

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-004

体外生物转化(ivBT): 生物制造的新前沿

石婷^{1, 2, 3}, 宋展^{1, 2, 3, 4}, 宋世怡^{1, 2, 5}, 张以恒^{1, 2, 3}

(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; ³ 合成生物学海河实验室, 天津 300308; ⁴ 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240; ⁵ 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 人类社会的重大挑战(如粮食安全、能源安全、气候变化与双碳目标等)驱动全社会寻求创新型技术解决方案。体外生物转化(*in vitro* biotransformation, ivBT)是介于微生物发酵与酶催化之间的新质生物制造平台,多酶分子机器是其超限生物催化剂。它基于大道至简原则,利用多个天然酶、人工酶以及(仿生/天然)辅酶等重构生化途径,摆脱生物体生存局限(如细胞复制、基础代谢、复杂调控和能量供给等),超越细胞合成极限,实现重要生物转化与超限能量转换,尤其是生产低值大宗产品与新能源产品等。工业生物制造的三个平台技术分别是基于细胞工厂的发酵、基于酶分子的生物催化与基于多酶分子机器的ivBT。本综述对ivBT给出明确定义,阐明其多酶途径设计原则与产业化技术研发路径,比较该平台与现有生物制造平台相似性与不同点,介绍多个代表性案例,以及讨论其未来的机会与挑战。ivBT技术发展采用设计-构建-判决-优化的线性策略,开发能够满足国家需求的超高效多酶分子机器。利用ivBT有望形成超过30万亿元生物产品的工业生物制造,助力实现人类社会的多项重要需求,如粮食安全、新型能源体系等。人造淀粉不仅可以帮助中国端牢粮食饭碗,而且将是一个全新且安全的高密度储氢载体(比压缩氢气高2.5倍)与高能储电介质(比锂电池高10倍)。

关键词: 体外合成生物学; 工业生物制造; 体外生物转化; 多酶分子机器; 粮食安全

中图分类号: Q819 文献标志码: A

In vitro BioTransformation (ivBT): a new frontier of industrial biomanufacturingSHI Ting^{1, 2, 3}, SONG Zhan^{1, 2, 3, 4}, SONG Shiyi^{1, 2, 5}, ZHANG Yi-Heng P. Job^{1, 2, 3}

(¹Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; ²In Vitro Synthetic Biology Center, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; ³Haihe Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China; ⁴State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200240, China; ⁵State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Huge challenges, such as food security, energy security, climate change, dual-carbon target, and so on,

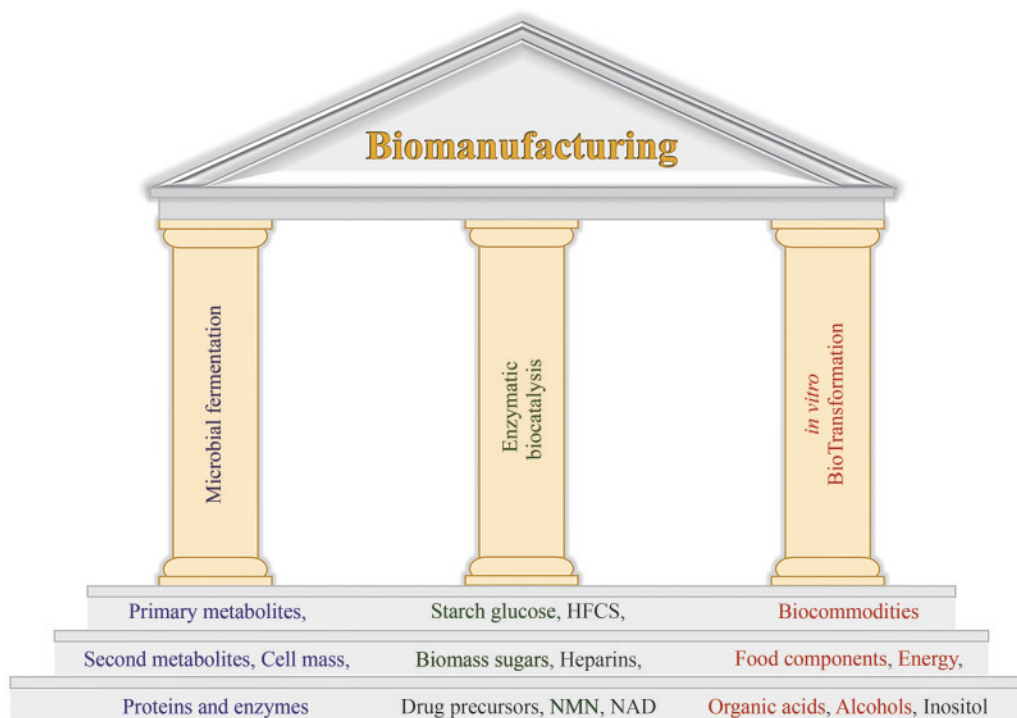
收稿日期: 2024-01-07 修回日期: 2024-03-11

基金项目: 国家重点研发计划(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: 石婷, 宋展, 宋世怡, 张以恒. 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

Citation: SHI Ting, SONG Zhan, SONG Shiyi, ZHANG Yi-Heng P. Job. *In vitro* BioTransformation (ivBT): a new frontier of industrial biomanufacturing [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(6): 1437-1460

motivate human society to seek disruptive and innovative solutions. *In vitro* biotransformation (ivBT), bridging the gap between whole-cell-based fermentation and enzyme-based biocatalysis, is an emerging biomanufacturing platform designed for the production of biocommodities (e.g., synthetic starch, healthy sweeteners, organic acids, etc.) and bioenergy. In ivBT, *in vitro* synthetic enzymatic biosystem (ivSEB) is its high-efficiency biocatalyst. Based on the Chinese philosophy that “Tao is simple”, ivSEB is the *in vitro* reconstruction of artificial (non-natural) enzymatic pathways with a number of natural enzymes, artificial enzymes, and/or (biomimetic or natural) coenzymes, and/or artificial membrane, without living cell’s constraints, such as cell duplication, bioenergetics, basic metabolisms, regulation, and so on. ivBT enables it to surpass the limitations of whole-cell fermentation and has multiple advantages, such as theoretical product yield, at least 10-time volumetric productivity, tolerance to toxic substrate/product, and so on. This review defines the concept of ivBT, presents its design principles, distinguishes it from other seemingly-like concepts, such as cell-free protein synthesis and cascade enzyme biocatalysis, introduces several representative examples, and discusses its challenges and opportunities. The development of ivBT is based on the linear strategy of “Design-Build-GoNG-Optimization”, leading to super-biomanufacturing machines that can meet national needs, such as food security and new energy system. To address food security, we propose two out-of-the-box solutions: (1) *in vitro* biotransformation of cellulose to starch, possibly increasing the starch supply by a factor of 10; (2) artificial starch synthesis from CO₂ by combining ivBT and chemical catalysis. Furthermore, the revolutionary production of starch could open a door to the starch-based carbohydrate economy, wherein starch is a high-density hydrogen carrier, more than 2.5 times that of compressed hydrogen, and an ultra-high electricity storage compound, more than 10 times of lithium-ion battery. In a word, ivBT featuring ultra-high energy efficiency and potentially-low-cost production could become a third industrial biomanufacturing platform and help solve huge challenges.



Keywords: *in vitro* synthetic biology; industrial biomanufacturing; *in vitro* biotransformation; *in vitro* synthetic enzymatic biosystem; food security

1 生物制造的背景与历史

生物制造是一种利用生物体（如植物、动物、微生物、酶、多酶分子机器等）的机能进行物质加工与合成的绿色生产方式，将在能源、农业、化工和医药等领域改变世界工业制造格局。生物制造的本质是合成生物基产品与提供新能量形式，满足人类物质和能量需求^[1-3]。

生物制造平台根据生物催化剂种类可以分为基于细胞工厂的微生物发酵、基于酶分子的生物催化和基于多酶分子机器的体外生物转化（*in vitro* biotransformation, ivBT）^[1, 4-9]。如图1和表1所示，微生物发酵平台能够生产上万种产品，包括初级代谢产物（如乙醇、丁醇、氨基酸、有机酸）、次级代谢产物（如抗生素）、生物大分子蛋白（如促红细胞生成素、胰岛素）、工业酶（如 α -淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶、纤维素酶、蛋白酶、植酸酶）、菌体（如单细胞蛋白、人造肉）等。酶催化是指由酶分子所催化的化学反应。作为一种生物制造平台，酶催化通常利用单酶分子

或者多酶级联催化的方式生产淀粉糖、果葡糖浆、生物质糖、医药原料与中间体等。ivBT是一个新兴的生物制造平台，多酶分子机器是其超限生物催化剂，它可以摆脱生物体自我繁殖的局限，超越细胞合成极限，实现重要生化转化与超限生物能量转换^[9]。两个典型案例充分证明ivBT的技术优越性与鲜明特色：

①糖水制绿氢（或人工呼吸作用）技术。微生物厌氧发酵生产氢气的理论极限是每摩尔葡萄糖生产4 mol氢气，即Thauer极限^[10]，仅1/3的葡萄糖化学能转化为氢能，另外2/3转化为乙酸。人工构建的多酶分子机器能够利用糖中化学能裂解水生产绿氢，每摩尔葡萄糖和水反应生产12 mol氢气，从而突破了微生物发酵产氢的Thauer极限^[11-12]。

②体外纤维素合成淀粉技术。天然的纤维素降解菌株水解纤维素生成葡萄糖，再将之作为原料在胞内代谢合成淀粉。微生物胞外纤维素水解和胞内淀粉合成是被细胞膜隔离，产物收率低且反应速度慢^[13]。相比之下，体外（无细胞膜）多酶分子机器能够催化纤维素直接合成淀粉，具有



图1 生物制造平台分类

Fig. 1 Classification for industrial biomanufacturing platforms

表1 生物制造平台的比较

Table 1 Comparison of biomanufacturing platforms

生物制造平台	催化剂	标志性产品			产品种类	产品规模	浓度 (Titer)	得率 (Yield)	速率 (Rate)	生物安全	技术壁垒	
微生物发酵 (Fermentation)	细胞工厂	初级代谢产物	次级代谢产物	生物大分子	微生物蛋白	极多	小、中、大	低	较低	低	有挑战、强监管	低
酶催化 (Biocatalysis)	酶分子、级联多酶	果葡糖浆	生物质糖	医药原料	NMN	较多: 优选水解、异构、手性合成等方式合成产品	小	高	高	最高	好	高
体外生物转化	多酶分子机器	肌醇、塔格糖	合成淀粉	糖水制绿氢	糖酶燃料电池	较少: 优选异构、糖苷键重排、分解与合成代谢等方式合成产品	超大(如能源、粮食)	高	高	高	最好	最高

低成本和高得率的生物转化优势^[13-14]。

本文对新质生物制造平台——ivBT 给出明确定义, 阐明其体外多酶途径设计原则与产业化技术研发路径, 比较该平台与已有工业生物制造平台及其他相似生物技术性的差异, 并介绍其代表性案例, 最后讨论其未来的机会与挑战。

2 体外生物转化 (ivBT)

新能源革命和粮食安全的需求催生了第三个工业生物制造平台——体外生物转化 (ivBT)。ivBT 是介于微生物发酵与酶催化之间的新工业生物制造平台, 多酶分子机器是其超限生物催化剂, 它基于化繁为简的原则, 利用多个天然酶、人工酶、(天然或仿生) 辅酶、(人工) 生物膜等重构生化途径, 可摆脱生物体自我繁殖的局限, 超越细胞合成极限, 实现重要生物转化与超限能量转换。如表 1 所示, 多酶分子机器是 ivBT 特有的核心催化剂, 它遵循 ivBT 设计的多酶催化路径, 将多个纯化或部分纯化的酶元件、(天然或仿生) 辅酶、(人工) 生物膜、(人工) 细胞器等元件进行合理的优化与适配, 组装成一种生物催化系统, 在体外将特定的底物高效地转化为目标产物。多酶分子机器不受活细胞的限制, 不存在细胞复制、基本代谢、复杂调控、能量消耗等情况。ivBT 理论的形成与发展受到中西哲学思想指导与启发: ①大道至简或还原论, 认为生物体复杂系统可以将其化解为各部分之组合的方法, 加以理解和描述; ②第一性原则, 将复杂问题分解为最简单部

分, 了解基本工作原理, 创造性解决复杂问题; ③需求导向的集成创新, 以最重要、最迫切的国家需求为研发动力, 整合多学科人才进行建制化集成攻关。

2.1 ivBT 设计原则

2010 年, 张以恒教授提出 ivBT 的设计原则^[5]。如图 2 所示, 设计原则共包括五部分: ①途径设计; ②酶挖掘; ③酶工程; ④酶生产; ⑤生化工程。ivBT 可以通过上述各技术领域的集成创新实现迭代提升。此外, 在 ivBT 实施过程中, 应用工程经济学与系统工程的原则, 充分了解与掌握技术现状与未来提升潜力, 确定“卡点”技术与攻关优先级。

ivBT 途径设计通常是基于胞内天然代谢途径的基础上做改进和整合, 不依赖细胞的原有物质和能量代谢途径^[15]。体外多酶途径设计时, 考虑的主要因素包括: ①辅酶是否参与。由于天然辅酶 [如 ATP 和 NAD(P)H] 价格昂贵, 途径若有辅酶参与, 就需要考虑辅酶的平衡与再生。体外多酶途径设计时更倾向于没有辅酶参与, 例如多酶催化淀粉合成稀少糖的途径就没有辅酶参与^[16-17]。②热力学平衡。体外多酶途径设计需要检查各步骤的热力学平衡常数和吉布斯自由能, 尽量避免途径中存在热力学限制反应以及限速步骤, 确保途径具有高速率和高得率。例如基于 NADH 还原酶催化 CO₂ 合成甲酸、甲酸合成甲醛的反应平衡常数分别是 0.003 和 8.5×10⁻¹⁰, 低平衡常数导致最终目标产品的浓度很低。基于二氧化碳还原酶催化

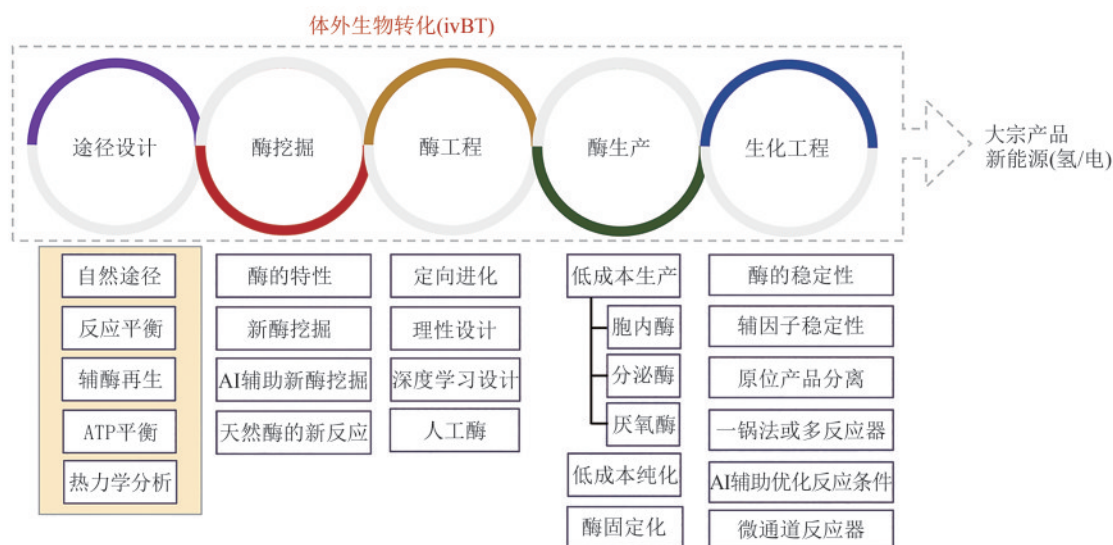


图2 ivBT的设计原则

Fig. 2 Design principles of ivBT

H_2 与 CO_2 合成甲酸就有更好的甲酸平衡常数 (1.8×10^4) 以及高产物得率。在体外多酶途径设计时, 建议将一系列的可逆反应与最后一步不可逆反应结合起来, 以获得较高的产品得率, 例如多酶催化淀粉合成肌醇的途径中最后两步反应均是不可逆反应, 能够大幅度提升肌醇得率^[18]。③ATP平衡。体外多酶途径设计要求考虑ATP平衡, 当体外生物转化技术生产低值大宗产品, 使用ATP、磷酸烯醇丙酮酸、丙酮酸等昂贵底物提供ATP, 在经济上是不可行的^[5, 19]。我们推荐优选利用不同体外途径设计调整ATP的生产量。以1 mol葡萄糖合成2 mol丙酮酸的途径为例, 不同多酶途径设计可以产生0~4 mol ATP^[20]。如果途径中存在ATP积累, 可以添加ATP酶、磷酸酶或者砷酸盐消耗掉多余的ATP或者将含有高能磷酸键的代谢产物水解; 反之, 若途径中ATP严重不足, 可以考虑使用氧化磷酸化途径作为一个功能模块来提供能量ATP。④辅酶平衡。NAD比NADP便宜和稳定, 体外多酶途径设计中优选使用NAD作为辅酶, 进一步可以考虑使用更小辅酶分子NMN。如果途径中存在NAD(P)H积累, 可以利用氢酶生成氢气^[21]、酶燃料电池联产电能^[22]、 H_2O 型NADH氧化酶生成水^[23]等方式去除多余的还原能。如果途径中NAD(P)H不足, 可以添加氢酶和氢气^[24]、电能^[25]、NAD(P)H供体(如甲酸^[26]、甲醇^[27]、葡萄糖^[27]、丙醇^[28]、亚磷酸^[29]、葡萄糖-6-磷

酸^[30])或者修饰磷酸戊糖途径^[31]实现NAD(P)H再生。

酶元件挖掘优选催化活性高、热稳定性高、底物专一性高和无产物抑制的酶元件。值得注意的是, 具有高底物混杂性的酶元件一般不适用于ivBT系统。例如大多数磷酸酶底物特异性较差^[17, 32-33], 而在多酶催化淀粉合成甘露糖途径中, 挖掘获得的甘露糖-6-磷酸磷酸酶具有较高的底物特异性, 对于提升甘露糖的产品得率起到了重要作用^[34]。不同酶元件的最适温度、pH、激活剂及缓冲液离子强度等可能存在较大差异, 需要权衡确定ivBT系统的最优反应条件^[35-36]。酶元件挖掘时尽可能从同一种微生物中筛选, 因其具有相近的最适工作环境, 有利于建立最优反应条件, 更有可能形成多酶(临时性)复合体, 产生底物穿梭效应, 提高转化速度^[6, 37-38]。

天然酶元件可以通过理性设计、定向进化或二者结合的方式提升催化性能, 得到人工酶^[39]。ivBT关注以下酶学特性: 高比酶活^[40]、热稳定性好^[18, 40-42]、高底物特异性、(仿生)辅酶偏好性^[43-46]、最适pH^[47-48]等。AlphaFold^[49]、AlphaFold-Multimer^[50]和AlphaLink^[51]等人工智能系统能够助力改造提升酶元件的催化性能。

酶蛋白(干重)生产成本与比酶活力和工业制造经济可行性密切相关。一般来说, 学术界实验室自用制备的毫克级重组酶或者购买的科研用

酶非常昂贵，导致大多数科研人员对重组酶的生产成本形成错误认知。事实上，工业酶的生产成本（如 α -淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、植酸酶）大约100元/千克酶干重。

生化工程包括酶固定化、原位产物分离、反应器工程（一锅法、多锅级联法、微通道反应器、连续搅拌釜反应器或活塞流反应器）等技术。除了酶固定化技术可以提高酶的稳定性，高浓度多酶混合物可能会形成大分子拥挤效应，也可以提高多酶体系的稳定性^[52]。对于反应平衡常数较低的途径，原位产物分离技术有助于提高目标产品的得率和产率^[11, 35, 53]；若存在强烈产物抑制，原位产物分离技术将能够解除产物抑制，提高目标产品的得率和产量。大多数情况下ivBT优先选择使用一锅法，特殊条件下使用多个反应器进行分步级联反应或者使用连续流微反应器，则具有特殊的生物制造优势^[54]。

2.2 ivBT 与相似技术的区分

酶催化作为工业生物制造平台起始于单酶催化^[55-56]。在第二次世界大战期间，英国泰莱公司使用固定化蔗糖酶生产糖浆，这可能是最早的固定化单酶应用于工业化生产。1969年，日本Tanabe Seiyaku有限公司利用固定化氨基酰化酶在填充床反应中工业化生产L-蛋氨酸。1967年，美国克林顿玉米加工公司率先利用葡萄糖异构酶生产果葡糖浆。目前，诺维信公司与杜邦公司的商业化固定化葡萄糖异构酶已经广泛用于果葡糖浆的大规

模生产，全世界每年生产的高果葡糖浆超过2000万吨。

单酶催化逐渐向多酶级联催化（cascade enzyme biocatalysis, CEB）方向发展。多酶级联催化具有时空产率高、反应体积小、反应时间短、操作单元少和生产污废少等优点^[57-60]。制药领域经常使用CEB解决高值手性药物合成中辅酶NAD(P)H循环再生的问题^[21, 61]。NAD(P)H可以通过氢供体和对应的脱氢酶偶联的策略实现循环再生，例如甲酸与甲酸脱氢酶^[62]、葡萄糖与葡萄糖脱氢酶^[63]、葡萄糖-6-磷酸与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶^[30]、氢气与氢酶^[64]、亚磷酸盐与亚磷酸盐脱氢酶^[65]。与之相似的是ATP循环再生问题^[19, 66-67]。在有机化学领域，CEB技术已广泛应用于制备单糖、活性单糖、低聚糖和糖肽等产品^[68-75]。截至2019年，制药行业利用CEB生产了数百种小分子活性药物成分^[60]。

ivBT是CEB的进一步发展，但是二者之间存在显著差异。主要区别如下：①生物制造产品目标不同。如图3所示，ivBT与CEB的目标产品是位于对角象限。如表2所示，ivBT目标产品是大宗产品（低值），产品市场规模大于5亿元且产量在1万吨以上，极个别产品的预期市场规模可能高达10亿吨。CEB则更关注精细化学品，其产量规模一般在100千克至100吨之间，同时产品的市场规模数千万元，市场规模低于5亿元^[60]。ivBT的目标产品数量很少，可能100个，其代表性产品是能源、食品、饲料、材料领域的大宗产品。相比之下，CEB的目标产品数量众多，可能超过1万

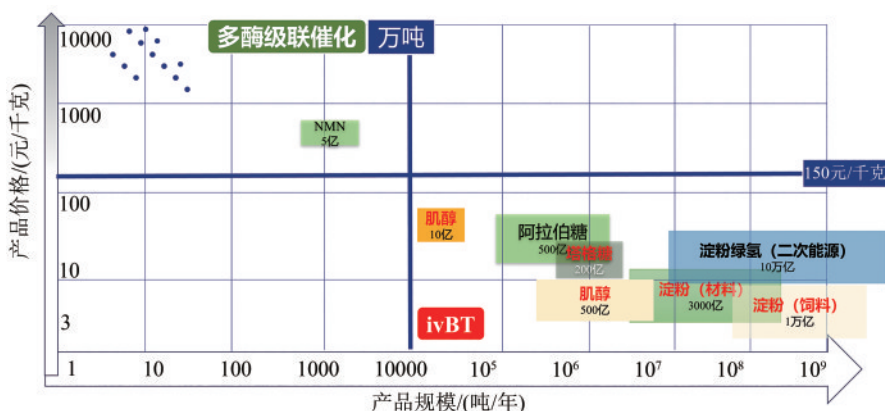


图3 ivBT 和 CEB 的生物制造产品规模

Fig. 3 Target product size for biomanufacturing of ivBT and CEB

表2 ivBT 与相似技术的区分

Table 2 Comparison of ivBT with similar biotechnologies

区分项目	体外生物转化 (ivBT)	多酶级联催化 (CEB)	无细胞蛋白质合成 (CFPS)
目标	大规模生物制造 产品规模:>1万吨,甚至10亿吨级	精细生物制造 精细产品:约1000千克级,<100吨	研究工具 特殊制造(快速生产克级蛋白质)
代表性产品	粮食、能源、材料 (如淀粉、绿氢、肌醇、塔格糖)	药物中间体(NMN)	疫苗合成
产品市场规模 (每个产品)	5亿(最小市场) →100亿(塔格糖) →10万亿(绿氢)	千万(最大市场低于5亿)	NA
目标产品数目	约100(粮食、能源等大宗产品)	约10000(精细化学品)	NA
原料成本/ 产品价格	>50%→90%(最大)	5%→20%	NA
合成途径设计	非天然途径与人造电子传递链	主反应与辅酶再生,利用部分天然途径	利用天然合成途径
催化元件	天然(超稳)酶、人工酶、固定化多酶、(仿生)辅酶再生	天然(常温)酶、改造酶、固定化酶、辅酶再生	细胞裂解液或纯化元件、外加氨基酸、ATP供体、DNA模板
元件需求	超低成本酶、超稳定固定化酶、价廉且稳定(仿生)辅酶	酶成本不敏感,利用天然辅酶	利用细胞裂解液中的有效成分
生产周期	天、周、月(多次,连续)	时、天(一次,极少多次)	时(一次)

种,其代表性产品包括药物前体、天然产物和精细化学品。②途径设计原则不同。如表2所示,ivBT几乎不依赖于天然代谢途径,更倾向重新设计人工合成途径。CEB多由一个主反应配上辅酶再生体系或部分天然途径组成。③系统组成酶元件性质要求不同。如表2所示,ivBT强调使用低生产成本和高热稳定性的酶元件及仿生辅酶参与反应,更推荐使用固定化酶。ivBT产品的总成本中原料成本所占比重一般较高,达到50%,或者高达80%~90%。CEB则常使用常温酶和天然辅酶进行转化反应,且极少使用固定化酶。因此CEB产品的原料成本所占比重通常仅占20%或者更低。④反应过程不同。如表2所示,ivBT倾向于维持较长的反应时间(如数周或数月),目的是为了充分发挥酶的催化性能,降低用酶成本。而CEB则常使用批次转化方式,一般持续几小时或几天的时间。

无细胞蛋白质合成(cell-free protein synthesis, CFPS)又被称为体外蛋白质转录翻译技术,通过提取核糖体、氨酰-tRNA合成酶、翻译起始和延伸因子、核糖体释放因子等转录、翻译、蛋白质折叠和能量代谢所必需的元素,并向其中添加DNA模板、能量和各种辅因子,模仿胞内环境以合成

目标蛋白质^[76-78]。CFPS可以在体外高度可控环境中模拟整个细胞的转录和翻译过程,并允许对单个成分和反应网络进行详细深入的研究^[79-80]。CFPS是一种小众的生物制造方式^[81],可以用于生产超高值产品,如紧急疫苗^[82]、抗体药物偶联物^[83]、非天然氨基酸^[84]、毒素(如肉毒毒素)^[85-86]、RNA^[87]等。

2.3 ivBT 平台的生物制造特色

在生物制造过程中,最重要的三个评判指标是产量(titer, g/L)、得率(yield, g/g)和生产速率[rate, g/(L·h)]^[5, 88]。ivBT作为新型工业生物制造平台,相较于微生物发酵具备鲜明的特色。第一,其最大特色是高产物得率,接近理论得率^[18, 89-95]。ivBT是一个简单开放的转化系统,没有竞争途径,没有复杂的代谢网络调控,也不存在细胞复制^[15, 76],转化时使用的酶元件均具有底物专一性,底物可能全部用于目标产品的合成。而微生物细胞由于自身繁殖和副产物较多的原因会消耗部分底物,且细胞内代谢网络复杂,每步反应都可能受到启动子强度、mRNA稳定性、蛋白质翻译、蛋白质转运和蛋白质交互作用等复杂

调控^[7], 存在有限资源的竞争、分配与调控等难题, 因此目标产品得率较低。第二, ivBT的酶生产制备环节与体外生物转化环节实现了时空分离, 整套 ivBT 系统以目标产品的生物制造为唯一目标。而微生物细胞生长繁殖与产品生产通常相耦合, 大多数情况下微生物以维持自身生存为第一要务。第三, ivBT在体外途径设计时保持 ATP 和还原力的平衡, 整条途径中不存在能量或者还原力的不足和过剩, 实现生物能量的最大利用。而微生物受生物能量学的限制, 细胞维持自身生存需要 ATP 和还原力的净合成, 产品实际得率无法达到理论得率^[20]。第四, ivBT 具有生产速率高的特色, 一般来说, 比微生物发酵高 1~2 个数量级。在相同体积内, ivBT 可以有更高酶浓度与更短反应途径, 而细胞内酶的种类数以千计, 仅数个酶参与目标产品的合成^[79, 82, 94]。第五, ivBT 没有细胞膜的限制, 可以实现生物大分子(如淀粉)或特殊极性分子(如磷酸糖)的生物合成^[13, 35-36, 96], 因为生物大分子或特殊极性分子无法自由通过细胞膜, 这两类产品在微生物细胞工厂中的合成受到极大的限制。第六, ivBT 可以实现超限制制造, 如利用微通道反应器进行生物催化, 其效果超越传统三传“动量传递、热量传递、质量传递”限制^[97]。而微生物胞内反应受“三传”限制还是比较明显的, 比如, 自由扩散、恒温等等。第七, 相较于微生物发酵生产, ivBT 工艺操作简单和易于优化, 具有更高的鲁棒性^[90, 98-100]。同时, ivBT 还具有能量消耗低的制造优势, 体外多酶途径通过平衡还原力就能实现无氧生物转化, 不需要提供压缩空气; 转化反应不需要高转速的剧烈搅拌, 仅提供较低转速(如 30~100 r/min) 确保反应料液混合均匀; 转化反应温度一般控制在 40~70 °C 区间, 不需要提供制冷, 仅需要根据实际转化温度保温或提供少量加热。第八, ivBT 的酶分子比微生物能耐受更高浓度的有毒物质^[31, 101]。例如, 酵母细胞无法在生物质预处理水解液的复杂有毒抑制剂环境下生长, 而 ivBT 能实现较好的催化^[31, 102]。对于有机溶剂, 酶也具有更高的耐受性。例如, 某些天然酶对于乙醇的耐受性比微生物至少高一个数量级。此外, 天然酶可以通过定向改造进一步提高对有机溶剂的耐受性^[103]。

3 ivBT生物制造案例

ivBT 作为新工业生物制造平台的发展时间虽短, 但就其内在科学性而言, 已经经历了三个阶段。第一阶段是利用天然酶、天然辅酶及天然电子传递链等天然元件构建人工合成途径。其代表性案例包括糖水制绿氢^[11]、淀粉合成肌醇^[18]及淀粉合成健康糖^[16-17]等技术。第二阶段是利用突变酶、固定化酶、仿生辅酶、人工多酶复合体、人造膜及人工电子传递链等人工元件构建合成途径。其代表性案例包括配备 Nafion 膜和非生物电子介质的糖酶燃料电池技术^[91], 利用人工电子传递链、固定化辅酶和多酶复合体制备超高速糖水产绿氢技术^[104]。第三阶段是利用人工酶催化新生化反应构建新合成途径。其代表性案例包括利用人工酶固定 CO₂ 合成淀粉技术^[96]、人工酶戊糖 4-差向异构酶催化 D-木糖合成 L-阿拉伯糖技术^[105]、级联氨基酸脱羧酶催化 α -丙氨酸合成 β -丙氨酸技术^[106]。本文按照产品潜在市场规模由小到大的顺序, 列举几个代表性案例进一步阐述 ivBT 的概念、技术发展及未来应用。

3.1 淀粉合成肌醇

肌醇 (*myo*-inositol) 又被称为维生素 B₆, 广泛应用于医药、水产饲料、保健品、化妆品、功能饮料、婴儿奶粉等产品^[18, 107-108]。传统生产方法是植物提取法, 从玉米或者米糠浸出物中提取菲汀, 通过高温高压酸水解制备肌醇。这种生产方法存在原料供应不足、含磷废水与恶臭气味污染严重、能耗高、提取率低、生产成本高等问题, 不能满足日益增长的肌醇需求。目前全球肌醇市场规模约为 1.5 万吨, 根据市场需求和潜在应用场景, 未来市场规模可达 100 万吨。

2013 年, 张以恒教授设计并构建以淀粉为原料生产肌醇的人工合成途径^[18]。整条途径包括四步催化反应: ①利用 α -葡聚糖磷酸化酶 (α -glucan phosphorylase, α GP, EC 2.4.1.1) 催化淀粉和磷酸盐生成中间代谢产物葡萄糖 1-磷酸; ②葡萄糖 6-磷酸变位酶 (phosphoglucomutase, PGM, EC 5.4.2.2) 催化葡萄糖 1-磷酸生成葡萄糖 6-磷酸; ③肌醇 3-

磷酸合成酶 (inositol 3-phosphate synthase, IPS, EC 5.5.1.4) 催化葡萄糖 6-磷酸生成肌醇 1-磷酸; ④利用肌醇单磷酸酶 (inositol monophosphatase, IMP, EC 3.1.3.25) 催化肌醇 1-磷酸进行脱磷酸反应生成肌醇和磷酸盐, 其中磷酸盐能够在反应①和反应④之间循环使用 (图4)。为了提高肌醇得率, 既可以利用异淀粉酶水解支链淀粉生成直链淀粉便于 α GP 催化底物利用^[109], 也可以使用 4-葡聚糖苷转移酶催化麦芽糖的葡萄糖苷转移^[110], 还能利用多聚磷酸依赖型-葡萄糖激酶催化副产物葡萄糖生成葡萄糖 6-磷酸^[40, 111], 从而将淀粉所有葡萄糖单元全部转化为肌醇, 达到理论得率 110%。

这个体外多酶途径利用 α GP 和 PGM 两个酶催化淀粉和磷酸盐生成葡萄糖 6-磷酸, 不需要 ATP 参与提供能量, 这是由于第一步葡萄糖磷酸化反应的能量来自于淀粉中葡萄糖单元之间 α -1,4-糖苷键能, 且 PGM 催化葡萄糖 1-磷酸生成葡萄糖 6-磷酸的吉布斯标准自由能 ΔG^\ominus 为 -7.4 kJ/mol, 能够推动葡萄糖 6-磷酸合成。与此同时, IPS 催化的葡萄糖 C—C 环化异构反应和 IMP 催化的肌醇 1-磷酸脱磷酸反应的吉布斯标准自由能 ΔG^\ominus 分别为 -55.2 kJ/mol 和 -20.7 kJ/mol, 这两步反应热力学有利, 且是不可逆反应^[112]。整条体外多酶途径包括前两步可逆反应和最后两步不可逆反应, 整合四步反应的总吉布斯自由能为 -80.1 kJ/mol, 从而推动整个反应向产物合成方向进行。

为了加速肌醇的工业生物制造, 张以恒教授组建了一支产业化团队, 建立低成本高密度重组酶发酵工艺、热处理纯化超高温酶工艺、优化体外多酶配比、建立肌醇分离提取工艺等, 实现了酶法肌醇工业化生产, 从而大幅度降低了肌醇的生产成本^[113-114]。通过系统优化, 淀粉合成肌醇的得率高达 98.9%, 并在 20 m^3 反应器完成产业化测试, 反应 48 h 后肌醇浓度达到 95 g/L。与微生物发酵生产肌醇技术相比^[115-116], ivBT 有着理论上技术优势, 如 ivBT 过程中未被利用的糖可以分离出来, 用于微生物发酵产酶, 从而提升原料利用率。如图 5 所示, 2016 年, 淀粉合成肌醇技术转让给相关企业, 建成年产万吨肌醇生产线并全面投入生产。淀粉制肌醇技术是全球第一个体外合成生物学的工业化成功范例^[117]。

在淀粉合成肌醇的首篇论文发表数月之后, 日本嗜热菌 (酶) 领域的生化专家 Atomi 教授也发表了体外多酶催化淀粉合成肌醇的文章^[118]。值得注意的是, 两个独立团队在肌醇体外合成途径中都使用了来源相同的三个酶 (PGM、IPS 和 IMP), 这说明为同一产品设计相同或者相似途径并找到相同的酶, 是一种常见的巧合。随后基于蔗糖、纤维素、木糖、葡萄糖等原料合成肌醇的胞内或胞外催化途径陆续设计出来并得以验证^[92, 107, 115-116, 119-120]。截至目前, 在中国利用 ivBT 与微生物发酵生产肌醇的工艺均在工业化生产。

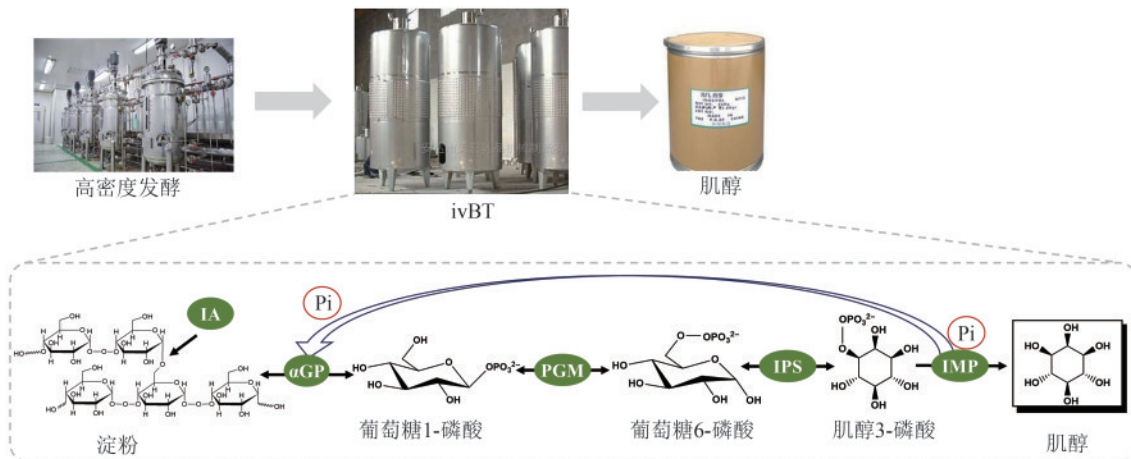


图4 ivBT 的体外肌醇合成途径

α GP— α -葡聚糖磷酸化酶; PGM—葡萄糖 6-磷酸异构酶; IPS—肌醇 3-磷酸合成酶; IMP—肌醇单磷酸酶; IA—异淀粉酶

Fig. 4 Inositol synthesis pathway of ivBT

α GP— α -glucan phosphorylase; PGM—phosphoglucosmutase; IPS—inositol 3-phosphate synthase; IMP—inositol monophosphatase; IA—isoamylase

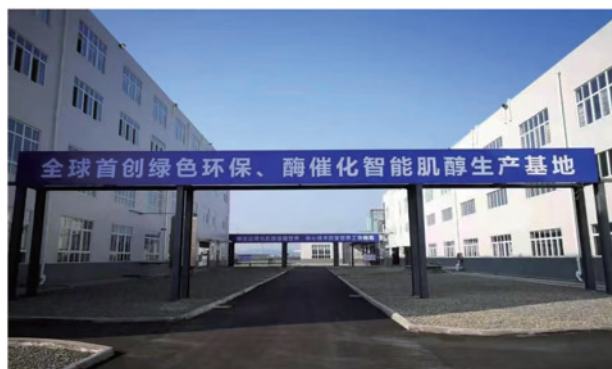


图5 首个ivBT肌醇工业化生产工厂

Fig. 5 Image of the first large-scale inositol factory

3.2 淀粉合成健康糖

稀少糖是自然界含量极低的单糖及其衍生物，因其具有特殊的生理功能，又被称为健康糖^[121-122]。2004年，Izumori教授提出利用酮糖3-差向异构酶、醛糖异构酶、醛糖还原酶和氧化还原酶等组合方式生产稀少糖的一套完整策略，称为Izumoring策略^[121, 123]。Izumoring策略虽然能够利用廉价底物生产稀少糖，但是存在一些不足，如：①酶促转化反应平衡导致产物转化率低，需要使用模拟移动床将目标产物和底物进行分离，将会提高生产成本；②醛糖还原酶和氧化还原酶反应需要添加昂贵的辅因子NAD(P)，将大幅提高生产成本；③某些原料来源有限且价格昂贵（如D-半乳糖），导致难以大规模生产。

D-塔格糖是一种天然甜味剂，口味完美，甜度与蔗糖相似，热量只有蔗糖的1/3^[122, 124]。塔格糖作为益生元具有低热量、低升糖指数、抗龋齿、抗氧化、改善肠道功能和增强免疫力等优势^[122]。2000年，美国食品和药物管理局（FDA）批准其为公认安全（GRAS）食品原料^[124]。根据Izumoring策略，D-塔格糖可以以D-半乳糖为原料异构合成，但这个异构反应平衡常数低，需要利用色谱反复分离产物和底物^[125-126]。中国科学院天津工业生物技术研究所（简称天津所）孙媛霞研究员曾经在Izumori课题组从事稀少糖研究，回国之后致力于稀少糖合成技术研究，发表了一系列研究论文并申请了专利，包括D-塔格糖技术。但是原料乳糖来源有限且价格昂贵，兼之分离工艺复杂，传统D-塔格糖生产技术无法大规模产业化与广泛

应用^[127-128]。

2014年，张以恒教授了解稀少糖产品后，开始考虑如何利用大宗廉价原料葡萄糖生产塔格糖。他参考天然酶UDP-葡萄糖4-差向异构酶的催化性能，推测从自然界中挖掘和创制人工酶葡萄糖4-差向异构酶。2015年，张教授课题组的Danial Wichelecki博士发现了来自于*Agrobacterium tumefaciens*的塔格糖6-磷酸差向异构酶^[129]，可以催化塔格糖6-磷酸与果糖6-磷酸相互转化。基于新发现的塔格糖6-磷酸差向异构酶^[129]、淀粉合成肌醇途径^[18]以及淀粉合成果糖途径^[43, 130]，张以恒教授与Wichelecki博士提出从淀粉合成D-塔格糖的多酶催化途径^[131]。同期，天工所也申请了淀粉合成塔格糖的体外多酶途径发明专利^[132]。

与淀粉合成肌醇途径高度相似，塔格糖合成途径共包括三部分：①不依赖ATP的多酶催化淀粉生成磷酸糖化合物^[11, 133]；②通过果糖6-磷酸异构酶和塔格糖6-磷酸差向异构酶催化生成塔格糖6-磷酸^[129, 134]；③通过塔格糖6-磷酸磷酸酶催化塔格糖6-磷酸脱磷酸生成塔格糖^[32, 134]。天工所申请系列专利，包括：五种大肠杆菌工程菌株分别表达嗜热酶，然后将五个全细胞放在一个反应器催化生产塔格糖的技术^[135]；一株枯草芽孢杆菌工程菌株，共表达五种嗜热酶生产塔格糖的技术^[96, 136-137]；以及固定化酶技术催化淀粉合成塔格糖^[16]。江南大学江波课题组也长期致力于塔格糖相关研究，挖掘获得来自于*Dictyoglomus turgidum*的 α -葡聚糖磷酸化酶^[138]和来自于*Caldilinea aerophila*的果糖6-磷酸4-差向异构酶^[139]，并将其用于多酶催化淀粉合成塔格糖的体系。同时，江教授构建了一株共表达五种嗜热酶的大肠杆菌工程菌株，并建立了热处理全细胞催化淀粉合成塔格糖的技术^[140]。

D-阿洛酮糖是D-果糖的C-3差向异构体^[141-142]，甜度是蔗糖的70%，热量只有蔗糖的10%，被认为是高果糖浆的理想替代品^[143]。FDA批准其作为GRAS食品添加剂用于食品和膳食补充剂中，以增强凝胶强度、降低氧化、改善风味^[144]。此外，它还具有降血脂^[143]、降血糖^[145-146]、抗炎^[17, 147]等生理功能。D-阿洛酮糖可以通过D-阿洛酮糖3-差向异构酶催化D-果糖合成^[121]。在D-阿洛酮糖工业化生产中，反应平衡转化率低，需要使用色谱

分离产物和底物，并将底物果糖循环使用，提高产品得率。2017年，两个独立课题组（张以恒教授^[18]与Atomi教授^[118]）几乎同时公开发表淀粉生产肌醇技术。2014年韩国CJ公司提交了第一篇淀粉合成阿洛酮糖的专利申请书^[148]。两年后，两家美国公司Bonumose和Greenlight Biosciences先后提交了淀粉合成阿洛酮糖的专利申请书^[149-150]，但是专利申请书中并没有充分公开包括酶来源、酶理化特性、反应条件、产品产量等关键技术信息。2021年，游淳课题组^[17]发表了第一篇学术论文，多酶分子机器催化淀粉合成高浓度阿洛酮糖，并公开了详细技术细节。

D-甘露糖是D-葡萄糖的C-2差向异构体，存在于一些水果和蔬菜中（如蔓越莓、卷心菜、西红柿），在人体血液中的含量约为葡萄糖的1%^[151]，广泛用于预防尿路感染或膀胱感染引起的炎症。最近的研究表明，超过正常生理范围的D-甘露糖剂量可以抑制肿瘤生长^[152]、刺激调节型T细胞分化^[153]、抑制巨噬细胞的生成^[151]。根据

Izumoring策略，可以通过D-果糖异构合成D-甘露糖，但由于反应平衡常数很低，需要色谱分离，导致生产成本高。受不依赖ATP的葡萄糖磷酸化反应—磷酸糖异构反应—脱磷酸反应的启发，李运杰等^[154]设计了一条多酶催化淀粉合成甘露糖的途径，并获得了高浓度的甘露糖产量。

因此，张以恒课题组提出了一个基于ivBT的稀有糖合成新策略（如图6所示），即不依赖ATP的葡萄糖磷酸化反应—磷酸糖异构反应—脱磷酸反应，可以高得率合成肌醇、塔格糖、阿洛酮糖、甘露糖、果糖等。这个ivBT策略能够超越Izumoring方法反应平衡的限制，达到接近100%的理论转化率。淀粉合成肌醇的工业化成功实施将推进健康糖工业生物制造。

3.3 纤维素合成淀粉

淀粉是植物、动物（在动物中称为糖原，也被称为动物淀粉）和微生物用来储存能量的葡萄

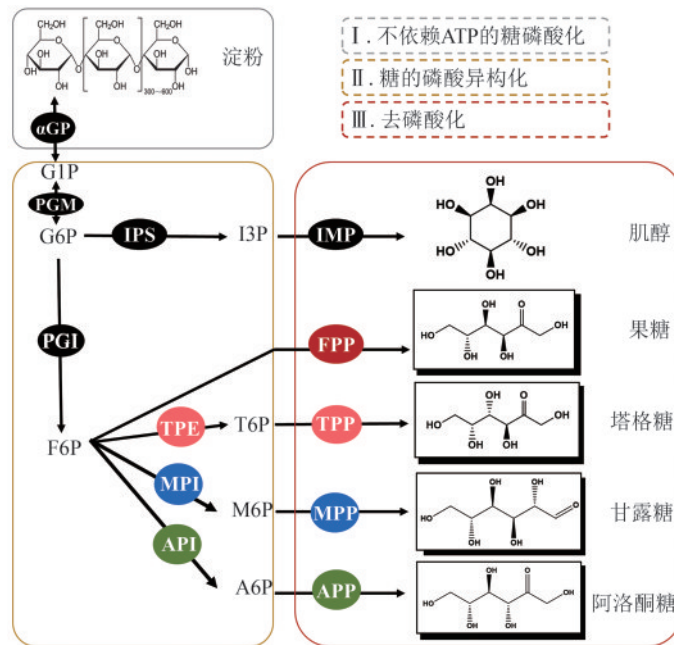


图6 ivBT利用淀粉合成健康糖的人工合成途径
(α GP、PGM、IPS、IMP同肌醇合成途径)

PGI—葡萄糖 6-磷酸异构酶；FPP—果糖 6-磷酸磷酸酶；TPE—塔格糖 6-磷酸 4-差向异构酶；TPP—塔格糖 6-磷酸磷酸酶；MPI—甘露糖 6-磷酸异构酶；MPP—甘露糖 6-磷酸磷酸酶；API—阿洛酮糖 6-磷酸异构酶；APP—阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶

Fig. 6 Rare sugars artificial synthesis pathway of ivBT

(Enzymes of α GP, PGM, IPS, IMP are the same as inositol synthesis pathway.)

PGI—phosphoglucose isomerase; FPP—fructose 6-phosphatase; TPE—tagatose 6-phosphate 4-epimerase; TPP—tagatose 6-phosphatase; MPI—mannose 6-phosphate isomerase; MPP—mannose 6-phosphatase; API—allulose 6-phosphate isomerase; APP—allulose 6-phosphatase

糖聚合物。植物淀粉包括直链淀粉（D-葡萄糖基以 α -1,4-糖苷键连接的多糖链）和支链淀粉（分支位置为 α -1,6-糖苷键，其余为 α -1,4糖苷键连接的多糖链）。人类文明开始于一万年前的农业耕种，种植单年生谷物，生产富含淀粉种子作为粮食。现代农业使用全球约70%的淡水消耗、占用几乎所有可用耕地以及消耗大量肥料与农药，每年生产约28亿吨粮食^[155-156]。同时，地球陆地每年产生大约2000亿吨的非粮木质纤维素，除小部分用作动物饲料、材料和燃料，大部分无法充分利用。

将人类无法食用的纤维素转化为可食用的淀粉将会变革万年农业。张以恒教授设计了一条无辅酶参与的体外多酶催化途径，实现了纤维素直接转化合成淀粉^[13]。如图7所示，这条途径包括三部分：①利用内切葡聚糖酶（EG）和纤维二糖水解酶（CBH）将纤维素部分水解生成纤维二糖；②利用纤维二糖磷酸化酶（CBP）催化纤维二糖生成葡萄糖1-磷酸和葡萄糖；③利用来源于马铃薯的 α -葡聚糖磷酸化酶催化葡萄糖1-磷酸合成直链淀粉，其中磷酸盐在CBP和PGP之间循环使用。为了避免浪费副产物葡萄糖，利用酵母细胞厌氧条件下发酵葡萄糖生成乙醇^[13]，或者利用酵母细胞有氧条件下发酵葡萄糖生长菌体作为微生物蛋白^[14]。这一原创性突破在《科学》杂志上以题为《木材能养活世界吗？》进行新闻报道，诺贝尔化学奖得主Frances Arnold评论：“该技术展示了一个重要的转换，总体思路很酷（cool）。”同时她也认为以目前技术水平难以对该技术的未来经济可行性做出判断。然而，张教授认为将 β -1,4-糖苷键连接的纤维素生物转化为 α -1,4-糖苷键连接的淀粉在经济上将可行的，因为这个糖苷键重排反应中不需要添加昂贵的辅酶，不需要能量输入，不存在糖损失，也没有苛刻的反应条件。

利用玉米秸秆和小麦秸秆等农业废弃物进行经济高效的生物转化合成淀粉，很容易使目前的农业粮食/饲料产量翻一番。张教授带领团队历时5年研究，集中解决经济上和技术上的“卡脖子”问题，取得了突破性进展，包括：①将多酶分子机器中的酶元件成本降低为原来的百万分之一；②利用预处理的玉米秸秆为真实原料，提高纤维素降解率和淀粉合成得率；③调控合成不同比例的直链淀粉和支链淀粉，以适应不同的饮食需求^[14]。同时，张教授建立了一条利用多酶分子机器催化D-木糖合成健康糖L-阿拉伯糖的新路线。L-阿拉伯糖具有抑制蔗糖吸收和控制血糖升高的优良特性，植物提取工艺受限于有限的原料和高昂的生产成本，无法大规模生产。新技术路线具有原料来源广泛与生产成本低的优势，生产大宗高值健康糖，补贴合成淀粉生产。联产合成淀粉、微生物蛋白与健康糖将大幅度提高新生物炼制工厂的经济可行性。这套秸秆制粮技术将会促进农业种植的变革，是解决粮食危机、实现农业可持续发展的重要途径之一，也能有效利用边际土地耕种多年生作物，就像种植多年生的韭菜、竹子和果树，每年“割韭菜”，从而大幅提高生物量产量和利用率，同时具有淡水消耗低、化肥使用少、几乎无污染、土地不用翻耕、水土保持好、生产周期长、耐受极端气候等优点^[9, 155, 157-158]。

3.4 二氧化碳合成淀粉

除了纤维素合成淀粉技术，天工所首次实现CO₂到淀粉的从头合成^[96]。自然界中淀粉主要由农作物通过自然光合作用固定CO₂生产，合成与积累涉及约60步代谢反应以及复杂的生理调控，最大能量转化效率仅为2%左右。农作物种植通常需

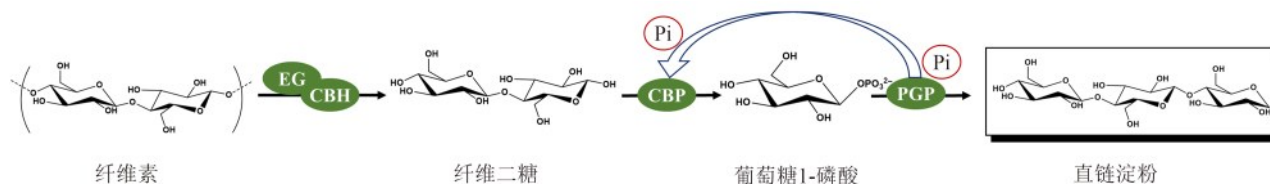


图7 ivBT的体外纤维素合成淀粉途径

(EG—内切葡聚糖酶；CBH—纤维二糖水解酶；CBP—纤维二糖磷酸化酶；PGP—马铃薯 α -葡聚糖磷酸化酶)

Fig. 7 Cellulose-amylose synthesis pathway of ivBT

(EG—endoglucanase; CBH—cellobiohydrolase; CBP—cellobiose phosphorylase; PGP—potato α -glucan phosphorylase)

较长周期，并使用大量土地、淡水等资源和肥料、农药等农业生产资料。利用 CO₂ 和太阳能的人工光合作用合成淀粉效率将大大超越植物自然光合作用。植物光合作用能量转换效率低主要是因为叶绿素的光吸收光谱较窄、较快的光反应和较慢的暗反应之间反应速率不匹配导致淀粉合成效率低，以及植物呼吸作用造成淀粉损失^[155, 159]。

基于 ivBT 途径设计原理、人工光电催化和热力学分析，将太阳能电池、电解水制氢技术和 ivBT 技术相结合，利用 CO₂ 和 H₂ 为原料合成淀粉在科学理论上是可行的^[155, 159]。2021年，马延和研

究员带领“合成营”创制了一条利用 CO₂、水和阳光合成淀粉的人工路线——ASAP 路线，在实验室首次实现了从 CO₂ 到淀粉的从头全合成^[96]。这条 ASAP 路线可以分为两大阶段：光能到化学能的转化和生物催化淀粉的合成。如图 8 所示，从头设计 11 步的非自然酶法催化甲醇合成淀粉的反应途径，通过设计构建碳一（C₁）聚合新酶，依据化学聚糖反应原理将碳一化合物聚合成碳三（C₃）化合物，最后通过生物途径优化，将碳三化合物聚合成碳六（C₆）化合物，再进一步合成直链和支链淀粉（C_n化合物）。这个人工途径的淀粉合成速率是玉

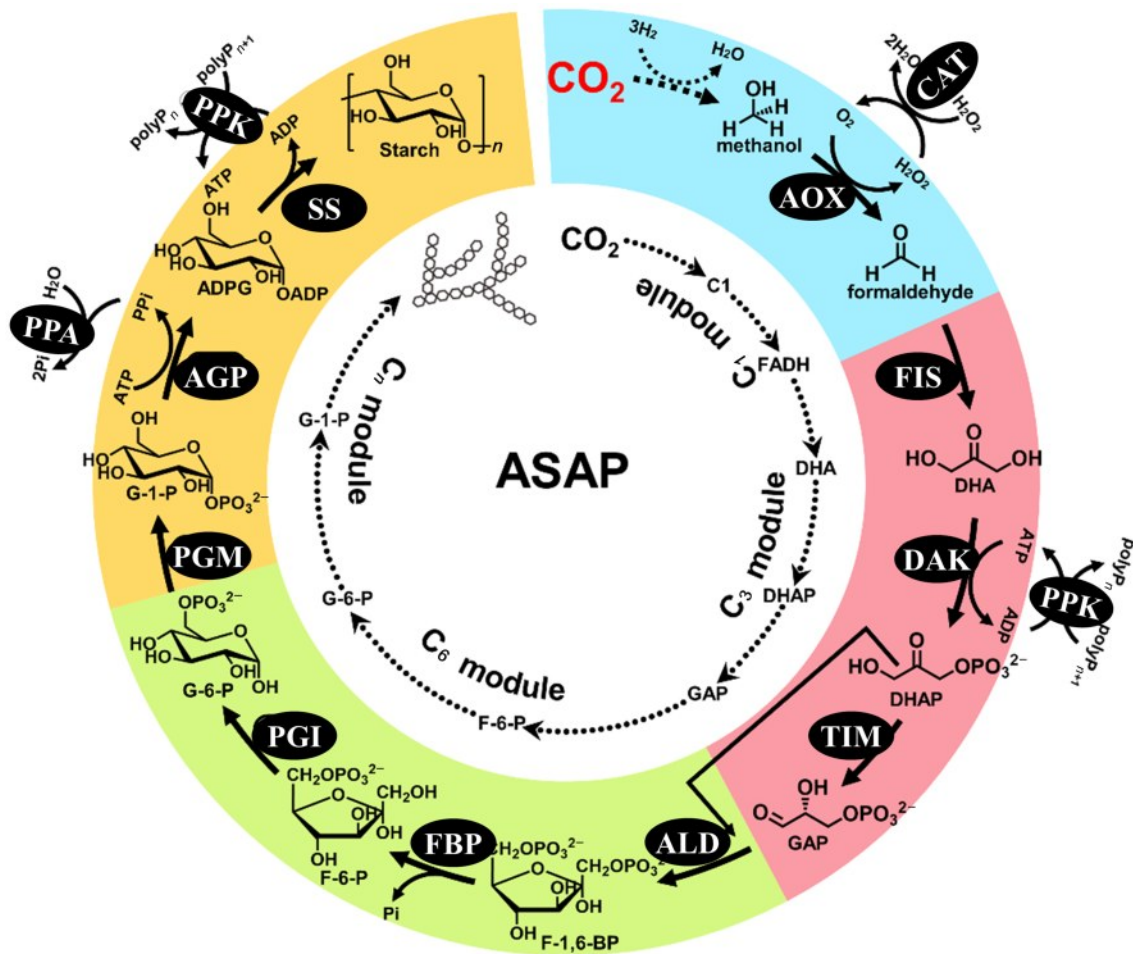


图 8 ivBT 的体外 CO₂ 合成淀粉途径^[96]

AOX—醇氧化酶；FIS—甲醛酶；DAK—二羟基丙酮激酶；TIM—磷酸甘油醛异构酶；ALD—果糖 1,6-二磷酸醛缩酶；FBP—果糖 1,6-二磷酸酶；PGI—葡萄糖 6-磷酸异构酶；PGM—葡萄糖 6-磷酸变位酶；AGP—ADP-葡萄糖焦磷酸化酶；SS—淀粉合成酶；CAT—过氧化氢酶；PPK—多聚磷酸激酶；PPA—焦磷酸酶

Fig. 8 CO₂-Starch synthesis pathway of ivBT^[96]

AOX—alcohol oxidase; FIS—formolase; DAK—dihydroxyacetone kinase; TIM—triose phosphate isomerase; ALD—fructose-bisphosphate aldolase; FBP—fructose bisphosphatase; PGI—phosphoglucose isomerase; PGM—phosphoglucomutase; AGP—ADP-glucose pyrophosphorylase; SS—starch synthase; CAT—catalase; PPK—polyphosphate kinase; PPA—pyrophosphatase

米淀粉合成速率的8.5倍，向设计自然、超越自然目标的实现迈进一大步，为解决粮食和饲料等问题提供了重要的理论支撑和技术储备^[9]。

该研究通过耦合化学催化与生物催化模块体系，创新了高密度能量与高浓度CO₂利用的生物过程技术，通过反应时空分离优化，解决了ivBT途径中底物竞争、产物抑制、热/动力学匹配等问题，扩展了人工光合作用的能力。按照目前技术参数推算，在能量供给充足条件下，理论上1 m³大小的生物反应器年产淀粉量相当于5亩（1亩=667 m²）土地玉米种植的淀粉年平均产量。CO₂人工合成淀粉成果入选国家“十三五”科技创新成就展、“奋进新时代”主题成就展、2021年度中国科学十大进展、两院院士评选2021年中国十大科技进展新闻等。

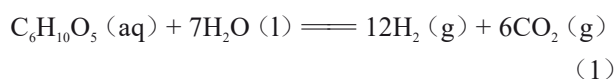
3.5 糖水制绿氢

氢能作为一种清洁、高效、安全、可持续的二次清洁能源，被誉为“21世纪终极能源”。氢是宇宙中分布最广泛的物质，是未来最有前途的能源载体，尤其适用于重型卡车、飞机、偏远地区等分布式用户。目前，全球氢气产量约为7000万吨，大部分来自化石燃料。预计到2030年，其产量将增加到3亿吨，且大部分来源于可再生能源。以氢为二次能源载体的能源系统被称为氢经济^[160-161]。然而，氢经济面临四大技术挑战：低成本绿色分布式制氢方法、高密度储氢载体、氢气基础设施以及低价长寿命氢燃料电池。如果氢经济成为现实，绿氢市场规模将达到十万亿以上美元，远超作为粮食的市场规模^[7]。

厌氧微生物的最大产氢能力是每摩尔葡萄糖产生4 mol氢气和2 mol乙酸，这是Thauer理论极限^[15, 162]。热力学理论指出每摩尔葡萄糖完全氧化水（不是氧气）可能产生12 mol氢气与6 mol二氧化碳^[163-164]，但是厌氧微生物无法突破Thauer理论极限^[165-166]。原因如下，如果厌氧微生物从每摩尔葡萄糖生成12 mol还原型辅酶（如NADPH），通过氢酶将还原力完全转化产生氢气，全生物过程没有ATP合成，难以实现维持微生物基础代谢，同时能量效率将远超过100%，显然热力学与生物能量学上不可能。如果厌氧微生物能够利用小部

分还原力（如1~2 mol NADPH）氧化生产跨细胞膜H⁺质子梯度，用于合成ATP（氧化磷酸化），将剩余大约10~11 mol NADPH用于产氢，然而需要氧气的氧化磷酸化是与对氧敏感的氢酶要求厌氧条件下产氢相矛盾的。因此，现有技术对微生物进行遗传改造也无法打破Thauer极限^[165-166]。

ivBT的体外途径设计理念始于构建多酶分子机器催化糖水制氢^[5, 160]。2006年3月，张以恒教授构思一条无ATP参与的体外多酶代谢途径，利用淀粉和水为原料生产高得率氢气^[11]。如图9所示，这条途径包括四个模块：①以淀粉和无机磷为原料合成葡萄糖6-磷酸，底物磷酸化不需要ATP参与（这个模块后来也被用于淀粉合成肌醇、健康糖、糖电池等途径）；②葡萄糖6-磷酸在2分子脱氢酶级联催化下生成核酮糖5-磷酸和2分子NADPH；③6分子核酮糖5-磷酸通过非氧化磷酸化途径循环再生成5分子葡萄糖6-磷酸；④2分子NADPH在氢酶催化下生成氢气，总方程式如式（1）所示。糖水制氢的概念验证实验由来源于细菌、酵母、植物、动物和古细菌共13个酶元件参与级联裂解水与糖，每摩尔葡萄糖生产接近12 mol氢气。2007年论文明确提出糖水制氢（或人工呼吸作用就是用水而不是氧气实现糖的完全氧化）的意义：该项工作具备一系列优势，包括温和的反应条件、高转化得率、低生产成本（大约2美元/kg H₂）和高能量密度载体淀粉（14.8 kg H₂/kg 淀粉）等，为移动应用提供了巨大的潜力。随着技术进步和与燃料电池集成，该技术有望解决氢储存、基础设施与安全性的相关挑战。



2008年，英国皇家学会指出“张以恒的糖水制氢工作是一个便宜、绿色、高得率制氢技术的开始”，该突破是合成生物学的应用典范之一（英国皇家学会认为另一个典范是青蒿素微生物合成）。氢经济的巨大潜力和糖水制氢技术的长远可行性促使张教授带领研发团队在新能源体系中“圣杯”方向深耕超过15年，总结已取得的关键技术突破如下：①提高酶元件稳定性和降低酶成本，除了*Thermococcus kodakarensis* KOD1表达的热稳定氢酶SH I之外，其他12个酶元件已替换为大肠

杆菌表达的超稳重组酶元件，它们能够在 80 °C 条件下工作一周以上 [24, 104]。②扩展糖原料来源，糖水制氢的糖原料从淀粉扩展至纤维素、蔗糖、低聚木糖、木糖和葡萄糖 [4, 167-169]。③提高淀粉原料利用率，通过挖掘和改造提升热稳酶的催化性能实现淀粉原料葡萄糖单元全利用，如 4-葡聚糖苷转移酶催化利用麦芽糖 [170]、PPGK 利用葡萄糖 [40, 111]、异淀粉酶水解支链淀粉生成直链淀粉 [109]。④大幅提高氢气生产速率 1000 倍，通过建立动力学模型寻找限速步骤、优化系统中酶元件配比和添加

量、使用高活性酶元件等工作的集成和优化，将氢气生产速率提高了 1000 倍 [24, 104]。⑤降低辅酶成本和提高反应速度，构建人工电子传递链降低辅酶成本和提高反应速率。在 NADPH rubredoxin 氧化还原酶催化 NADPH 和 SH I 之间加入电子中介体苜蓿基紫精 (benzyl viologen)、甲基紫精 (methyl viologen) 或中性红 (neutral red) 作为桥梁，大幅度降低限速步骤的活化能，极大提高产氢速率。⑥仿生辅酶工程。针对两个脱氢酶 G6PDH 和 6PGDH 进行工程改造，将其辅因子由 NADP 变更

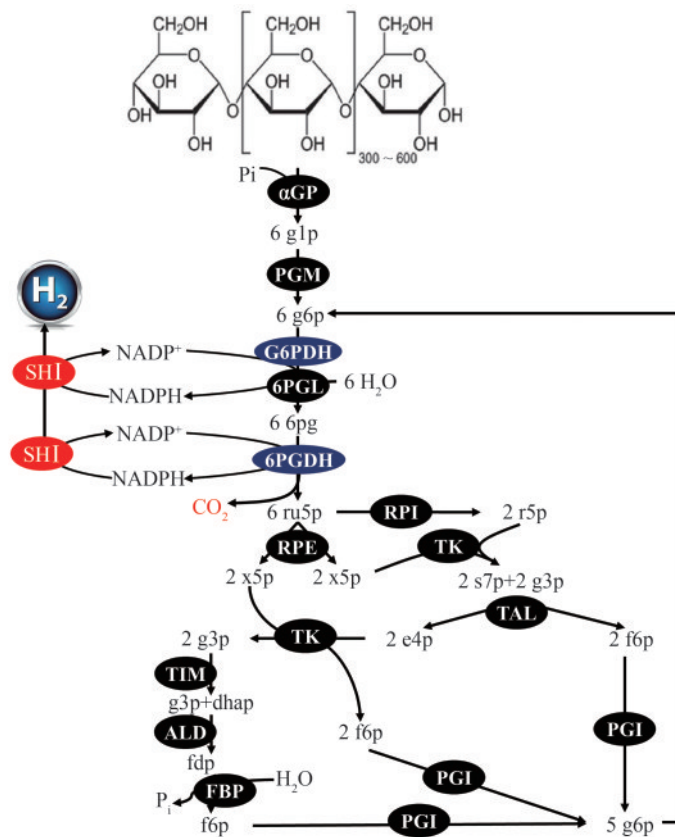


图9 淀粉体外合成氢气途径

α GP 和 PGM 同肌醇合成途径。G6PDH—葡萄糖 6-磷酸脱氢酶；6PGL—6-磷酸葡萄糖内酯酶；6PGDH—6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶；RPI—核糖 5-磷酸异构酶；RPE—核酮糖 5-磷酸 3-差向异构酶；TK—转酮酶；TAL—转醛酶；TIM—磷酸甘油醛异构酶；ALD—果糖 1,6-二磷酸醛缩酶；FBP—果糖 1,6-二磷酸酶；PGI—葡萄糖 6-磷酸异构酶；SH I—氢酶。代谢物：g1p—葡萄糖 1-磷酸；g6p—葡萄糖 6-磷酸；6pg—6-磷酸葡萄糖酸酯；ru5p—核酮糖 5-磷酸；x5p—木糖 5-磷酸；r5p—核糖 5-磷酸；s7p—景天庚酮糖 7-磷酸；g3p—甘油醛 3-磷酸；e4p—赤藓糖 4-磷酸；dhap—磷酸二羟丙酮；fdp—果糖 1,6-二磷酸；f6p—果糖 6-磷酸

Fig. 9 Hydrogen synthesis pathway of ivBT

Enzymes of α GP and PGM are the same as inositol synthesis pathway. G6PDH—glucose 6-phosphate dehydrogenase; 6PGL—6-phosphogluconolactonase; 6PGDH—6-phosphogluconate dehydrogenase; RPI—ribose 5-phosphate isomerase; RPE—ribulose 5-phosphate 3-epimerase; TK—transketolase; TAL—transaldolase; TIM—triose phosphate isomerase; ALD—fructose-bisphosphate aldolase; FBP—fructosebisphosphatase; PGI—phosphoglucose isomerase; SH I—soluble hydrogenase I. The metabolites are: g1p—glucose 1-phosphate; g6p—glucose 6-phosphate; 6pg—6-phospho-D-gluconolactone; ru5p—ribulose 5-phosphate; x5p—xylulose 5-phosphate; r5p—ribose 5-phosphate; s7p—sedoheptulose 7-phosphate; g3p—glyceraldehyde 3-phosphate; e4p—erythrose 4-phosphate; dhap—dihydroxacetone phosphate; fdp—fructose 1,6-diphosphate; f6p—fructose 6-phosphate

为 NAD，最终变更为仿生辅酶 NMN^[43, 45-46, 171-172]。张教授认为使用非生物电子中介体和仿生辅酶将能够实现更低成本和更高速度的糖水制氢。

糖水制氢的化学反应是一种非常罕见的熵（不是焓）驱动化学反应，它能够将环境热能转化为氢能，化学效率超过 100%，这并不违反热力学定律。该熵增（相变）化学反应原理是多酶分子机器在没有显著温度差条件下，吸收环境热能（低级熵）转化并产生高品质化学能氢能（高级熵）；也就是说，在常温常压条件下，多酶分子机器通过级联释放储存在淀粉中的化学能，裂解水分子的化学键，同时利用环境热能生成高纯度氢气。利用两个能源输入（淀粉化学能与环境热能）生产一个能源输出（氢气），这个过程有点像特殊氢酶催化歧化反应。因此，将吸热产氢反应、放热氢燃料电池和电机进行整合将是人类历史上的化学-机械能量效率最高的能量转换系统，为未来新动力系统奠定坚实的科技基础。淀粉是一种高密度储氢介质，淀粉水浆与干淀粉的储氢密度分别达到 8.3% 和 14.8%（质量分数），以淀粉作为高密度储氢载体的新型能源体系将系统地解决氢经济中的氢生产、储存、运输和应用的挑战。

总而言之，氢经济的巨大潜力和基于 ivBT 的淀粉制绿氢技术的独特性质，将吸引和激励着越来越多的科学家、工程师与企业家投身于这项技术的改进与提升，以及产业化应用。

4 展 望

随着全球人口继续增长，人类社会面临粮食

安全、能源安全、可持续发展、气候变化等重大挑战。工业生物制造正在进入新质生产力阶段，将在能源、农业、化工和医药等领域改变世界工业制造格局，是未来科技战必争之地。如图 10 所示，生物学有着三个不同研究模式：①基础生物学（如生物化学、分子生物学、遗传学等），面对复杂生物体（黑箱）格物致知，了解生物，扩展生物学认知；②新生物学（合成生物学），面对部分了解的生物体（灰箱），采用设计-构建-测试-学习策略，循环迭代实现造物致知与造物致用；③致用造物，需求驱动产业创新，应用基于道法术器的顶层设计原则^[173]，针对人造生物体系（白箱），如多酶分子机器、人造生命等，采用设计-构建-判决-优化的线性策略开发能够满足国家需求的人造生物体系，用于工业生物制造，其中 ivBT 的多酶分子机器将会发挥关键作用。

中国工业生物制造产业的现状是大而不强。大品种氨基酸、抗生素、维生素、有机酸等生产能力世界第一，为全人类福利做出重大贡献，但是利润率很低；工业生物制造技术原创能力弱，卡脖子技术多；技术知识产权保护差，同质化红海竞争，比价格、比资源、比管理、比渠道，不比技术，原创性技术不值钱。这种现状导致产学研的负反馈循环：企业家不愿投资新技术，新技术不值钱；研发投入小，回报低，行业不景气，年轻人不愿意进入工业生物技术行业；技术持续落后，缺乏原创性技术。

ivBT 是工业生物制造的新前沿，不仅具有高产品得率、高制造强度和低制造成本的技术特色，而且具有技术保密性强和生物安全性高的产业化特性。

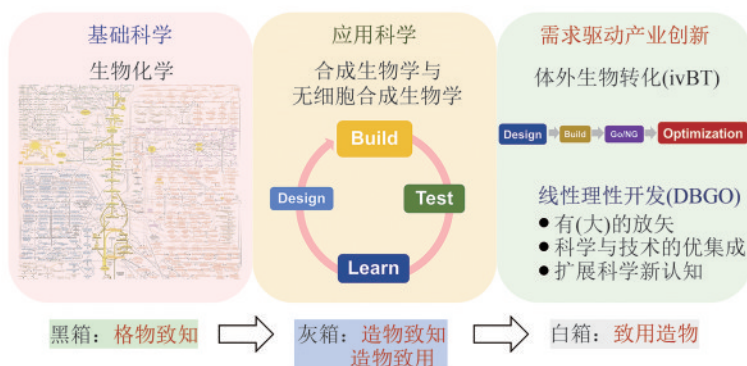


图 10 生物学研发模式：黑箱-灰箱-白箱

Fig. 10 The development of scientific research and development model: black-box, gray-box and white-box

如表3所示,对于某些产品,ivBT可以颠覆传统的发酵生产方式,带来的是“降维打击”,能够快速扫除竞争对手,打造行业寡头,获得垄断利润,避免红海竞争,让企业家和发明家实现共赢。

基于我国国情(粮食安全形势严峻),利用颠覆性ivBT技术生产人造淀粉为解决中国粮食安全问题指明大方向,纤维素合成淀粉符合第一性原理:其短期目标是满足动物饲料热量来源需求;CO₂合成人造淀粉是一个中长期目标,同时帮助实现电能到淀粉化学能转化与电能的长期储存;糖水制绿氢技术为氢经济和新型能源体系的建立提供了新技术思路。长期来看,大规模实施CO₂到淀粉的人工光合作用可以帮助构建以淀粉为中心的碳中性新型能源系统,该系统将清洁电能固定CO₂储存为淀粉,将淀粉转化为电能、氢能、粮食与材料等,能满足不同需求,以及构建支撑人类生存的新生态系统。

ivBT技术体系亟需改善多个技术问题^[9],包括但不限于低成本酶元件生产和仿生辅酶循环再生等:①开发特殊重组酶的低成本生产技术。工业生产分泌酶的成本(如 α -淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、植酸酶)大约是100元/千克酶(干重);

工业生产胞内重组高温酶的成本已经低至250元/千克酶(干重)^[1, 14]。但是,对于特殊酶(如对氧敏感的复合酶氢酶、固氮酶、CO₂还原酶等、真核来源的酶等),它们的生产成本高、技术难度大以及工业放大难,限制了ivBT的某些目标产品(如绿氢)的大规模生产和应用。因此,需要开发普适性超低成本重组酶生产技术,使酶元件的生产成本低至50元/千克酶(干重),降低机器成本。②建立基于仿生辅酶循环再生技术。仿生辅酶具有成本低与稳定性好等优点^[174],目前电化学NAD(P)H再生面临NAD成本高、电势高、法拉第效率低等问题^[175],通过电极表面修饰^[176]、氧化还原介质^[177]等方法可以部分缓解,却无法彻底避免这类问题。开发仿生辅酶循环再生技术可能是最好的解决方案。通过对NAD依赖型脱氢酶进行辅酶工程改造,且仿生辅酶被电还原时不会形成二聚体,能够有效解决辅酶循环再生的技术和生产应用问题。

总而言之,ivBT是一个颠覆性工业新质生物制造平台,目前尚处于技术高速发展期与产业化初期,随着各项支撑技术的不断进步与成熟,将在生物经济与生物制造中发挥越来越重要的角色。

表3 ivBT作为工业生物制造平台的技术优势

Table 3 Advantages of ivBT for biomanufacturing

比较内容	细胞工厂的局限	体外生物转化的优势
生长偶联	细胞生长繁殖与产品制造的耦合,存在有限资源竞争、分配与调控等难题	催化剂合成与产品制造时空分离,产品制造是唯一目标
产品得率	产品得率低(由于细胞繁殖、副产物生成等问题)	近理论得率
能量限制	生物能量学限制,需ATP与还原力的净合成	ATP与还原力的平衡,不浪费生物能量
反应速率	反应速度(Rxn)低	Rxn提升10倍以上
生物大分子合成	生物大分子不能通过细胞	没有细胞膜,大分子降解与合成耦合
特殊极性分子合成	特殊极性分子合成如磷酸糖不能过细胞膜	没有细胞膜,自由扩散
三传限制	细胞体内三传“动量传递、热量传递、质量传递”限制	超限制造(微通道反应器)超越传统“三传”限制

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] CLOMBURG J M, CRUMBLY A M, GONZALEZ R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production [J]. *Science*, 2017, 355(6320): aag0804.
- [3] SCOWN C D. Prospects for carbon-negative biomanufacturing [J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(12): 1415-1424.
- [4] ROLLIN J A, YE X H, MARTIN DEL CAMPO J, et al. Novel hydrogen bioreactor and detection apparatus[M/OL]//BAO J, YE Q, ZHONG J J. *Bioreactor engineering research and industrial applications II*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014 [2023-12-01]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2014_274.
- [5] 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.
- [6] ZHANG Y H P. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 715-725.
- [7] ZHANG Y H P. What is vital (and not vital) to advance economically-competitive biofuels production[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(11): 2091-2110.
- [8] ZHANG Y H P. Production of biofuels and biochemicals by *in vitro* synthetic biosystems: opportunities and challenges[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1467-1483.
- [9] ZHANG Y H P, ZHU Z G, YOU C, et al. *In vitro* BioTransformation (ivBT): definitions, opportunities, and challenges[J]. *Synthetic Biology and Engineering*, 2023, 1(2): 10013.
- [10] THAUER R K, JUNGERMANN K, DECKER K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria[J]. *Bacteriological Reviews*, 1977, 41(1): 100-180.
- [11] ZHANG Y H, EVANS B R, MIELENZ J R, et al. High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway[J]. *PLoS One*, 2007, 2(5): e456.
- [12] KIM J E, KIM E J, CHEN H, et al. Advanced water splitting for green hydrogen gas production through complete oxidation of starch by *in vitro* metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 246-252.
- [13] YOU C, CHEN H G, MYUNG S, et al. Enzymatic transformation of nonfood biomass to starch[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(18): 7182-7187.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] LI Y J, SHI T, HAN P P, et al. Thermodynamics-driven production of value-added D-allulose from inexpensive starch by an *in vitro* enzymatic synthetic biosystem[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(9): 5088-5099.
- [18] 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.
- [19] CHEN H G, ZHANG Y H P J. Enzymatic regeneration and conservation of ATP: challenges and opportunities[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(1): 16-33.
- [20] SHI T, HAN P P, YOU C, et al. An *in vitro* synthetic biology platform for emerging industrial biomanufacturing: bottom-up pathway design[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(3): 186-195.
- [21] WICHMANN R, VASIC-RACKI D. Cofactor regeneration at the lab scale[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2005, 92: 225-260.
- [22] ZHU Z G, WANG Y R, MINTEER S D, et al. Maltodextrin-powered enzymatic fuel cell through a non-natural enzymatic pathway[J]. *Journal of Power Sources*, 2011, 196(18): 7505-7509.
- [23] NOWAK C, PICK A, LOMMES P, et al. Enzymatic reduction of nicotinamide biomimetic cofactors using an engineered glucose dehydrogenase: providing a regeneration system for artificial cofactors[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(8): 5202-5208.
- [24] SONG Y H, LIU M X, XIE L P, et al. A recombinant 12-His tagged *Pyrococcus furiosus* soluble [NiFe]-hydrogenase I overexpressed in *Thermococcus kodakarensis* KOD1 facilitates hydrogen-powered *in vitro* NADH regeneration[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(4): e1800301.
- [25] ANNE A, BOURDILLON C, DANINOS S, et al. Can the combination of electrochemical regeneration of NAD⁺, selectivity of L-alpha-amino-acid dehydrogenase, and reductive amination of alpha-keto-acid be applied to the inversion of configuration of a L-alpha-amino-acid? [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64(1): 101-107.
- [26] TISHKOV V I, POPOV V O. Protein engineering of formate dehydrogenase[J]. *Biomolecular Engineering*, 2006, 23(2/3): 89-110.
- [27] WANDREY C. Biochemical reaction engineering for redox reactions[J]. *Chemical Record*, 2004, 4(4): 254-265.
- [28] INOUE K, MAKINO Y, ITOH N. Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 3633-3641.
- [29] JOHANNES T W, WOODYER R D, ZHAO H M. Directed evolution of a thermostable phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 5728-5734.
- [30] 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(1): 30.
- [31] WANG Y R, HUANG W D, SATHITSUKSANO N, et al. Biohydrogenation from biomass sugar mediated by *in vitro*

- synthetic enzymatic pathways[J]. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(3): 372-380.
- [32] HUANG H, PANDYA C, LIU C L, et al. Panoramic view of a superfamily of phosphatases through substrate profiling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(16): E1974-E1983.
- [33] VERHEES C H, AKERBOOM J, SCHILTZ E, et al. Molecular and biochemical characterization of a distinct type of fructose-1, 6-bisphosphatase from *Pyrococcus furiosus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(12): 3401-3405.
- [34] TIAN C Y, YANG J G, LIU C, et al. Engineering substrate specificity of HAD phosphatases and multienzyme systems development for the thermodynamic-driven manufacturing sugars[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3582.
- [35] WANG W, LIU M X, YOU C, et al. ATP-free biosynthesis of a high-energy phosphate metabolite fructose 1,6-diphosphate by *in vitro* metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 168-174.
- [36] ZHOU W, YOU C, MA H W, et al. One-pot biosynthesis of high-concentration α -glucose 1-phosphate from starch by sequential addition of three hyperthermophilic enzymes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(8): 1777-1783.
- [37] SRIVASTAVA D K, BERNHARD S A. Metabolite transfer *via* enzyme-enzyme complexes[J]. *Science*, 1986, 234(4780): 1081-1086.
- [38] YOU C, MYUNG S, ZHANG Y H P. Facilitated substrate channeling in a self-assembled trifunctional enzyme complex [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(35): 8787-8790.
- [39] ZHU Z G, SONG H Y, WANG Y M, et al. Protein engineering for electrochemical biosensors[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 76: 102751.
- [40] ZHOU W, HUANG R, ZHU Z G, et al. Coevolution of both thermostability and activity of polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(16): e01224-18.
- [41] LIU W J, HONG J, BEVAN D R, et al. Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103(6): 1087-1094.
- [42] 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.
- [43] ROLLIN J A, TAM T K, ZHANG Y H P. New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing[J]. *Green Chemistry*, 2013, 15(7): 1708-1719.
- [44] HUANG R, CHEN H, ZHONG C, et al. High-throughput screening of coenzyme preference change of thermophilic 6-phosphogluconate dehydrogenase from NADP⁺ to NAD⁺ [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32644.
- [45] HUANG R, CHEN H, UPP D M, et al. A high-throughput method for directed evolution of NAD(P)⁺-dependent dehydrogenases for the reduction of biomimetic nicotinamide analogues[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(12): 11709-11719.
- [46] MENG D D, LIU M X, SU H, et al. Coenzyme engineering of glucose-6-phosphate dehydrogenase on a nicotinamide-based biomimic and its application as a glucose biosensor[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(3): 1983-1998.
- [47] MA C L, WU R R, HUANG R, et al. Directed evolution of a 6-phosphogluconate dehydrogenase for operating an enzymatic fuel cell at lowered anodic pHs[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 851: 113444.
- [48] MA C L, LIU M X, YOU C, et al. Engineering a diaphorase *via* directed evolution for enzymatic biofuel cell application[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2020, 7: 23.
- [49] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [50] LIU J, GUO Z Y, WU T Q, et al. Enhancing alphafold-multimer-based protein complex structure prediction with MULTICOM in CASP15[J]. *Communications Biology*, 2023, 6: 1140.
- [51] STAHL K, GRAZIADEI A, DAU T, et al. Protein structure prediction with in-cell photo-crosslinking mass spectrometry and deep learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(12): 1810-1819.
- [52] MYUNG S, ZHANG Y H. Non-complexed four cascade enzyme mixture: simple purification and synergetic co-stabilization[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61500.
- [53] FREEMAN A, WOODLEY J M, LILLY M D. *In situ* product removal as a tool for bioprocessing[J]. *Nature Biotechnology*, 1993, 11(9): 1007-1012.
- [54] LI H P, YOU Z N, LIU Y Y, et al. Continuous-flow microreactor-enhanced clean NAD⁺ regeneration for biosynthesis of 7-oxo-lithocholic acid[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(1): 456-463.
- [55] VASIC-RACKI D. History of industrial biotransformations-dreams and realities[M/OL]//LIESE A, SEEBALD S, WANDREY C. 2nd Edition. *Industrial biotransformations*. Weinheim: Wiley-VCH, KGaA, 2006[2023-12-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527608188.ch1>.
- [56] MICHELS P, ROSAZZA J. The evolution of microbial transformations for industrial applications[J]. *SIM News*, 2009, 2009: 36-52.
- [57] FU J L, YANG Y R, JOHNSON-BUCK A, et al. Multi-enzyme

- complexes on DNA scaffolds capable of substrate channelling with an artificial swinging arm[J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9(7): 531-536.
- [58] LIN J L, PALOME L, WHEELDON I. Design and analysis of enhanced catalysis in scaffolded multienzyme cascade reactions[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(2): 505-511.
- [59] FRANCE S P, HEPWORTH L J, TURNER N J, et al. Constructing biocatalytic cascades: *in vitro* and *in vivo* approaches to *de novo* multi-enzyme pathways[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(1): 710-724.
- [60] WOODLEY J M. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(12): 4733-4739.
- [61] DE WILDEMAN S M, SONKE T, SCHOEMAKER H E, et al. Biocatalytic reductions: from lab curiosity to “first choice”[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2007, 40(12): 1260-1266.
- [62] BOZIC M, PRICELIUS S, GUEBITZ G M, et al. Enzymatic reduction of complex redox dyes using NADH-dependent reductase from *Bacillus subtilis* coupled with cofactor regeneration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 563-571.
- [63] XU Z N, JING K J, LIU Y, et al. High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(1): 83-90.
- [64] MERTENS R, LIESE A. Biotechnological applications of hydrogenases[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(4): 343-348.
- [65] JOHANNES T W, WOODYER R D, ZHAO H M. Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96(1): 18-26.
- [66] NAM K Y, STRUCK D K, HOLTZAPPLE M T. ATP regeneration by thermostable ATP synthase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 51(3): 305-316.
- [67] RESNICK S M, ZEHNDER A J. *In vitro* ATP regeneration from polyphosphate and AMP by polyphosphate: AMP phosphotransferase and adenylate kinase from *Acinetobacter johnsonii* 210A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2045-2051.
- [68] FRANKE D, MACHAJEWSKI T, HSU C C, et al. One-pot synthesis of L-fructose using coupled multienzyme systems based on rhamnulose-1-phosphate aldolase[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2003, 68(17): 6828-6831.
- [69] SCHOEVAART R, VAN RANTWIJK F, SHELDON R A. A four-step enzymatic cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2000, 65(21): 6940-6943.
- [70] ZHANG J B, SHAO J, KOWAL P, et al., Enzymatic synthesis of oligosaccharides[M/OL]/WONG C H. Carbohydrate-based drug discovery. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, 2005, 137-167[2023-12-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527602437.ch6>.
- [71] FESSNER W D, HELAINE V. Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(6): 574-586.
- [72] FESSNER W D. Enzyme mediated C—C bond formation[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, 2(1): 85-97.
- [73] ENDO T, KOIZUMI S. Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 10(5): 536-541.
- [74] FESSNER W D. Systems Biocatalysis: development and engineering of cell-free “artificial metabolisms” for preparative multi-enzymatic synthesis[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(6): 658-664.
- [75] HUANG K T, WU B C, LIN C C, et al. Multi-enzyme one-pot strategy for the synthesis of sialyl Lewis X-containing PSGL-1 glycopeptide[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(12): 2151-2155.
- [76] SWARTZ J R. Cell-free bioprocessing[J]. *Chemical Engineering Progress*, 2013, 2013(11): 40-45.
- [77] CARLSON E D, GAN R, HODGMAN C E, et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(5): 1185-1194.
- [78] SHIMIZU Y, INOUE A, TOMARI Y, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(8): 751-755.
- [79] KARIM A S, JEWETT M C. A cell-free framework for rapid biosynthetic pathway prototyping and enzyme discovery[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 116-126.
- [80] HARRIS D C, JEWETT M C. Cell-free biology: exploiting the interface between synthetic biology and synthetic chemistry[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(5): 672-678.
- [81] CHIBA C H, KNIRSCH M C, AZZONI A R, et al. Cell-free protein synthesis: advances on production process for biopharmaceuticals and immunobiological products[J]. *BioTechniques*, 2021, 70(2): 126-133.
- [82] PARDEE K, SLOMOVIC S, NGUYEN P Q, et al. Portable, on-demand biomolecular manufacturing[J]. *Cell*, 2016, 167(1): 248-259.e12.
- [83] STAMATIS C, FARID S S. Process economics evaluation of cell-free synthesis for the commercial manufacture of antibody drug conjugates[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(4): e2000238.
- [84] STECH M, RAKOTOARINORO N, TEICHMANN T, et al. Synthesis of fluorescently labeled antibodies using non-canonical amino acids in eukaryotic cell-free systems[J].

- Methods in Molecular Biology, 2021, 2305: 175-190.
- [85] LÜDDECKE T, PAAS A, TALMANN L, et al. A spider toxin exemplifies the promises and pitfalls of cell-free protein production for venom biodiscovery[J]. *Toxins*, 2021, 13 (8): 575.
- [86] RAMM F, JACK L, KASER D, et al. Cell-free systems enable the production of AB₃ toxins for diagnostic applications[J]. *Toxins*, 2022, 14(4): 233.
- [87] PE'ERY T, MATHEWS M B. Synthesis and purification of single-stranded RNA for use in experiments with PKR and in cell-free translation systems[J]. *Methods*, 1997, 11(4): 371-381.
- [88] LYND L R, WYMAN C E, GERNGROSS T U. Biocommodity engineering[J]. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(5): 777-793.
- [89] ROLLIN J A, MARTIN DEL CAMPO J, MYUNG S, et al. High-yield hydrogen production from biomass by *in vitro* metabolic engineering: mixed sugars coutilization and kinetic modeling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(16): 4964-4969.
- [90] OPGENORTH P H, KORMAN T P, BOWIE J U. A synthetic biochemistry module for production of bio-based chemicals from glucose[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(6): 393-395.
- [91] ZHU Z G, KIN TAM T, SUN F F, et al. A high-energy-density sugar biobattery based on a synthetic enzymatic pathway[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3026.
- [92] CHENG K, ZHENG W M, CHEN H G, et al. Upgrade of wood sugar D-xylose to a value-added nutraceutical by *in vitro* metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 1-8.
- [93] SHI T, LIU S, ZHANG Y P J. CO₂ fixation for malate synthesis energized by starch *via in vitro* metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 152-160.
- [94] KIM E J, WU C H, ADAMS M W, et al. Exceptionally high rates of biological hydrogen production by biomimetic *in vitro* synthetic enzymatic pathways[J]. *Chemistry*, 2016, 22(45): 16047-16051.
- [95] ZHONG C, WEI P, ZHANG Y H P. Enhancing functional expression of codon-optimized heterologous enzymes in *Escherichia coli* BL21(DE3) by selective introduction of synonymous rare codons[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(5): 1054-1064.
- [96] CAI T, SUN H B, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. *Science*, 2021, 373 (6562): 1523-1527.
- [97] DENG X L, FAN M, WU M, et al. Continuous-flow enzymatic synthesis of chiral lactones in a three-dimensional microfluidic reactor[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2024, 35(3): 108684.
- [98] DUDLEY Q M, KARIM A S, JEWETT M C. Cell-free metabolic engineering: biomanufacturing beyond the cell[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(1): 69-82.
- [99] OPGENORTH P H, KORMAN T P, IANCU L, et al. A molecular rheostat maintains ATP levels to drive a synthetic biochemistry system[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13 (9): 938-942.
- [100] HOLD C, BILLERBECK S, PANKE S. Forward design of a complex enzyme cascade reaction[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12971.
- [101] 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.
- [102] GUTERL J K, GARBE D, CARSTEN J, et al. Cell-free metabolic engineering: production of chemicals by minimized reaction cascades[J]. *ChemSusChem*, 2012, 5(11): 2165-2172.
- [103] CHEN K, ARNOLD F H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(12): 5618-5622.
- [104] KIM E J, KIM J E, ZHANG Y H P J. Ultra-rapid rates of water splitting for biohydrogen gas production through *in vitro* artificial enzymatic pathways[J]. *Energy & Environmental Science*, 2018, 11(8): 2064-2072.
- [105] ZHANG Y H, ZHOU W. D-xylose 4-epimerase, mutant thereof and use thereof: CN113122528A[P]. 2021-07-16.
- [106] SONG Z, LI Y, LI Y J, et al., Aminomutation catalyzed by CO₂ self-sufficient cascade amino acid decarboxylases[EB/OL]. *bioRxiv*, 2023.08.12.552924. (2023-08-12)[2023-12-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.08.12.552924v1>.
- [107] ZHONG C, YOU C, WEI P, et al. Thermal cycling cascade biocatalysis of *myo*-inositol synthesis from sucrose[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(9): 5992-5999.
- [108] COLODNY L, HOFFMAN R L. Inositol: clinical applications for exogenous use[J]. *Alternative Medicine Review*, 1998, 3 (6): 432-447.
- [109] CHENG K, ZHANG F, SUN F F, et al. Doubling power output of starch biobattery treated by the most thermostable isoamylase from an archaeon *Sulfolobus tokodaii*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13184.
- [110] JEON B S, TAGUCHI H, SAKAI H, et al. 4-alpha-glucanotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: enzyme purification and characterization, and gene cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 248(1): 171-178.
- [111] LIAO H H, MYUNG S, ZHANG Y H P. One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

- 2012, 93(3): 1109-1117.
- [112] FLAMHOLZ A, NOOR E, BAR-EVEN A, et al. eEquilibrator: the biochemical thermodynamics calculator[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D770-D775.
- [113] HAN P P, ZHOU X G, YOU C. Efficient multi-enzymes immobilized on porous microspheres for producing inositol from starch[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 380.
- [114] 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.
- [115] TANG E J, SHEN X L, WANG J, et al. Synergetic utilization of glucose and glycerol for efficient *myo*-inositol biosynthesis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(4): 1247-1252.
- [116] YOU R, WANG L, SHI C R, et al. Efficient production of *myo*-inositol in *Escherichia coli* through metabolic engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 109.
- [117] 欧阳平凯. 我国工业生物技术发展回顾及展望[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 3991-4000.
- OUYANG P K. The industrial biotechnology in China: development and outlook[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 3991-4000.
- [118] FUJISAWA T, FUJINAGA S, ATOMI H. An *in vitro* enzyme system for the production of *myo*-inositol from starch[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(16): e00550-17.
- [119] LU Y P, WANG L, TENG F, et al. Production of *myo*-inositol from glucose by a novel trienzymatic cascade of polyphosphate glucokinase, inositol 1-phosphate synthase and inositol monophosphatase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 112: 1-5.
- [120] MENG D D, WEI X L, ZHANG Y H P J, et al. Stoichiometric conversion of cellulosic biomass by *in vitro* synthetic enzymatic biosystems for biomanufacturing[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(10): 9550-9559.
- [121] GRANSTRÖM T B, TAKATA G, TOKUDA M, et al. Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 97(2): 89-94.
- [122] ZHANG W L, ZHANG T, JIANG B, et al. Enzymatic approaches to rare sugar production[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(2): 267-274.
- [123] IZUMORI K. Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124(4): 717-722.
- [124] LEVIN G V. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2002, 5(1): 23-36.
- [125] CHEETHAM P S J, WOOTTON A N. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(2): 105-108.
- [126] RHIMI M, AGHAJARI N, JUY M, et al. Rational design of *Bacillus stearothermophilus* US100 L-arabinose isomerase: potential applications for D-tagatose production[J]. *Biochimie*, 2009, 91(5): 650-653.
- [127] BOSSHART A, HEE C S, BECHTOLD M, et al. Directed divergent evolution of a thermostable D-tagatose epimerase towards improved activity for two hexose substrates[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(4): 592-601.
- [128] OH H J, KIM H J, OH D K. Increase in D-tagatose production rate by site-directed mutagenesis of L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(3): 145-149.
- [129] WICHELECKI D J, VETTING M W, CHOU L, et al. ATP-binding cassette (ABC) transport system solute-binding protein-guided identification of novel D-altritol and galactitol catabolic pathways in *Agrobacterium tumefaciens* C58[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(48): 28963-28976.
- [130] MORADIAN A, BENNER S A. A biomimetic biotechnological process for converting starch to fructose: thermodynamic and evolutionary considerations in applied enzymology[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(18): 6980-6987.
- [131] WICHELECKI D J, ZHANG Y H P. Enzymatic synthesis of D-tagatose: US62/236226[P]. 2015-10-02.
- [132] MA Y H, SUN Y X. Tagatose preparation method: CN106399427A[P]. 2016-11-01.
- [133] ZHANG Y H, YOU C. Inositol preparation method: CN106148425B[P]. 2015-04-17.
- [134] OH D K, HONG S H, LEE S H. Aldolase, aldolase mutant, and method and composition for producing tagatose by using same: WO2015016544 A1[P]. 2014-07-25.
- [135] MA Y H, SUN Y X, YANG J A, et al. Method for preparing tagatose through whole-cell catalysis: CN107988286B[P]. 2017-11-02.
- [136] MA Y H, SHI T, LI Y J, et al. *Bacillus subtilis* gene engineering bacteria for producing tagatose and method for preparing tagatose: CN112342179B[P]. 2021-01-05.
- [137] MA Y H, SUN Y X, YANG J G, et al. Engineering strain for producing tagatose, and construction method and application thereof: CN109666620A[P]. 2019-02-20.
- [138] DAI Y W, ZHANG T, JIANG B, et al. *Dictyoglomus turgidum* DSM 6724 α -glucan phosphorylase: characterization and its application in multi-enzyme cascade reaction for D-tagatose production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(11): 3719-3731.
- [139] DAI Y W, ZHANG J X, ZHANG T, et al. Characteristics of a fructose 6-phosphate 4-epimerase from *Caldilinea aerophila*

- DSM 14535 and its application for biosynthesis of tagatose[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 139: 109594.
- [140] DAI Y W, LI C C, ZHENG L H, et al. Enhanced biosynthesis of D-tagatose from maltodextrin through modular pathway engineering of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 178: 108303.
- [141] ZHANG W L, YU S H, ZHANG T, et al. Recent advances in D-allulose: physiological functionalities, applications, and biological production[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 54: 127-137.
- [142] JIANG S W, XIAO W, ZHU X X, et al. Review on D-allulose: *in vivo* metabolism, catalytic mechanism, engineering strain construction, bio-production technology[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 26.
- [143] MATSUO T, SUZUKI H, HASHIGUCHI M, et al. D-psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2002, 48(1): 77-80.
- [144] ZENG Y, ZHANG X X, GUAN Y P, et al. Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products from psicose-lysine and fructose-lysine model systems[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(3): C398-C403.
- [145] HAYASHI N, IIDA T, YAMADA T, et al. Study on the postprandial blood glucose suppression effect of D-psicose in borderline diabetes and the safety of long-term ingestion by normal human subjects[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2010, 74(3): 510-519.
- [146] CHUNG M Y, OH D K, LEE K W. Hypoglycemic health benefits of D-psicose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(4): 863-869.
- [147] MOLLER D E, BERGER J P. Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation[J]. *International Journal of Obesity*, 2003, 27(S3): S17-S21.
- [148] YANG S J, CHO H K, LEE Y M, et al. Thermostable fructose 6-phosphate-3-epimerase and a method for producing allulose using the same: KR102063908B1[P]. 2017-12-27.
- [149] WICHELECKI D J, ROGERS E. Enzymatic production of hexoses: WO2018169957A1[P]. 2018-03-13.
- [150] MACEACHRAN D, CUNNINGHAM D S, BLAKE W J, et al. Cell-free production of sugars: US20180320210A1[P]. 2018-07-12.
- [151] TORRETTA S, SCAGLIOLA A, RICCI L, et al. D-mannose suppresses macrophage IL-1 β production[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6343.
- [152] GONZALEZ P S, O'PREY J, CARDACI S, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy[J]. *Nature*, 2018, 563(7733): 719-723.
- [153] ZHANG D F, CHIA C, JIAO X, et al. D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(9): 1036-1045.
- [154] TIAN C Y, YANG J G, LI Y J, et al. Artificially designed routes for the conversion of starch to value-added mannosyl compounds through coupling *in vitro* and *in vivo* metabolic engineering strategies[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 215-224.
- [155] 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.
- [156] CHEN H G, ZHANG Y H P. New biorefineries and sustainable agriculture: increased food, biofuels, and ecosystem security [J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2015, 47: 117-132.
- [157] CASILLAS C E, KAMMEN D M. The energy-poverty-climate nexus[J]. *Science*, 2010, 330(6008): 1181-1182.
- [158] SHEPPARD A W, GILLESPIE I, HIRSCH M, et al. Biosecurity and sustainability within the growing global bioeconomy[J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3(1-2): 4-10.
- [159] ZHANG Y H P, HUANG W D. Constructing the electricity-carbohydrate-hydrogen cycle for a sustainability revolution[J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(6): 301-306.
- [160] ZHANG Y H P. A sweet out-of-the-box solution to the hydrogen economy: is the sugar-powered car science fiction? [J]. *Energy & Environmental Science*, 2009, 2(3): 272-282.
- [161] HARNISCH F, MOREJÓN M C. Hydrogen from water is more than a fuel: hydrogenations and hydrodeoxygenations for a biobased economy[J]. *Chemical Record*, 2021, 21(9): 2277-2289.
- [162] THAUER R K, KASTER A K, SEEDORF H, et al. Methanogenic Archaea: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 579-591.
- [163] CHHEDA J N, HUBER G W, DUMESIC J A. Liquid-phase catalytic processing of biomass-derived oxygenated hydrocarbons to fuels and chemicals[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(38): 7164-7183.
- [164] HUBER G W, SHABAKER J W, DUMESIC J A. Raney Ni-Sn catalyst for H₂ production from biomass-derived hydrocarbons [J]. *Science*, 2003, 300(5628): 2075-2077.
- [165] MAEDA T, SANCHEZ-TORRES V, WOOD T K. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production[J]. *Microbial Biotechnology*, 2008, 1(1): 30-39.
- [166] MAEDA T, SANCHEZ-TORRES V, WOOD T K. Hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* strains[J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5(2): 214-225.
- [167] YE X H, WANG Y R, HOPKINS R C, et al. Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails[J]. *ChemSusChem*, 2009,

- 2(2): 149-152.
- [168] MYUNG S, ROLLIN J, YOU C, et al. *In vitro* metabolic engineering of hydrogen production at theoretical yield from sucrose[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 70-77.
- [169] MARTÍN DEL CAMPO J S, ROLLIN J, MYUNG S, et al. High-yield production of dihydrogen from xylose by using a synthetic enzyme cascade in a cell-free system[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(17): 4587-4590.
- [170] BEREZINA O V, ZVERLOV V V, LUNINA N A, et al. Gene and properties of thermostable 4-alpha-glucanotransferase of *Thermotoga neopolitana*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 33: 801-806.
- [171] CHEN H, HUANG R, KIM E J, et al. Building a thermostable metabolon for facilitating coenzyme transport and *in vitro* hydrogen production at elevated temperature[J]. *ChemSusChem*, 2018, 11(18): 3120-3130.
- [172] HUANG R, CHEN H, ZHOU W, et al. Engineering a thermostable highly active glucose 6-phosphate dehydrogenase and its application to hydrogen production *in vitro*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(7): 3203-3215.
- [173] 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 J. The enlightenment of the Chinese philosophy “Tao-Fa-Shu-Qi” to industrial biomanufacturing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(6):1231-1241.
- [174] WANG X D, SABA T, YIU H H P, et al. Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterogeneous pathways[J]. *Chem*, 2017, 2(5): 621-654.
- [175] ALI I, KHAN T, OMANOVIC S. Direct electrochemical regeneration of the cofactor NADH on bare Ti, Ni, Co and Cd electrodes: the influence of electrode potential and electrode material[J]. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2014, 387: 86-91.
- [176] MORELLO G, MEGARITY C F, ARMSTRONG F A. The

power of electrified nanoconfinement for energising, controlling and observing long enzyme cascades[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 340.

- [177] CASTAÑEDA-LOSADA L, ADAM D, PACZIA N, et al. Bioelectrocatalytic cofactor regeneration coupled to CO₂ fixation in a redox-active hydrogel for stereoselective C—C bond formation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(38): 21056-21061.



通讯作者: 张以恒(1971—),男,博士,研究员,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)重点实验室主任,曾任美国弗吉尼亚理工大学终身正教授。研究方向为体外合成生物学、新质生物制造、生物炼制和淀粉储能。

E-mail: zhang_xw@tib.cas.cn



第一作者: 石婷(1984—),女,博士,副研究员。研究方向为体外合成生物学、酶工程与微生物代谢工程。

E-mail: shi_ting@tib.cas.cn



共同第一作者: 宋展(1996—),女,博士研究生。研究方向为体外合成生物学、酶工程和代谢工程。

E-mail: song_zhan@sjtu.edu.cn