确间距为8.6 nm的六酶级联体系,通过优化酶间距离使底物通道效应达到最优,整体催化效

率提高7.3倍。在反应器设计方面, Xu等<sup>[93]</sup>开发的微流控-电化学耦合系统实现了辅因子的原位再生, 将传统分批式反应的24 h周期缩短至35 min。

### 2.2.3 产业落地的创新路径

在高值化学品生产领域, 多酶级联技术已实现多个成功案例。例如, 江南大学邓禹团队<sup>[94]</sup>开发的己二酸生物合成路线, 通过精确调控葡萄糖分流比例和NADH再生效率, 提高碳原子利用率, 较传统石油基路线大幅度降低碳排放。Li等<sup>[95]</sup>对生物法尼龙单体生产线的生命周期评估表明, 智能调控的多酶体系可使能耗降低35%、废水排放减少80%, 预计投资回收期仅2.7年。

## 3 体外多酶级联反应在绿色生物制造领域的应用

### 3.1 手性中间体合成

多酶级联反应在手性中间体合成领域展现出卓越的催化性能, 其通过多酶协同催化网络实现了传统化学方法难以达到的高效不对称合成。研究表明, 这类系统可稳定获得e.e.>99%的手性产物, 显著优于传统化学催化方法<sup>[96]</sup>。在实际应用中, 这一技术已取得显著成果。其优势主要体现在以下方面:

#### 3.1.1 手性醇的合成

通过醇脱氢酶催化氧化还原反应, 实现手性醇去消旋化和立体翻转。1,4-丁二醇是一种重要的化学品中间体, 中国是世界上最大的1,4-丁二醇消费国, 占全世界销售市场70%以上, 全球年需求量在300万吨以上且需求增速保持在10%左右, 随着1,4-丁二醇市场需求日益旺盛, 利用酶法进行制备是当前研究热点之一, 1,4-丁二醇的合成主要以化学法为主, 以乙炔、丁烷、丁二烯等物质为起始物料合成, 过程烦琐且涉及大量有毒有害试剂, 也涉及较多危险化学步骤如高压等。在利用生物法对化学合成路线替代研究中, 郭艺鸣等<sup>[97]</sup>构建了一条以 $\gamma$ -丁内酯为底物合成1,4-丁二醇的体外酶级联催化合成体系, 主反应一共有三步, 涉及三种酶[己内酯水解酶(ChnC)、羧酸还原酶(CAR)和醇脱氢酶(ADH)], 还引入甲酸脱氢

酶(FDH)构建NADH/NAD<sup>+</sup>辅酶循环体系, 如图3(b)所示, 最终1,4-丁二醇的产量最高达到2.41 g/L, 摩尔转化率为67.3%。微生物发酵法虽产量更高, 但存在产物分离复杂、周期长等局限<sup>[98]</sup>。

#### 3.1.2 手性胺合成

通过转氨酶催化作用可实现酮酸类底物向手性胺高效转化<sup>[99]</sup> [图3(c)]。在抗丙肝药物索磷布韦中间体合成中, Paradisi等将转氨酶与亚胺还原酶联用, 开发出四酶级联系统, 使反应收率从传统路线的65%提升至92%<sup>[100]</sup>。罗氏制药报道的帕博利珠单抗关键手性胺中间体生产工艺中, 采用热稳定性提升的转氨酶突变体与甲酸脱氢酶级联系统, 在100 m<sup>3</sup>反应器中实现连续生产30批次, 催化剂保留率>90%<sup>[101]</sup>。这些案例充分证明, 转氨酶级联技术已成为手性胺工业化生产的重要平台技术。

### 3.2 天然产物合成

多酶级联反应在天然产物合成中也有广泛应用。例如, 通过多酶级联反应, 可以实现肌醇、D-甘露醇等天然产物高效合成。肌醇是人、动物与微生物生长的必需物质, 广泛应用于饲料、医药和食品等行业, 2024年全球肌醇市场销售额达到了1.44亿美元, 预计2031年将达到1.94亿美元, 年复合增长率为4.4%。肌醇生产主要有水解法和化学合成法。随着生物技术快速发展, 肌醇也可以通过微生物发酵法进行制备<sup>[102]</sup>。魏梓佳等<sup>[103]</sup>研究利用体外多酶级联体系进行肌醇产品合成制备, 筛选并表达来源于*Novibacillus thermophilus*和*Caldivirga maquilensis*的肌醇-1-磷酸合酶, 整个多酶级联体系包括四个连续酶催化反应, 如图3(d)所示, 涉及的生物酶包括 $\alpha$ -葡聚糖磷酸化酶、磷酸葡萄糖变位酶、肌醇-1-磷酸合酶和肌醇单磷酸酶, 以淀粉为起始底物进行肌醇合成制备, 最终肌醇产量达到42.3 g/L, 转化率为84.6%。

D-甘露醇广泛分布于植物中, 作为抗肿瘤药物和免疫刺激剂重要前体广泛应用于制药和医疗等行业, 2024年该品全球市场为9亿美元, 其中北美市场占到30%以上, 是D-甘露醇主要的消费地区。化学上通过D-果糖和D-甘露糖还原制备获得。D-甘露醇生物法制备策略可以通过甘露糖脱氢酶和葡萄糖脱氢酶协同作用, 实现D-果糖向D-甘露

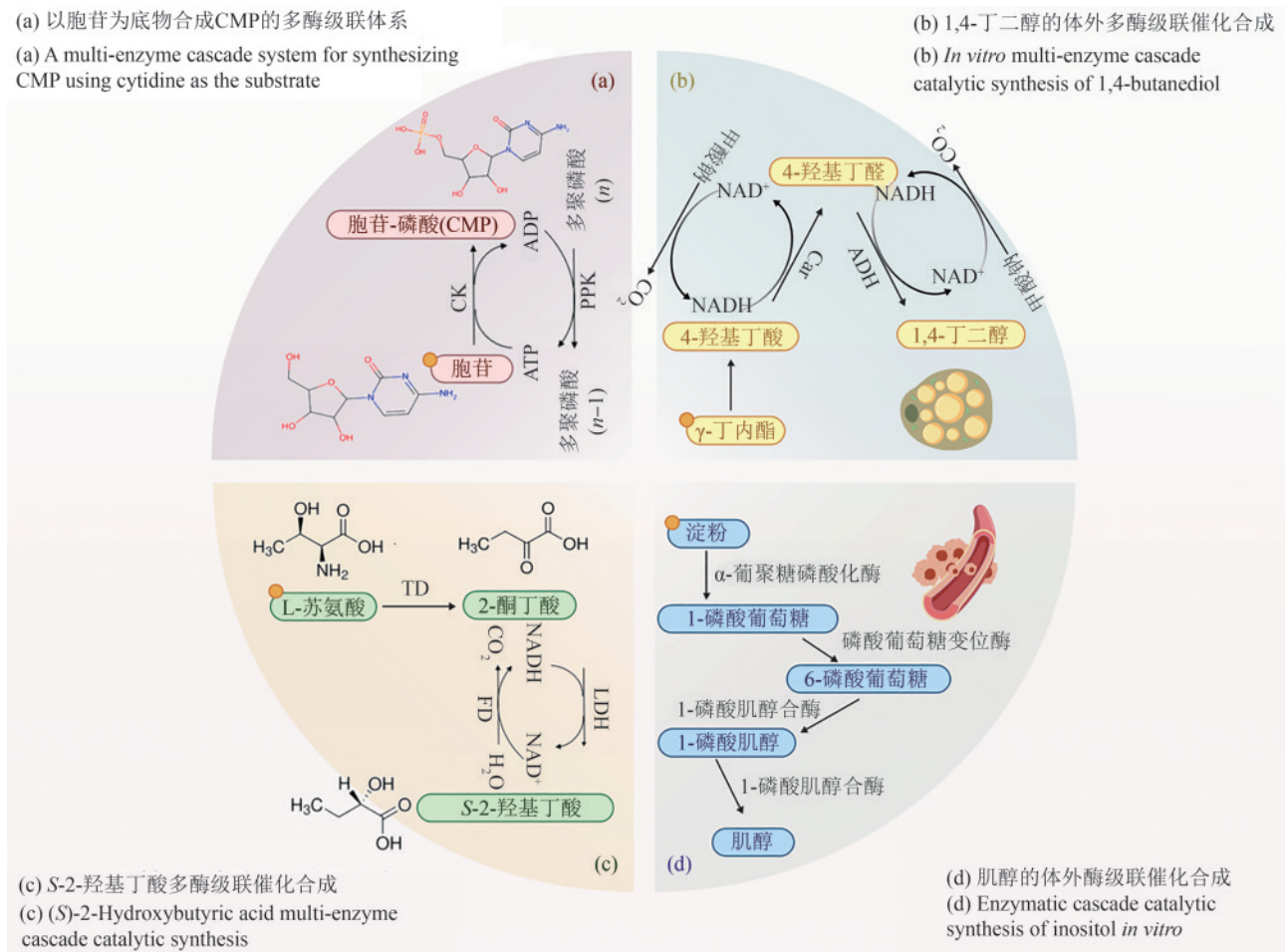


图3 体外多酶级联体系催化合成应用实例<sup>[19]</sup>

(图3使用 BioGDP.com制作)

Fig. 3 Application examples of *in vitro* multi-enzyme cascade system for catalytic synthesis<sup>[19]</sup>

(Fig. 3 was created with BioGDP.com)

醇高效转化。潘珊等<sup>[104]</sup>针对目前单一酶法合成D-甘露醇成本昂贵无法应用于工业化生产的现状,设计双酶级联反应催化底物D-果糖合成D-甘露醇,该体系包括甘露糖脱氢酶(MDH)和葡萄糖脱氢酶(GDH),并对多酶级联体系进行催化条件优化,在最适条件下D-甘露醇最高产量为81.9 g/L,摩尔转化率为81.9%。

因此,体外多酶级联反应体系在工业生物制造领域主要聚焦于两大核心应用方向:其一为高附加值中间体的生物催化合成,通过理性设计转氨酶、脱氢酶、还原酶等工具酶的级联网络,实现手性药物中间体及精细化学品的高效制备;其二为天然产物的全酶法合成,涵盖碳水化合物(如肌醇、D-甘露醇)、脂质(如结构磷脂)、蛋白

质(如活性肽段)以及其他次级代谢产物(如黄酮类、萜类)的酶催化合成。这两大应用领域均体现出多酶级联技术在立体选择性控制、原子经济性和过程强化等方面的显著优势,为绿色生物制造提供了创新解决方案(表1)。

## 4 局限与展望

### 4.1 体外多酶级联反应局限性

多酶级联反应体系对酶蛋白的性能有着严格要求,主要体现在以下几个方面:酶的热稳定性、纯度水平、最适反应温度及pH范围等关键参数。值得注意的是,约80%的已知酶类需要金属离子

表1 体外多酶催化应用案例比较分析表

Table 1 Comparative analysis table of application cases of *in vitro* multi-enzyme catalysis

应用领域	酶系统组成	设计思路	性能指标	优势	参考文献
1,4-丁二醇合成	己内酯水解酶+羧酸还原酶+醇脱氢酶	三酶级联简化化学路线 辅酶循环(FDH)	替代高压化学法 减少有毒试剂使用	产量2.41 g/L 反应步骤从9步减至3步	[97]
S-2-羟基丁酸	苏氨酸脱氨酶+乳酸脱氢酶+甲酸脱氢酶	动态动力学拆分 NADH循环系统	高转化率(97%) 光学纯度>99%	产量143 g/L 无需外源辅酶	[99]
索磷布韦中间体	转氨酶+亚胺还原酶	适配NADPH再生系统 选择热稳定性突变体	产物e.e.值>99.5% 高转化率(>90%)	产率提升至92% 半衰期延长至120 h	[100]
手性胺合成	转氨酶+甲酸脱氢酶	热力学耦合设计 辅酶NADH原位再生	原子经济性>98% 产物e.e.值>99.9%	时空产率8.3 g/(L·h) 辅酶周转数12000	[101]
肌醇合成	淀粉磷酸化酶+肌醇-1-磷酸合酶等四酶	以淀粉为廉价底物 仿生代谢路径重构	转化率84.6% 成本较化学法低70%	产量42.3 g/L 4步反应“一锅法”	[103]
D-甘露醇生产	甘露糖脱氢酶+葡萄糖脱氢酶	双酶辅因子循环 底物通道效应优化	摩尔转化率81.9% 避免化学还原步骤	产量81.9 g/L 反应条件温和	[104]

作为辅助因子参与催化过程。目前，工业上主要通过基因工程菌发酵来获取目标酶蛋白。相较于使用粗酶液，纯酶制剂虽然能有效避免副反应，但其制备过程涉及复杂的分离纯化工艺，包括超滤、色谱分离等步骤，导致生产成本显著增加。特别对于工业化大规模应用而言，这一过程不仅耗时费力，更会大幅提升整体生产成本。此外，多数酶催化反应还需依赖价格昂贵的辅酶、辅因子，这些因素共同导致传统多酶级联反应的工业应用面临严峻的经济性挑战。以典型的转氨酶催化体系为例，辅因子成本可占整个生产过程总成本的30%~40%，这极大限制了该技术在工业规模的实际应用。

多酶级联反应体系在实际应用中面临的一个重要挑战是对长线路催化路线的适应性不足。当反应路径涉及的酶种类增加时，系统复杂度呈指数级上升，主要体现在以下几个方面：首先，每增加一种酶都需要单独构建工程菌株进行发酵生产，使得整个生产工艺流程变得异常繁杂；其次，不同酶的最适反应条件（温度、pH、金属离子需求等）存在显著差异，导致多酶体系的协同调控难度大幅增加；更重要的是，随着催化步骤的延长，反应总产率往往因中间产物的累积和副反应的发生而显著降低。此外，辅酶再生系统的引入虽然解决了辅因子消耗问题，但进一步增加了体系的复杂度。这些因素共同导致某些复杂化合物的酶法合成成本与传统化学合成相比并不具备竞争优势。

针对这些挑战，当前研究主要聚焦于三个关键方向：一是基于宏基因组学和计算生物学的酶元件规模化挖掘技术<sup>[105]</sup>；二是结合人工智能的酶理性设计与定向进化方法<sup>[106]</sup>；三是基于连续流生物制造工艺的酶-细胞耦合系统优化<sup>[107]</sup>。这些创新方法显著提升了微生物体内多酶级联催化的效率。未来，随着酶工程技术和系统生物学的发展，有望突破现有局限，实现更复杂、更高效的多酶催化网络构建。

## 4.2 多酶级联反应的未来发展趋势

多酶级联反应作为合成生物学与绿色生物制造的核心技术，其未来发展将在技术创新、产业应用、社会发展和伦理治理四个维度呈现深度融合趋势。

在技术创新层面，人工智能与量子计算的结合将推动酶分子设计进入精准预测时代，实现非天然酶的高效创制；模块化反应体系与仿生细胞器策略的协同发展，有望突破传统催化限制；而智能反应器与数字孪生技术的集成应用，将显著提升规模化生产效率。特别值得关注的是，体外生物转化技术的突破性进展，如基于多酶系统的二氧化碳固定与转化技术，通过模拟光合作途径构建的人工固碳酶级联反应，已实现从CO<sub>2</sub>到淀粉等复杂分子的高效合成，为碳中和技术提供了全新解决方案。这些技术进步为多酶级联反应的广泛应用奠定了坚实基础<sup>[108]</sup>。

从产业应用角度看，该技术正在向高附加值

领域快速渗透。在医药领域，复杂手性药物的全酶法合成将改变传统制药模式；在材料科学领域，生物基单体的高效制备为可持续发展提供新途径；在能源领域，CO<sub>2</sub>资源化利用技术可能成为碳中和的关键解决方案。特别值得注意的是，分布式制造模式的兴起将重构现有供应链体系，推动生物制造向智能化、柔性化方向发展。这些应用拓展将显著提升多酶级联技术的经济价值和社会效益。

从社会发展维度，多酶级联技术的普及将对社会经济发展产生深远影响。一方面，生物制造对传统化工的替代效应可能引发产业格局重塑，创造新的经济增长点；另一方面，该技术在降低能耗、减少污染方面的优势，将有力推动绿色可持续发展。然而，技术扩散过程中的“关键酶技术壁垒”问题需要引起重视，确保发展中国家的公平参与。此外，生物制造带来的就业结构变化也要求相应的教育培训体系改革，以实现人才的平稳转型。

从伦理治理方面，多酶级联体系将呈现系统化、前瞻性的发展趋势。其核心在于构建动态适应的治理框架，重点包括三个维度：首先，在风险管控层面，将建立涵盖分子、细胞到生态系统的多级评估体系，特别关注工程酶的环境释放风险和基因水平转移可能性；其次，在监管机制方面，将实现从基因元件设计、工艺开发到产业应用的全生命周期管理，并推动国际标准协同；最后，在治理理念上，将深度融合负责任创新原则，通过技术预见、利益相关方参与和透明度建设，平衡创新速度与生物安全。

未来十年，多酶级联反应技术将迎来跨越式发展，呈现技术创新加速、应用边界拓展和产业影响深远的特征。本综述系统性地聚焦于体外多酶级联催化体系，通过建立基于反应拓扑学的四类级联模型（线性/趋同/平行/循环），揭示了其独特的动力学优势与分子机制，整合了AI驱动的酶理性设计、纳米限域空间组织和光/电辅因子再生等突破性技术，构建了涵盖计算流体力学建模、载体界面工程和微环境调控的跨尺度优化体系。当前，该技术已在手性药物中间体和高值天然产物合成等领域实现产业化突破，显著推动了绿色制造工艺革新。未来，要实现多酶级联技术的全

部潜力，必须加强基础研究与应用研究的深度协同，重点突破动态微环境适配、AI辅助酶网络设计和连续流规模化制备等关键方向。同时，国际合作的强化和负责任创新框架的建立将助力解决全球性挑战，使多酶级联技术真正成为绿色制造体系的核心支柱，最终推动工业生产方式向可持续范式转型，为人类社会高质量发展提供重要理论支撑与技术路径。

## 参 考 文 献

- [1] WATARI T, HATA S, NAKAJIMA K, et al. Limited quantity and quality of steel supply in a zero-emission future[J]. *Nature Sustainability*, 2023, 6(3): 336-343.
- [2] SHELDON R A, WOODLEY J M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(2): 801-838.
- [3] SCHRITTWIESER J H, VELIKOGNE S, HALL M, et al. Artificial biocatalytic linear cascades for preparation of organic molecules[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 270-348.
- [4] XIAO Y Q, FENG C, FU J, et al. Band structure engineering and defect control of Ta<sub>3</sub>N<sub>5</sub> for efficient photoelectrochemical water oxidation[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(11): 932-940.
- [5] ROSA R, SPINELLI R, NERI P, et al. Life cycle assessment of chemical vs enzymatic-assisted extraction of proteins from black soldier fly prepupae for the preparation of biomaterials for potential agricultural use[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(39): 14752-14764.
- [6] 国家统计局社会科技和文化产业统计司. 中国高技术产业统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2023. Department of Social Science, Technology and Cultural Industry Statistics, National Bureau of Statistics. *Statistical yearbook of China's high-tech industries*[M]. Beijing: China Statistics Press, 2023.
- [7] WU B, WANG Y W, DAI Y H, et al. Current status and future prospective of bio-ethanol industry in China[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 145: 111079.
- [8] DENG W P, YAN L F, WANG B J, et al. Efficient catalysts for the green synthesis of adipic acid from biomass[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(9): 4712-4719.
- [9] LI M, ZHANG Z J, KONG X D, et al. Engineering *Streptomyces coelicolor* carbonyl reductase for efficient atorvastatin precursor synthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(12): e00603-17.
- [10] DARGÓ G, KIS D, RÁDULY A, et al. Furandicarboxylic acid

- (FDCA): electrosynthesis and its facile recovery from polyethylene furanoate (PEF) via depolymerization[J]. *ChemSusChem*, 2025, 18(3): e202401190.
- [11] MOKALE KOGNOU A L, SHRESTHA S, JIANG Z H, et al. High-fructose corn syrup production and its new applications for 5-hydroxymethylfurfural and value-added furan derivatives: promises and challenges[J]. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2022, 7(3): 148-160.
- [12] 李举谋, 石焜, 张志钧, 等. 多酶级联反应的构建及其在双官能团功能化学品合成中的应用[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2158-2189.
- LI J M, SHI K, ZHANG Z J, et al. Construction of multi-enzyme cascade reactions and its application in the synthesis of bifunctional chemicals[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2158-2189.
- [13] LOPEZ-GALLEGO F, SCHMIDT-DANNERT C. Multi-enzymatic synthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14(2): 174-183.
- [14] KANG W, MA T, LIU M, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4248.
- [15] ABIDIN M Z, SARAVANAN T, ZHANG J L, et al. Modular enzymatic cascade synthesis of vitamin B<sub>5</sub> and its derivatives [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2018, 24(66): 17434-17438.
- [16] DONG H R, GUO N X, HU D C, et al. Chemoenzymatic total synthesis of alchivemycin A[J]. *Nature Synthesis*, 2024, 3(9): 1124-1133.
- [17] SHI Q C, ZHANG B Y, WU Z H, et al. Cascade catalytic systems for converting CO<sub>2</sub> into C<sub>2+</sub> products[J]. *ChemSusChem*, 2025, 18(7): e202401916.
- [18] 郭华, 张蕾, 董旭, 等. 固定化多酶级联反应器[J]. *化学进展*, 2020, 32(4): 392-405.
- GUO H, ZHANG L, DONG X, et al. Immobilized multi-enzyme cascade reactor[J]. *Progress in Chemistry*, 2020, 32(4): 392-405.
- [19] JIANG S, LI H Q, ZHANG L, et al. Generic diagramming platform (GDP): a comprehensive database of high-quality biomedical graphics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2025, 53(D1): D1670-D1676.
- [20] GAO Y, LI F, LUO Z S, et al. Modular assembly of an artificially concise biocatalytic cascade for the manufacture of phenethylisoquinoline alkaloids[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 30.
- [21] KHOBRAGADE T P, SARAK S, PAGAR A D, et al. Synthesis of sitagliptin intermediate by a multi-enzymatic cascade system using lipase and transaminase with benzylamine as an amino donor[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 757062.
- [22] SIEGEL J B, ZANGHELLINI A, LOVICK H M, et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction[J]. *Science*, 2010, 329(5989): 309-313.
- [23] WANG C, ZHANG H Y, WANG Y, et al. A general strategy for the synthesis of hierarchically ordered metal-organic frameworks with tunable macro-, meso-, and micro-pores[J]. *Small*, 2023, 19(3): 2206116.
- [24] YIM H, HASELBECK R, NIU W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(7): 445-452.
- [25] RAUTER M, NIETZ D, KUNZE G. Cutinase ACut2 from *blastobotrysrainosifermentans* for the selective desymmetrization of the symmetric diester diethyl adipate to the monoester monoethyl adipate[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1316.
- [26] WANG F H, QI H B, LI H M, et al. State-of-the-art strategies and research advances for the biosynthesis of D-amino acids [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2024, 44(4): 495-513.
- [27] SUN Y P, SHU T, MA J X, et al. Rational design of ZIF-8 for constructing luminescent biosensors with glucose oxidase and AIE-type gold nanoclusters[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(7): 3408-3417.
- [28] ENGEL J, BORNSCHEUER U T, KARA S. Kinetics modeling of a convergent cascade catalyzed by monooxygenase-alcohol dehydrogenase coupled enzymes[J]. *Organic Process Research & Development*, 2021, 25(3): 411-420.
- [29] ZHANG D P, JING X R, ZHANG W L, et al. Highly selective synthesis of D-amino acids from readily available L-amino acids by a one-pot biocatalytic stereoinversion cascade[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(51): 29927-29935.
- [30] LI S F, ZHANG W, ZHANG W, et al. Recent advances in the synthesis and analysis of atorvastatin and its intermediates[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2024, 31(37): 6063-6083.
- [31] TIBREWAL N, TANG Y. Biocatalysts for natural product biosynthesis[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2014, 5: 347-366.
- [32] MONTERREY D T, AZCONA L, REVUELTA J, et al. Polyphosphate kinase from *Burkholderia cenocepacia*, one enzyme catalyzing a two-step cascade reaction to synthesize ATP from AMP[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(23): 12995.
- [33] XIAO W L, HUANG T E, ZHOU J, et al. Inhibition of MAT2A impairs skeletal muscle repair function[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(9): 1098.

- [34] RODRIGUEZ-ABETXUKO A, REIFS A, SÁNCHEZ-DEALCÁZAR D, et al. A versatile chemoenzymatic nanoreactor that mimics NAD(P)H oxidase for the *in situ* regeneration of cofactors[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(39): e202206926.
- [35] SHI J F, WU Y Z, ZHANG S H, et al. Bioinspired construction of multi-enzyme catalytic systems[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(12): 4295-4313.
- [36] PENG T, TIAN J, ZHAO Y Y, et al. Multienzyme redox system with cofactor regeneration for cyclic deracemization of sulfoxides[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(37): e202209272.
- [37] GHIMIRE N, OH T J. Cell-free system for one-pot production of protocatechuate *via* a two-enzyme cascade with coenzyme regeneration[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 306: 141269.
- [38] ZHOU M J, BOUZZAOUI S, JONES L E, et al. Isolation and structural determination of non-racemic tertiary cathinone derivatives[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2015, 13(37): 9629-9636.
- [39] DEL VECCHIO D. Modularity, context-dependence, and insulation in engineered biological circuits[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(2): 111-119.
- [40] KIM Y C, YOO H W, PARK B G, et al. One-pot biocatalytic route from alkanes to  $\alpha$ ,  $\omega$ -diamines by whole-cell consortia of engineered *Yarrowia lipolytica* and *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(7): 2188-2198.
- [41] SAVILE C K, JANEY J M, MUNDORFF E C, et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture[J]. *Science*, 2010, 329(5989): 305-309.
- [42] HUANG X Q, FENG J Q, CUI J W, et al. Photoinduced chemomimetic biocatalysis for enantioselective intermolecular radical conjugate addition[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(7): 586-593.
- [43] NGUYEN L T, YANG K L. Combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase for catalyzing cascade chemical reactions[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 100: 52-59.
- [44] FERNANDES C G, SAWANT S C, MULE T A, et al. Enhancing cellulases through synergistic  $\beta$ -glucosidases for intensifying cellulose hydrolysis[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 120: 202-212.
- [45] YU X, CHEN X Y, YU H L, et al. Regio- and stereo-selective amination of fatty acids to  $\alpha$ -amino acids by a three-step one-pot cascade[J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(9): 3469-3474.
- [46] CUI J D, QIU J Q, FAN X W, et al. Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2014, 34(3): 258-268.
- [47] 任杰, 曾安平. 基于二氧化碳的生物制造: 从基础研究到工业应用的挑战[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 854-862.
- REN J, ZENG A P. CO<sub>2</sub> based biomanufacturing: from basic research to industrial application[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 854-862.
- [48] NAM K H. Glucose isomerase: functions, structures, and applications[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(1): 428.
- [49] 徐铮, 徐恺, 陈昱金, 等. 异构酶在生物制造中的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(5): 244-251.
- XU Z, XU K, CHEN Y J, et al. Recent advances on isomerases for bio-manufacturing[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(5): 244-251.
- [50] HAMMER S C, KUBIK G, WATKINS E, et al. Anti-Markovnikov alkene oxidation by metal-oxo-mediated enzyme catalysis[J]. *Science*, 2017, 358(6360): 215-218.
- [51] GUO J M, XU C Y, LI J, et al. Dual role of gluconic acid in the cascading saccharification of hemicellulose and cellulose from various lignocellulosic stuff[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2024, 12(22): 8325-8339.
- [52] XU J, CEN Y X, SINGH W, et al. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(19): 7934-7945.
- [53] SUN S Z, NICHOLLS B T, BAIN D, et al. Enantioselective decarboxylative alkylation using synergistic photoenzymatic catalysis[J]. *Nature Catalysis*, 2023, 7(1): 35-42.
- [54] LAUKO A, PELLOCK S J, SUMIDA K H, et al. Computational design of serine hydrolases[J]. *Science*, 388(6744): 24-54.
- [55] PAN Y J, LI G B, LIU R X, et al. Unnatural activities and mechanistic insights of cytochrome P450 PikC gained from site-specific mutagenesis by non-canonical amino acids[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1669.
- [56] UTHARALA R, GRAB A, VAFAZADEH V, et al. A microfluidic Braille valve platform for on-demand production, combinatorial screening and sorting of chemically distinct droplets[J]. *Nature Protocols*, 2022, 17(12): 2920-2965.
- [57] HOMMA F, HUANG J, VAN DER HOORN R A L. AlphaFold-Multimer predicts cross-kingdom interactions at the plant-pathogen interface[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6040.
- [58] JANG T, SHIN S J, LIM H K, et al. DFT-CES2: quantum mechanics based embedding for mean-field QM/MM of solid-liquid interfaces[J]. *JACS Au*, 2025, 5(4): 2047-2058.

- [59] WU X L, YANG C, GE J. Green synthesis of enzyme/metal-organic framework composites with high stability in protein denaturing solvents[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, 4(1): 24.
- [60] 董玲玲, 李斐焯, 雷航彬, 等. 仿生分区室固定化多酶体系[J]. *合成生物学*, 2024, 5(6): 1518-1529.
- DONG L L, LI F X, LEI H B, et al. Biomimetic compartmentalization immobilization of multi-enzyme system[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(6): 1518-1529.
- [61] 毕春元, 任婷月, 张金玲, 等. 离子交换树脂共固定葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(7): 13-18.
- BI C Y, REN T Y, ZHANG J L, et al. Co-immobilization of glucose oxidase and catalase on ion exchange resin[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(7): 13-18.
- [62] WILLIAMS V, CUI Y X, JIANG X J, et al. Co-immobilized multienzyme system for the cofactor-driven cascade synthesis of (*R*)-2-amino-3-(2-bromophenyl)propanoic acid: a model reaction[J]. *Organic Process Research & Development*, 2022, 26(11): 3024-3033.
- [63] KIM M, LEE C, JEON K, et al. Harnessing a paper-folding mechanism for reconfigurable DNA origami[J]. *Nature*, 2023, 619(7968): 78-86.
- [64] WANG Y, SELIVANOVITCH E, DOUGLAS T. Enhancing multistep reactions: biomimetic design of substrate channeling using P22 virus-like particles[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(13): 2206906.
- [65] YANG L, YUAN Q Y, LI T T, et al. Recent developments and applications of pH-responsive polymers[J]. *Textile Research Journal*, 2025: 00405175241305543.
- [66] GODOY-GALLARDO M, LABAY C, TRIKALITIS V D, et al. Multicompartment artificial organelles conducting enzymatic cascade reactions inside cells[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(19): 15907-15921.
- [67] YE J J, CHU T S, CHU J L, et al. A versatile approach for enzyme immobilization using chemically modified 3D-printed scaffolds[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(21): 18048-18054.
- [68] 苏枫. 微生物脂肪酶的固定化新技术及在生物柴油制备中的应用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- SU F. Improving performance of microbial lipases *via* new immobilization technology and application in biodiesel preparation[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2017.
- [69] 陈坚, Takeshi Omasa, Yoshio Katakura, 等. 固定化酶-离子交换组合系统进行青霉素G水解生产6-APA的模型化研究[J]. *生物工程学报*, 1995, 11(4): 343-349.
- CHEN J, OMASA T, KATAKURA Y, et al. Modeling of penicillin G hydrolysis to 6-APA in an immobilized enzyme-ion exchange system[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1995, 11(4): 343-349.
- [70] 万娟娟, 刘旭峰, 戎海波, 等. 酶固定化技术及固定化酶应用的研究进展[J]. *现代化工*, 2024, 44(S1): 73-79.
- WAN J J, LIU X F, RONG H B, et al. An overview of enzyme immobilizing technologies and application of immobilized enzymes[J]. *Modern Chemical Industry*, 2024, 44(S1): 73-79.
- [71] 尚红岩, 翁绮纹, 练文妃, 等. 纤维素酶固定化工艺条件优化及在甘蔗渣酶解中的应用[J]. *甘蔗糖业*, 2024, 53(5): 42-48.
- SHANG H Y, WENG Q W, LIAN W F, et al. Optimization of cellulase immobilization process conditions and its application in sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis[J]. *Sugarcane and Cane Sugar*, 2024, 53(5): 42-48.
- [72] 徐惠东, 尤扬, 游颖欣, 等. 一种高耐热乳糖酶的异源表达、固定化及酶学性质研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(21): 1-8.
- XU H D, YOU Y, YOU Y X, et al. Heterologous expression and enzymatic characterization of a highly thermostable lactase and its immobilized enzyme[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(21): 1-8.
- [73] TANG C D, ZHANG Z H, SHI H L, et al. Directed evolution of formate dehydrogenase and its application in the biosynthesis of L-phenylglycine from phenylglyoxylic acid[J]. *Molecular Catalysis*, 2021, 513: 111666.
- [74] GORAN J M, FAVELA C A, STEVENSON K J. Investigating the electrocatalytic oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide at nitrogen-doped carbon nanotube electrodes: implications to electrochemically measuring dehydrogenase enzyme kinetics[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(9): 2969-2976.
- [75] LIU T, YIN Y X, YANG Y, et al. Layer-by-layer engineered all-liquid microfluidic chips for enzyme immobilization[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(5): 2105386.
- [76] LI G R, MA W D, YANG Y X, et al. Nanoscale covalent organic frameworks with donor-acceptor structures as highly efficient light-responsive oxidase-like mimics for colorimetric detection of glutathione[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(41): 49482-49489.
- [77] CHEN Y, TAO K, JI W, et al. Histidine as a key modulator of molecular self-assembly: peptide-based supramolecular materials inspired by biological systems[J]. *Materials Today*, 2022, 60: 106-127.
- [78] KIGHTLINGER W, DUNCKER K E, RAMESH A, et al. A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5404.
- [79] SU H H, GUO Z W, WU X L, et al. Efficient bioconversion of sucrose to high-value-added glucaric acid by *in vitro* metabolic

- engineering[J]. *ChemSusChem*, 2019, 12(10): 2278-2285.
- [80] SUN Z B, XU J L, LU X, et al. Directed mutation of  $\beta$ -glucanases from probiotics to enhance enzymatic activity, thermal and pH stability[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(7): 1749-1756.
- [81] BACHOSZ K, ZDARTA J, BILAL M, et al. Enzymatic cofactor regeneration systems: a new perspective on efficiency assessment[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 868: 161630.
- [82] HOLZMAN D C. The carbon footprint of biofuels: can we shrink it down to size in time? [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(6): A246-A252.
- [83] KHOBRAGADE T P, PAGAR A D, GIRI P, et al. Biocatalytic cascade for synthesis of sitagliptin intermediate employing coupled transaminase[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2023, 28(2): 300-309.
- [84] 曹熙. 一种固定化脂肪酶的方法及其在生物柴油反应中的应用[D]. 北京: 北京化工大学, 2015.  
CAO X. A method for fixing lipase and its application in biodiesel reactions[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2015.
- [85] TING W-W, NISHIKAWA S, YU W-C, et al. Chemo-enzymatic synthesis of coenzyme a using copurified enzymes from probiotic *Escherichia coli* Nissle[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2024, 12(27): 10068-10074.
- [86] PAN Y J, LIU Y F, PHAN T L, et al. Biomanufacturing of inositol from corn stover with biological pretreatment by an *in vitro* synthetic biology platform[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2025, 13(1): 436-446.
- [87] LI Z L, NING X, ZHAO Y R, et al. Efficient one-pot synthesis of cytidine 5'-monophosphate using an extremophilic enzyme cascade system[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(34): 9188-9194.
- [88] FERREIRA S, BALOLA A, SVESHNIKOVA A, et al. Computer-aided design and implementation of efficient biosynthetic pathways to produce high added-value products derived from tyrosine in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1360740.
- [89] IMAM H T, MARR P C, MARR A C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(14): 4980-5005.
- [90] YU T H, CUI H Y, LI J C, et al. Enzyme function prediction using contrastive learning[J]. *Science*, 2023, 379(6639): 1358-1363.
- [91] LI R F, WIJMA H J, SONG L, et al. Computational redesign of enzymes for regio- and enantioselective hydroamination[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(7): 664-670.
- [92] JIAO Y F, WANG H Y, WANG H, et al. A DNA origami-based enzymatic cascade nanoreactor for chemodynamic cancer therapy and activation of antitumor immunity[J]. *Science Advances*, 2025, 11(2): eadr9196.
- [93] XU K Q, CHATZITAKIS A, BACKE P H, et al. *In situ* cofactor regeneration enables selective CO<sub>2</sub> reduction in a stable and efficient enzymatic photoelectrochemical cell[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2021, 296: 120349.
- [94] 支睿, 李国辉, 毛银, 等. 己二酸生物合成的途径改造以及发酵条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(3): 38-44.  
ZHI R, LI G H, MAO Y, et al. Metabolic pathway and fermentation optimization of the biosynthesis of adipic acid[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(3): 38-44.
- [95] WANG F, ZHAO J, LI Q, et al. One-pot biocatalytic route from cycloalkanes to  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxylic acids by designed *Escherichia coli* consortia[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5035.
- [96] LI X Y, CAO Y F, LUO K, et al. Highly active enzyme-metal nanohybrids synthesized in protein-polymer conjugates[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(8): 718-725.
- [97] 郭艺鸣, 姜君逸, 潘学玮, 等. 多酶级联反应催化 $\gamma$ -丁内酯生成1,4-丁二醇[J]. *应用与环境生物学报*, 2024, 30(1): 167-175.  
GUO Y M, JIANG J Y, PAN X W, et al. Multi-enzyme cascade reaction catalyzed  $\gamma$ -butyrolactone to 1,4-butanediol[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2024, 30(1): 167-175.
- [98] 姜君逸, 郭艺鸣, 杨套伟, 等. 代谢工程改造大肠杆菌从头合成1,4-丁二醇[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(9): 3142-3157.  
JIANG J Y, GUO Y M, YANG T W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* synthesis of 1,4-butanediol[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(9): 3142-3157.
- [99] 田灵芝, 周俊平, 杨套伟, 等. 基于多酶级联协调表达策略高效催化合成(S)-2-羟基丁酸[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4231-4242.  
TIAN L Z, ZHOU J P, YANG T W, et al. Efficient cascade biosynthesis of (S)-2-hydroxybutyric acid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(12): 4231-4242.
- [100] BENÍTEZ-MATEOS A I, ROURA PADROSA D, PARADISI F. Multistep enzyme cascades as a route towards green and sustainable pharmaceutical syntheses[J]. *Nature Chemistry*, 2022, 14(5): 489-499.
- [101] LIU L, WANG D H, CHEN F F, et al. Development of an engineered thermostable amine dehydrogenase for the synthesis of structurally diverse chiral amines[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2020, 10(8): 2353-2358.
- [102] 王高杨. 肌醇-1-磷酸合成酶的固定化及其在肌醇合成中应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2021.

WANG G Y. Immobilization of inositol-1-phosphate synthase and its application in inositol synthesis[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2021.

- [103] 魏梓佳, 樊宇成, 张槿博, 等. 肌醇-1-磷酸合酶的重组表达及在多酶级联催化合成肌醇中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(4): 280-287.

WEI Z J, FAN Y C, ZHANG J B, et al. Recombinant expression of inositol-1-phosphate synthase and its application in multi-enzyme cascade catalytic synthesis of inositol[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(4): 280-287.

- [104] 潘珊, 胡孟凯, 潘学玮, 等. 基于双酶级联协调表达策略高效催化合成D-甘露醇[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2549-2565.

PAN S, HU M K, PAN X W, et al. Efficient biosynthesis of D-mannitol by coordinated expression of a two-enzyme cascade [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2549-2565.

- [105] 张建志, 付立豪, 唐婷, 等. 基于合成生物学策略的酶蛋白元件规模化挖掘[J]. 合成生物学, 2020, 1(3): 319-336.

ZHANG J Z, FU L H, TANG T, et al. Scalable mining of proteins for biocatalysis *via* synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(3): 319-336.

- [106] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计[J]. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1843-1856.

QU G, ZHU T, JIANG Y Y, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(10): 1843-1856.

- [107] KASHINATH K P, SANJAY L R, ASHOKBHAI M K, et al. Continuous manufacturing based paradigm shift in pharmaceuticals production and current regulatory framework[J]. Chemical Engineering Research and Design, 2025, 215: 1-22.

- [108] 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.



**通讯作者:** 罗志波(1991—), 男, 博士, 高级工程师, 副研究员。研究方向为合成生物学、药物化学、酶分子工程与工业生物催化等, 在合成生物学、新药创制及工程转化领域取得系列产业化成果。

E-mail: zhiboluo@126.com



**第一作者:** 马牧青(1993—), 女, 博士, 工程师。研究方向为天然产物合成生物学。

E-mail: mqma@wybio.cc



**共同第一作者:** 吴彦(1982—), 男, 工程师。研究方向为合成生物学与药物化学。

E-mail: ywu@wybio.cc



**共同第一作者:** 曲茂华(1989—), 男, 博士。研究方向为生物信息学。

E-mail: mhqu@wybio.cc