

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-019

## 化学品体外生物合成途径设计、元件组装和应用

万逸尘<sup>1,2</sup>, 许孔亮<sup>1,2</sup>, 郑仁朝<sup>1,2</sup>, 郑裕国<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江工业大学生物工程学院, 生物有机合成技术研究浙江省重点实验室, 浙江 杭州 310014; <sup>2</sup> 浙江工业大学生物工程学院, 生物转化与生物净化教育部工程研究中心, 浙江 杭州 310014)

**摘要:** 随着合成生物技术的发展, 体外生物合成逐渐成为化学品合成的重要方式之一, 具有环境友好、催化效率高、原子经济性好、可控性强等优点。途径设计是构建整个体外生物合成系统的关键所在, 本文分析总结了体外生物合成中应遵循的两个重要原则, 包括原子经济性原则和能量最优原则。利用生物大分子将酶元件组装构建成为多酶复合体, 可提高体外生物合成的反应速率、减少副反应的发生, 本文介绍了用于酶元件组装的3类常见生物大分子, 包括连接肽、蛋白支架、DNA等。通过近年来体外生物合成在大宗化学品(糖类化学品、有机酸类化学品以及醇类化学品等)生产中的应用案例的介绍, 展示了体外生物合成在化学品合成中的应用前景。随着体外生物合成设计能力的不断提高, 体外生物合成的途径设计将朝着智能化、高效化发展, 化学品体外生物合成的效率也将逐步提高, 有望涵盖所有化学品的生物合成, 成为未来化学品合成的主要方式之一。

**关键词:** 体外生物合成; 化学品制造; 途径设计; 蛋白质工程; 酶元件

**中图分类号:** Q591.1 **文献标志码:** A

## *In vitro* biosynthesis of chemicals: pathway design, component assembly and applications-a review

WAN Yichen<sup>1,2</sup>, XU Kongliang<sup>1,2</sup>, ZHENG Renchao<sup>1,2</sup>, ZHENG Yuguo<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China; <sup>2</sup>Engineering Research Center of Bioconversion and Biopurification of Ministry of Education, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China)

**Abstract:** Chemical industry is one of the pillar industries in the modern society. The demand for refined chemicals with high-quality and diversity is rapidly increasing with the improvement of society and human being's living standards. As a supplement to conventional chemical synthesis, environmental friendly biosynthesis is attracting widespread attention and will be an important step to achieve a sustainable development. *In vitro* biosynthesis (cell free biosynthesis) is a synthetic method to prepare desired chemicals, which was catalyzed by purified enzymes or cell extracts. With the development of synthetic biotechnology, *in vitro* biosynthesis has gradually become one of the most important ways for chemicals production,

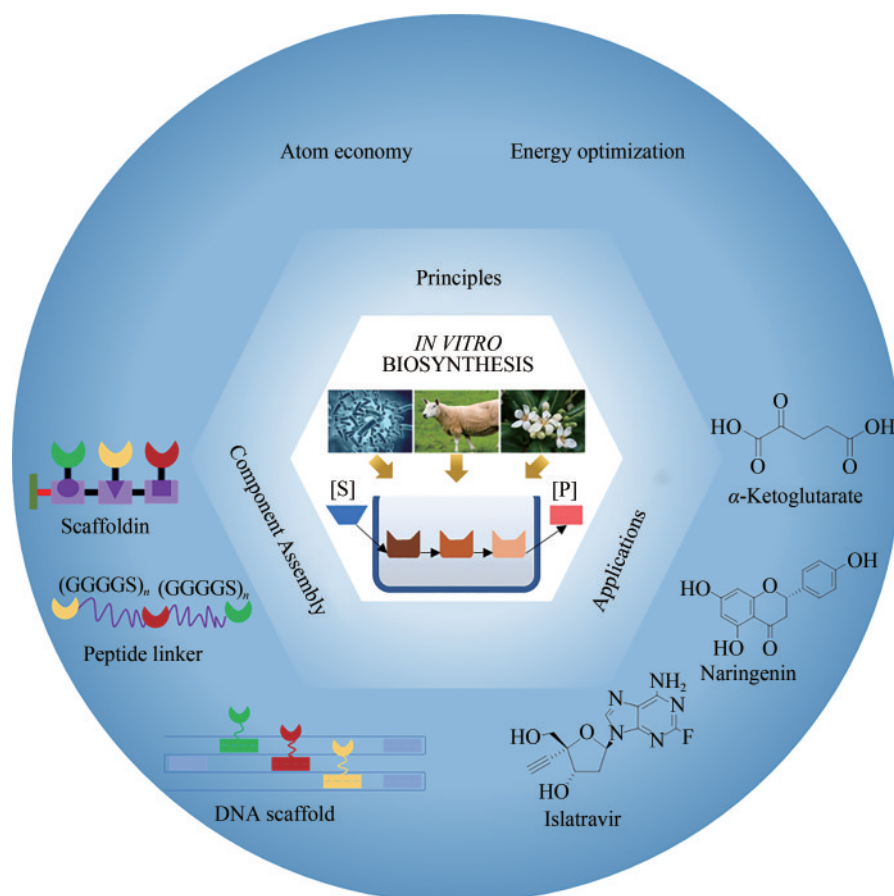
收稿日期: 2021-02-06 修回日期: 2021-04-30

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE0129400); 浙江省自然科学基金(LR19B060001, LQ20E020009)

引用本文: 万逸尘, 许孔亮, 郑仁朝, 郑裕国. 化学品体外生物合成途径设计、元件组装和应用[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 886-901

Citation: WAN Yichen, XU Kongliang, ZHENG Renchao, ZHENG Yuguo. *In vitro* biosynthesis of chemicals: pathway design, component assembly and applications - a review[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 886-901

exhibiting the advantages of environmental friendliness, high catalytic efficiency, good atom economy and strong controllability. Pathway design is the key for the construction of *in vitro* biosynthesis system. In this review, two important principles for designing *in vitro* biosynthetic pathways have been summarized, including atom economy and energy optimization. As one of the important concepts of green chemistry, principle atom economy means that the synthesis method or process should be designed to convert raw materials into the final product as much as possible. Principle energy optimization means that the ATP-free or ATP minimized process should be designed in the synthesis method. Assembly enzymes into a multi-enzyme complex *via* biological macromolecules can increase reaction rate and also reduce the side reactions of the *in vitro* biosynthesis. Thus, three common-used biological macromolecules for enzyme assembly will be introduced here, including peptide linkers, protein scaffolds, DNA. Some recent examples of chemicals produced *via in vitro* biosynthesis have also been summarized, including glucosamine, glycerol glucoside, pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate, ethanol, 1,3-propanediol, islatravir, azomycin, and *etc.* Through the introduction of *in vitro* biosynthesis of bulk chemicals (carbohydrate chemicals, organic acid chemicals, alcohol chemicals, and *etc.*), this article demonstrates the potentials of *in vitro* biosynthesis in chemical synthesis. By reviewing the pathway design, enzyme component assembly and chemicals production examples, the future of *in vitro* biosynthesis of chemicals has been prospected here. With the design improvement of *in vitro* biosynthesis, the pathway designing will be becoming more and more intelligent and efficient. It is believed that the efficiency of *in vitro* biosynthesis of chemicals will be gradually increased and the *in vitro* biosynthesis hopefully can cover all chemicals' production, which is expected to be one of the predominant ways for chemicals production in the future.



**Keywords:** *in vitro* biosynthesis; chemicals production; pathway design; protein engineering; enzyme component

化学工业是国民经济的支柱产业之一。随着社会进步和人民生活水平的提高,对化学品精细化、高端化、多样化的需求日益旺盛。作为传统化学合成技术的补充,环境友好的生物合成技术正引起普遍关注,成为实现社会可持续发展的重要突破口<sup>[1-3]</sup>。近年来,随着合成生物学和蛋白质工程等现代生物技术的进步,国内外研究人员开发了一系列高性能的工业菌种和细胞工厂,满足对医药化学品、日用化学品、食品和饲料添加剂、农药及其中间体等多种化学品生产的需要<sup>[4-5]</sup>。然而,由于细胞代谢高度网络化、生长偶联依赖等瓶颈问题,体内生物合成(全细胞生物合成)的物质与能量转化效率往往难以满足高效生产化学品的需求<sup>[6-10]</sup>。

体外生物合成(无细胞生物合成)是指以纯化的酶或细胞提取物为催化剂,制备所需化学品的一种合成方法。由于避开了胞内复杂环境的影响,体外生物合成展现了催化效率高、物质转化率高、显著优势<sup>[11-13]</sup>,能够有效满足化学品工业生产的需要。此外,通过酶元件的设计与组装调控构建新的人工合成途径,使其具有途径设计多样、可控性强和酶元件来源丰富等特点。近年来,国内外众多研究团队通过构建化学品体外生物合成系统,实现了多种化学品的体外生物合成,如糖类化学品<sup>[14]</sup>、有机酸类化学品<sup>[15]</sup>和醇类化学品<sup>[16]</sup>等。本文分析总结了体外生物合成途径设计的两个重要原则,包括原子经济性原则和能量最优原则;介绍了体外生物合成中用于酶元件组装的3类常见的生物大分子,包括连接肽、蛋白支架和DNA等;并介绍了近年来生物体外合成在化学品生产中的应用案例,包括氨基葡萄糖<sup>[14]</sup>、甘油葡萄糖苷<sup>[17]</sup>、 $\alpha$ -酮戊二酸<sup>[15]</sup>、丙酮酸<sup>[18]</sup>、乙醇<sup>[16]</sup>、丙二醇<sup>[19]</sup>、Islatravir<sup>[20]</sup>和氮霉素<sup>[21]</sup>等。通过对体外生物合成的途径设计、酶元件的组装方式以及具体应用案例的综述,本文最后对化学品体外生物合成的发展趋势进行了展望。

## 1 体外生物合成途径设计

途径设计是构建整个体外生物合成系统的关键所在。然而,面对结构和性质不同的化学品,

很难设计出一条体外生物合成的“通用”途径<sup>[22]</sup>。只有不断积累前人的经验,解决途径设计中存在的每一个困难,体外生物合成系统的构建才能取得进展<sup>[22]</sup>。体外生物合成的途径设计可以参考两个重要的原则,即原子经济性原则和能量最优原则。

### 1.1 原子经济性原则

作为“绿色化学”的重要概念之一,原子经济性是指在化学品合成过程中,合成方法和工艺应被设计成能将原料尽可能多地转化到最终产物中<sup>[23]</sup>。在化学品体外生物合成途径设计中,可以考虑以下几点以满足原子经济性的需要:①选择与产物结构类似的起始原料以提高原料利用效率;②设计理论转化率高的合成途径以提高原料的转化率;③选用合适的酶元件以提高反应的催化效率<sup>[24]</sup>。

经过上亿年的进化,细胞内演化出一系列特异性强、转化率高的代谢合成路线。然而,由于细胞代谢高度网络化、生长偶联依赖等问题,胞内代谢合成路线转化率较低。因此,通过借鉴生物体的代谢路线,在体外重构生物合成途径,为合成特定化学品提供了思路(图1左)<sup>[25]</sup>。以柚皮素(naringenin)合成为例,Zang等<sup>[26]</sup>通过借鉴植物中从4-香豆酸(*p*-coumaric acid)出发代谢合成柚皮素的合成路径,首次在体外重构了柚皮素的生物合成系统。该系统以4-香豆酸为原料,4-香豆酰辅酶A连接酶、查尔酮合酶、查尔酮异构酶为催化剂,构建酶级联反应合成柚皮素。通过选用合适的辅酶以及优化最适酶配比,当4-香豆酸底物浓度为2.5 mmol/L时,柚皮素的产量3 h内达到了11.22 mg/L。除此之外,聚醚拉索洛西德(lasalocid)<sup>[27]</sup>、半胱氨酸<sup>[26]</sup>等化学品也通过重构合成途径的方法进行体外生物合成<sup>[28]</sup>。

除了代谢合成,生物体内还存在将复杂的化学品代谢分解成简单分子的途径。通过逆向构建目标化学品的分解途径,筛选合适的酶元件,可实现由简单分子合成目标化学品,该方法被称为生物逆向合成(bioretrosynthesis)(图1中)<sup>[29-30]</sup>。

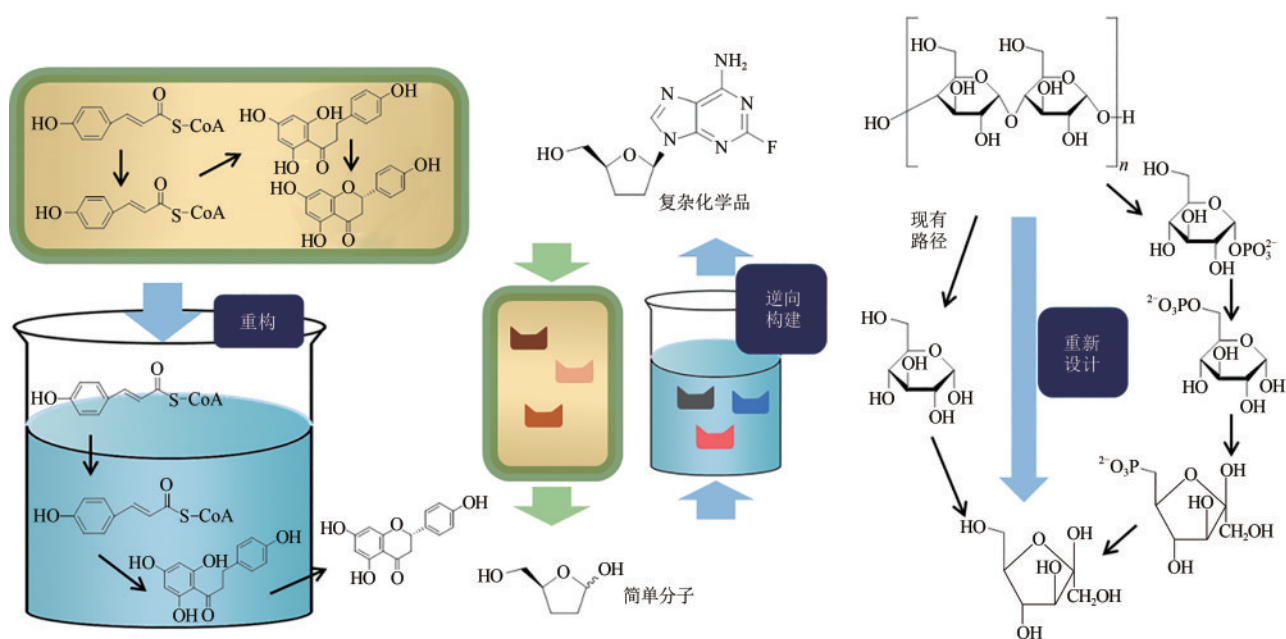


图1 参考原子经济性原则构建的体外生物合成途径

[在体外重构细胞内的合成途径 (左图), 以生物逆向合成策略逆向构建合成途径 (中间图), 重新设计高转化率的合成途径 (右图)]

Fig. 1 Designing *in vitro* biosynthetic pathways via principle atom economy

[*In vitro* reconstruction (left) of *in vivo* synthetic pathway from cell; Reverse construction (middle) *in vitro* pathway for production of didanosine via bioretrosynthesis; Redesigning a new pathway (right) for conversion of starch to fructose to achieve a higher conversion rate]

以2,3-二脱氧肌苷(去羟肌苷)的合成例, Bachmann等<sup>[31]</sup>通过借鉴生物中肌苷分解成核糖的代谢路径,在体外逆向构建了以2,3-二脱氧核糖为底物,核糖激酶、磷酸戊糖变位酶和嘌呤核苷磷酸化酶为催化剂,设计了2,3-二脱氧肌苷的合成途径。并通过对核糖激酶、磷酸戊糖变位酶和嘌呤核苷磷酸化酶的改造,提高了对非天然底物及中间体(2,3-二脱氧核糖)的选择性并增加了底物周转率,对2,3-二脱氧核糖的选择性相较于改造前提升了9500倍,同时2,3-二脱氧肌苷的产量也提升了50倍。此外,Islatravir<sup>[20]</sup>、莫能菌素A(monensin A)<sup>[32]</sup>等化学品的体外生物合成也借鉴了生物逆向合成的设计思路。

对于一些不改变起始原料的化学合成路线,还可以重新设计其合成途径,选择合适的酶元件进行催化,提高底物的转化率以满足原子经济性的需求(图1右)。以果糖的生产为例,目前工业上以淀粉为原料,通过淀粉水解酶和葡萄糖异构酶两种酶催化生产果糖,由于中间产物葡萄糖与终产物果糖的化学势相近,导致该方法果糖的转化率最高仅能达到50%左右。Moradian等<sup>[22]</sup>重新

设计了一条以淀粉为原料体外生物合成果糖的途径,该路径以淀粉磷酸化酶、葡萄糖变位酶、转醛缩酶和3-磷酸甘油醛磷酸酶为催化剂,由于其中间产物化学势都均高于果糖,且反应均为可逆反应,理论上其转化率可达100%。由于未筛选到对果糖-6-磷酸选择性高的3-磷酸甘油醛磷酸酶,在最后一步选择了果糖-6-磷酸选择性高的转醛缩酶,并设计了基于3-磷酸甘油醛磷酸酶的甘油醛再生系统,使该体外生物合成系统的果糖:葡萄糖比值达到了92:8,远远高于商用的果糖生产途径。Meng等<sup>[33]</sup>通过借鉴前人的工作,将筛选到的对果糖-6-磷酸选择性较好的热稳定性磷酸酶,与 $\alpha$ -糖苷磷酸化酶、磷酸葡萄糖变位酶、磷酸葡萄糖异构酶3种酶联用,最终使该淀粉磷酸化合成果糖的体外途径的果糖:葡萄糖比值达到2:1。

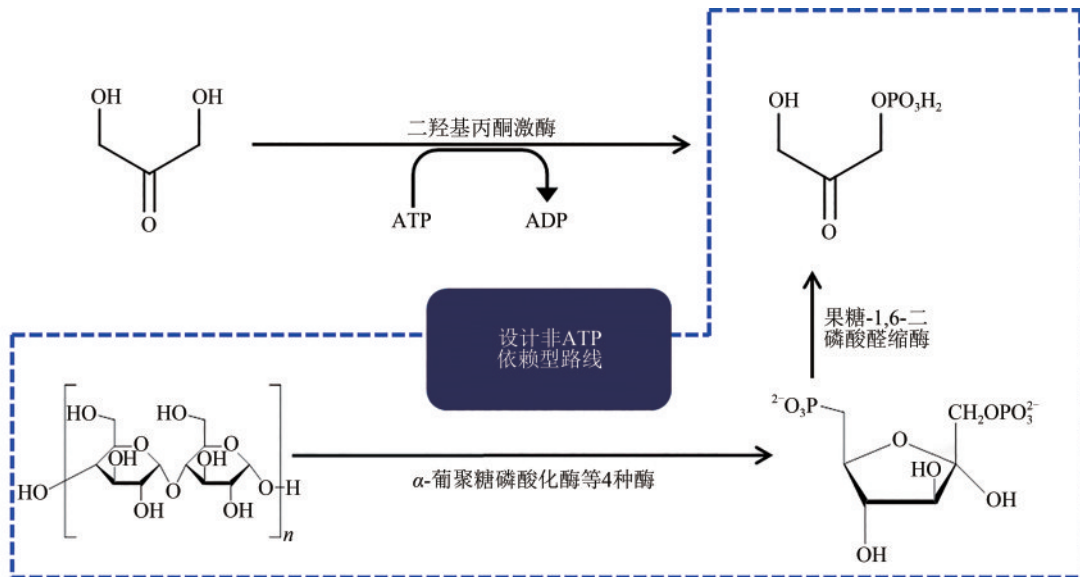
此外,在化学品体外生物合成中,将多个酶组装串联在一起也是提高产物产率的方法之一<sup>[34]</sup>,能够满足体外生物合成的途径设计中原子经济性的要求。酶催化串联反应源于大自然中生命有机体为了维持生命过程而进化出的各种代谢通路,

多酶催化串联策略在复杂天然产物合成中的应用已有相关综述报道<sup>[35]</sup>。

## 1.2 能量最优原则

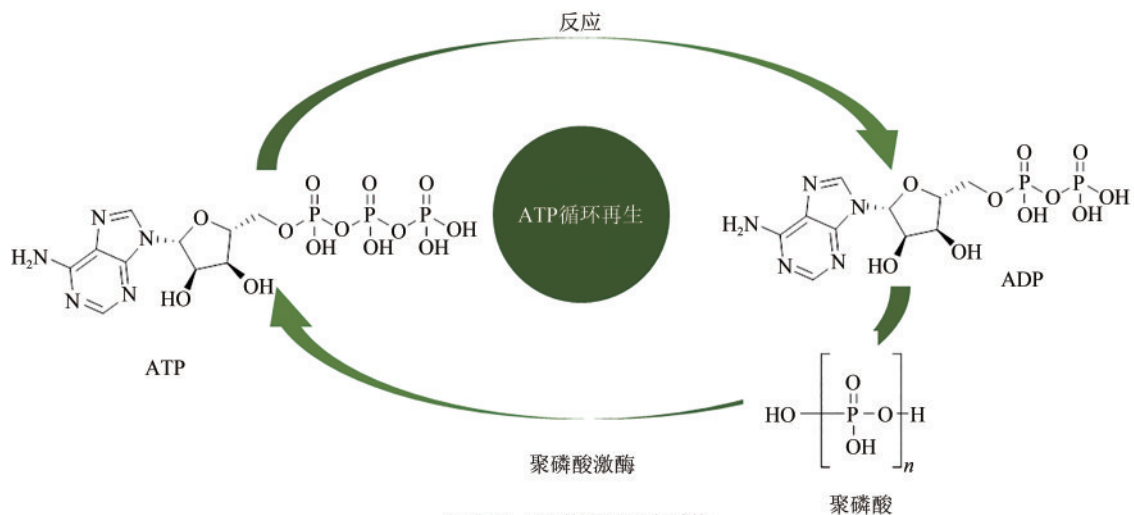
作为生物体内最主要的能量来源，化学品体外生物合成中常需要三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）的参与。能量最优原则是指在途径设计中，合成方法和工艺应被设计成不需要额外添加ATP或尽可能少地使用ATP<sup>[22]</sup>。

目前已开发了许多非ATP依赖型的化学品体外生物合成的路径，降低了原有路径的成本。以磷酸二羟基丙酮合成为例，原有的合成路线以二羟基丙酮为原料，在二羟基丙酮激酶的催化下合成磷酸二羟基丙酮，该方法会消耗大量ATP。Wang等<sup>[36]</sup>设计了一个非ATP-依赖型的体外生物合成系统，用以合成磷酸二羟基丙酮[图2(a)]。该系统以淀粉作为原料，通过 $\alpha$ -葡聚糖磷酸化酶将其磷酸化为葡萄糖-1-磷酸，再通过磷酸葡萄糖



(a) 设计非ATP依赖型的体外生物合成系统

(a) Designing a non-ATP-dependent *in vitro* biosynthetic system for production of dihydroxyacetone phosphate from starch



(b) 设计ATP的循环再生系统

(b) Designing an ATP regeneration system via conversion of ADP and polyphosphate to ATP

图2 参考能量最优原则构建体外生物合成途径

Fig. 2 Designing *in vitro* biosynthetic pathways via principle energy optimization

变位酶、磷酸葡萄糖异构酶、焦磷酸磷酸果糖激酶以及D-果糖-1,6-二磷酸醛缩酶合成磷酸二羟丙酮。该体外生物合成途径无需额外添加ATP及辅酶,具有一定优势。

对于一些需要ATP参与的体外生物合成系统,可以通过构建ATP的循环再生系统或者重新设计合成途径以减少ATP用量,降低生产成本<sup>[37-38]</sup>。Zhang等<sup>[39]</sup>在设计由谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸合成谷胱甘肽的体外生物合成路线中,加入了一个由聚磷酸激酶和聚磷酸组成的ATP循环再生系统[图2(b)]<sup>[40]</sup>,可以使生成的二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)重新转变为ATP。相较于昂贵的ATP,体外反应进程中消耗的仅仅是低成本的聚磷酸。此外,还可以重新设计合成途径来减少ATP用量,以L-乳酸的合成例,传统体外合成生产L-乳酸的反应路径为Embden-Meyerhof路线<sup>[41]</sup>,该路线第1步需将葡萄糖磷酸化,而该步骤需要消耗ATP。Okano等<sup>[42]</sup>重新设计从葡萄糖生产L-乳酸的体外生物合成路线,新设计的路线不再磷酸化葡萄糖,而是使用葡萄糖脱氢酶、葡萄糖酸脱水酶、2-酮-3-脱氧葡萄糖醛缩酶、甘油酸激酶和乳酸脱氢酶进行催化,该路径ATP使用量比原路径少50%,从而降低了成本。

## 2 体外生物合成元件组装

作为体外生物合成的重要催化元件,酶具有催化效率高、底物专一性强、环境温和等优点。众所周知,生物体的代谢过程由多种酶协同完成,胞内酶可以形成复杂的多酶复合体,其催化反应高度有序,从而提高其催化效率<sup>[43]</sup>。因此,在化学品体外生物合成中,可以利用生物大分子将酶元件组装构建多酶复合体,以起到提高整体反应速率、避免副反应、提高产品转化率、消除中间产物抑制等作用<sup>[44-45]</sup>。目前比较常见的用于多酶组装的生物大分子主要有连接肽、蛋白支架和DNA等(图3)。

### 2.1 基于连接肽的元件组装

在自然界发现的一些多酶复合体中,酶与酶之间是由一小段多肽(连接肽)进行连接的<sup>[46-47]</sup>。连接肽可将异源酶连接起来,使酶元件之间紧密贴近(图3左上)<sup>[45]</sup>,这种方式构建的多酶系统可避免因多酶直接融合而产生的蛋白错误折叠、活性降低甚至失活等问题<sup>[48]</sup>。Fan等<sup>[49]</sup>在甲醇合成果糖-6-磷酸的体外合成系统中,使用柔性连接肽 $(GGGGS)_3$ 和 $(GGGGS)_6$ 将甲醇脱氢酶(methanol

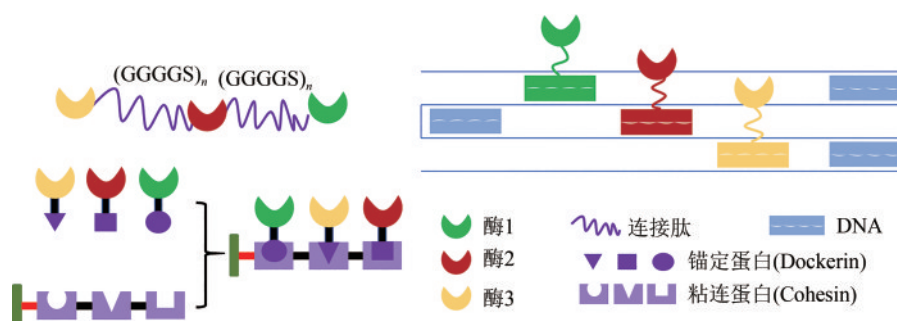


图3 用于多酶组装的生物大分子

左上图: 连接肽; 左下图: 蛋白支架; 右上图: DNA

Fig. 3 Biomolecules for multi-enzyme assembly

Peptides linkers (top left): fusing two or more enzymes together to fabricate a multi-enzyme system can be produced by gene fusion to introduce a peptide linker, which can bring heterogeneous enzymes into close proximity with peptide mediated conjugation. Scaffoldin (bottom left): for the construction of cohesin-dockerin based multi-enzymatic system, enzymes fused with dockerin and corresponding cohesins fused together to form a chimaeric scaffoldin *via* position-specific self-assembly of enzymes.

DNA (top right): DNA self-assembling into one-, two- and three-dimensional nanostructures by complementary base-pairing makes DNA-bioconjugation a promising approach for self-organization of enzymes.

Enzymes can be attached onto DNA strips by chemical conjugation such as click chemistry.

dehydrogenase, Mdh)、6-磷酸己糖合酶(hexulose-6-phosphate synthase, Hps)和6-磷酸-3-己糖异构酶(6-phospho-3-hexuloisomerase, Phi)顺序连接,构建了Mdh-Hps-Phi三酶组装体。连接肽使酶与酶之间产生协同作用,提高了该体外合成系统的分子动力学优势,其甲醇氧化速率是游离酶混合物的5.8倍,总反应速率提升了1.6倍。Lerchner等<sup>[50]</sup>使用较短的连接肽将2,2,6-三甲基环己烷二酮还原酶和 $\omega$ -氨基转移酶进行组装构建多酶系统,用以催化异山梨醇(300 mmol/L)合成山梨醇二胺,其转化率是游离酶混合物的2倍。

## 2.2 基于蛋白支架的元件组装

在自然界中,蛋白支架(scaffoldin)是组成纤维小体结构的多肽,其上的粘连蛋白(cohesin)可与锚定蛋白(dockerin)产生特异性亲和结合<sup>[51-52]</sup>。通过在酶元件上设计连接锚定蛋白,在蛋白支架上设计与其对应的粘连蛋白,可以构建具有级联顺序的多酶系统,并通过底物通道效应提高酶催化效率<sup>[53-54]</sup>。You等<sup>[54]</sup>在3-磷酸甘油醛合成果糖-6-磷酸的体外生物合成系统中,基于蛋白支架设计了磷酸丙糖异构酶、醛缩酶、果糖-1,6-双磷酸酶的多酶催化系统,其对果糖-6-磷酸的合成速率约是游离酶的10倍,转化率约为8倍。Jeong等<sup>[55]</sup>将 $\beta$ -琼脂酶、脱水半乳糖苷酶和L-阿拉伯糖异构酶通过设计的蛋白支架组装成三酶复合结构,并以D-半乳糖为原料合成D-塔格糖,D-塔格糖的浓度可高达4.2 g/L,与游离酶混合物相比,其产量增加了1.4倍。

## 2.3 基于DNA的元件组装

利用DNA碱基之间的特异性结合,对其序列进行设计可以自组装成多种结构,如DNA支架<sup>[56]</sup>、DNA折纸或DNA水凝胶<sup>[57]</sup>等。在体外生物合成中,利用酶表面具有的活性残基与DNA寡核苷酸序列间的生物结合,可以使不同酶组装成多酶复合结构,并控制其相对位置<sup>[58]</sup>。相较于上述两种酶元件组装方式,使用DNA组装多酶系统可以精准控制酶的空间位置和酶之间的距离,降低传质阻力以达到最理想的催化效率<sup>[59]</sup>。Xin

等<sup>[60]</sup>成功开发了一种新的DNA组装策略,通过组装葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶,催化葡萄糖高效转化为葡萄糖酸。这两种酶被组装在一个带有支撑臂结构的DNA中,通过改变支撑臂的长度控制中间产物的扩散距离,使酶活相较于游离酶提高了88%。Fu等<sup>[61]</sup>在果糖-6-磷酸合成苹果酸的体外合成系统中,将果糖-6-磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶组装在一个DNA支架上,并在酶之间设计了一个带有辅助因子的摆动DNA臂。这种人工构建的DNA摇臂可以促进底物在两种偶联的脱氢酶之间转移,其酶活相比游离酶提高了25倍<sup>[62]</sup>。

## 3 体外生物合成的应用前景

利用上述合成途径和组装策略,国内外研究人员构建了一系列的化学品种体外生物合成系统,实现了多种大宗化学品的绿色合成。本文将对糖类、有机酸、醇类及其他化学品的体外生物合成的应用举例介绍,主要包括氨基葡萄糖、甘油葡萄糖苷、丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、丙二醇、乙醇、Islatravir和氮霉素等。

### 3.1 糖类化学品

氨基葡萄糖被广泛应用于食品、化妆品和制药工业中<sup>[63]</sup>。目前用于生产氨基葡萄糖的方法主要有化学法和微生物发酵法。化学法需要强酸水解且操作步骤繁杂,并伴有有毒副产物产生<sup>[63]</sup>;微生物发酵法产生的氨基葡萄糖易被微生物代谢消耗,且产物积累会抑制微生物生长而致产量降低<sup>[63]</sup>。Meng等<sup>[14]</sup>设计了一条氨基葡萄糖的体外生物合成路径(图4),该方法以淀粉/麦芽糊精和氨水为原料, $\alpha$ -糖苷磷酸化酶、磷酸葡萄糖变位酶、磷酸葡萄糖异构酶、氨基葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、氨基葡萄糖-6-磷酸磷酸酶为催化剂,当麦芽糊精浓度为10 g/L时,其氨基葡萄糖的产量可达7.9 g/L,对应的摩尔转化率为75.8%。为探究该体外生物合成路径的工业应用潜力,作者对该体系进行了放大,当麦芽糊精浓度为50 g/L时,其氨基葡萄糖的产量可达23.7 g/L。虽然该产量与目前微生物发酵法的最高水平(120 g/L左右)还存在一

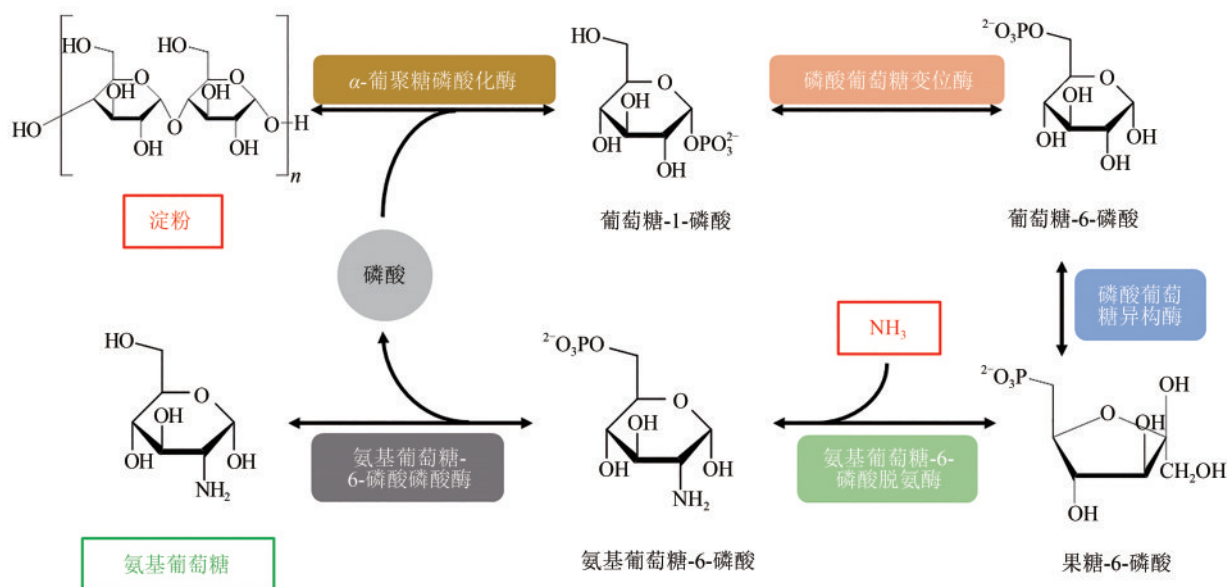


图4 使用淀粉生产氨基葡萄糖的体外生物合成途径

**Fig. 4** *In vitro* biosynthesis pathway for conversion of starch and inorganic ammonia to glucosamine (Metabolites and product were starch, glucose 1-phosphate, glucose 6-phosphate, fructose 6-phosphate, glucosamine 6-phosphate, phosphate, and glucosamine. Enzymes involved were  $\alpha$ -glucan phosphorylase, phosphoglucomutase, phosphoglucose isomerase, glucosamine 6-phosphate deaminase, and glucosamine 6-phosphate phosphatase)

定差距<sup>[64]</sup>，但是该氨基葡萄糖的体外合成路线具有催化效率高、原子经济性好和可控性强等优点，展现出了一定的工业应用前景。此外，Lv等<sup>[65]</sup>构建了一条以蘑菇及植物中的几丁质为原料合成氨基葡萄糖的体外合成路线，通过甲壳素酶和脱乙酰酶（来源于*Cyclobacterium marinum*）两步合成氨基葡萄糖，该方法以废弃的植物资源为原料，具有一定的环保效益，同时可被甲壳类过敏的消费者食用。

甘油葡萄糖苷 ( $\alpha$ -glucosylglycerol) 是由一分子甘油和一分子葡萄糖通过糖苷键形成的一种糖苷型化合物，可作为化妆品中的保湿剂<sup>[66-67]</sup>。Zhang等<sup>[17]</sup>构建了两条甘油葡萄糖苷的体外生物合成路线。其中一条以蔗糖为原料，经蔗糖磷酸酶、葡萄糖基甘油磷酸酶催化合成；另一条以麦芽糖为原料，经麦芽糖磷酸酶、葡萄糖基甘油磷酸酶催化合成。通过对反应条件的优化，两条途径的转化率均可高达97%，甘油葡萄糖苷产量高达452 g/L。

此外，果糖、2-脱氧-5-核糖、甘露糖等糖类化学品也可以通过体外生物合成方法进行生产（表1）。

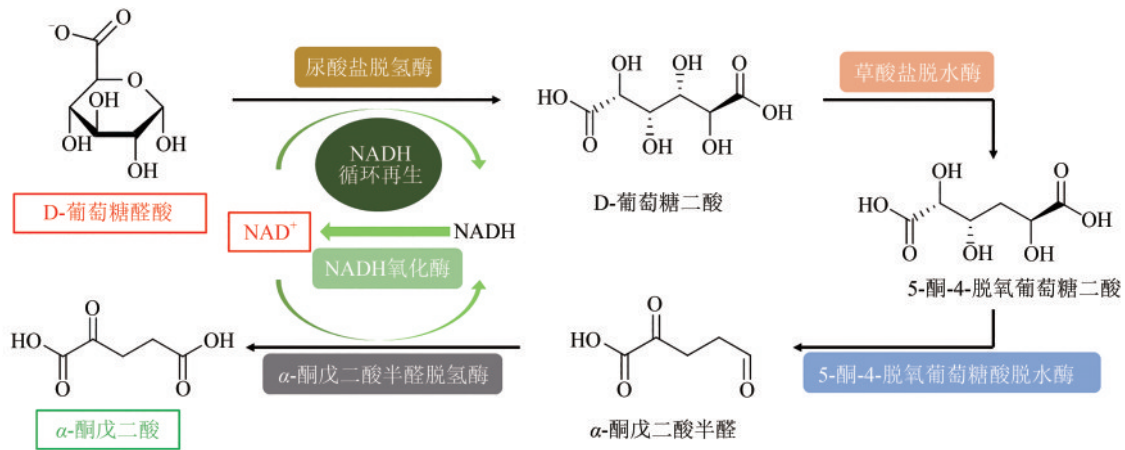
### 3.2 有机酸类化学品

$\alpha$ -酮戊二酸是三羧酸循环和氨基酸合成的重要中间体，可作为膳食补充剂、伤口愈合类化合物的原料以及杂环化学合成的基础原料<sup>[75]</sup>。目前， $\alpha$ -酮戊二酸一般使用琥珀酸和草酸二乙酯与氰醇进行化学合成，其产率约为75%，但由于使用有毒的原料，该方法会产生有毒的废物（如氰化物）<sup>[76]</sup>。环境友好的生物合成可作为化学法的替代方式，但体内生物合成需要精确控制其培养条件<sup>[77]</sup>（如硫胺素和氮浓度、pH和通气量等），且产生的丙酮酸和其他有机酸等副产物会抑制细胞的生长。因此，Beer等<sup>[15]</sup>设计了类糖醛酸的氧化途径，该方法以葡萄糖醛酸为底物，使用尿酸盐脱氢酶、草酸盐脱水酶、5-酮-4-脱氧葡萄糖酸脱水酶和 $\alpha$ -酮戊二酸半醛脱氢酶催化合成 $\alpha$ -酮戊二酸（图5）。这种体外生物合成方式所需酶级联步骤较短，并且单次反应只消耗两个单位的 $\text{NAD}^+$ 。由于最后一步由 $\alpha$ -酮戊二酸半醛脱氢酶催化的氧化反应为不可逆反应，因此总反应的热力学平衡强烈倾向于产物。在添加辅酶循环再生系统后，10 g/L的D-葡萄糖醛酸可生产2.8 g/L的 $\alpha$ -酮戊二酸。

表1 糖类化学品的体外生物合成

**Tab. 1** *In vitro* biosynthesis of carbohydrates and its derivatives, including glucosamine, *N*-acetyl glucosamine, glycerol glucoside, glucose-6-phosphate, fructose, fructose-6-phosphate, fructose-1,6-diphosphate, 2-deoxy-5-ribose, *d*-tagatose, mannose and xylulose-5-phosphate.

化学品	原料	所使用的关键酶	参考文献
氨基葡萄糖	淀粉	氨基葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、氨基葡萄糖-6-磷酸磷酸酶等7种酶	[14]
氨基葡萄糖	甲壳素	甲壳素酶、 <i>N</i> -乙酰葡萄糖胺去乙酰酶	[65]
<i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖	丙酮酸	<i>N</i> -乙酰谷氨酸合酶等4种酶	[68]
甘油葡萄糖苷	蔗糖、麦芽糖	葡萄糖基甘油磷酸酶、蔗糖磷酸酶、麦芽糖磷酸酶	[17]
葡萄糖-6-磷酸	甲醇	甲醇脱氢酶、3-己糖-6-磷酸合酶、6-磷酸-3-己糖异构酶	[49]
果糖	淀粉	转醛缩酶、3-磷酸甘油醛磷酸酶等5种酶	[22]
果糖-6-磷酸	3-磷酸甘油醛	基于蛋白支架的多酶组装体(果糖-1, 6-双磷酸酶、磷酸丙糖异构酶、醛缩酶)	[54]
果糖-6-磷酸	磷酸二羟基丙酮、3-磷酸甘油醛	基于蛋白支架的多酶组装体(磷酸丙糖异构酶、醛缩酶、果糖-1, 6-二磷酸酶)	[69]
果糖-1, 6-二磷酸	麦芽糊精	$\alpha$ -葡聚糖磷酸化酶、焦磷酸磷酸果糖激酶等4种酶	[70]
2-脱氧-5-核糖	淀粉	脱氧-D-核糖-5-磷酸醛缩酶等11种酶	[36]
2-脱氧-5-核糖	果糖	脱氧核糖醛缩酶等5种酶	[71]
D-塔格糖	D-半乳糖	基于支架蛋白的多酶组装体( $\beta$ -琼脂酶、脱水半乳糖苷酶、L-阿拉伯糖异构酶)	[55]
甘露聚糖	$\alpha$ -D-甘露糖-1-磷酸、甘露糖	热活性糖苷磷酸化酶	[72]
甘露糖	淀粉	甘露糖-6-磷酸磷酸酶等6种酶	[73]
木酮糖-5-磷酸	果糖-1,6-二磷酸	木酮糖激酶等3种酶	[74]



**图5** 使用D-葡萄糖醛酸生产 $\alpha$ -酮戊二酸的体外生物合成途径

**Fig. 5** *In vitro* biosynthesis pathway for conversion of D-glucuronic acid to  $\alpha$ -ketoglutarate

(Metabolites and product were D-glucuronate, D-glucarate, 5-keto-4-deoxy-glucarate,  $\alpha$ -ketoglutaric semialdehyde and  $\alpha$ -ketoglutarate. Enzymes involved were uronate dehydrogenase, glucarate dehydratase, 5-keto-4-deoxy-glucarate dehydratase,  $\alpha$ -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase and NADH oxidase)

丙酮酸是一种酸性较弱的有机酸，作为生物细胞糖代谢及体内多种物质相互转化的重要中间体，在药品、食品、农业、医疗等行业有重要的作用。Honda等<sup>[18]</sup>利用甲壳素为原料构建了丙酮酸的体外生物合成系统，使用了12种嗜热酶，其中包括3-磷酸甘油醛脱氢酶、不依赖辅因子的磷酸甘油酸突变

酶、烯醇化酶和丙酮酸激酶等。在添加了辅酶再生系统、ATP再生系统与腺苷酸激酶后，丙酮酸产量提高到了2.1 mmol/L（底物浓度为0.5 mg/mL）。

此外，乳酸<sup>[41]</sup>、D-2-氨基丁酸<sup>[78]</sup>、半胱氨酸<sup>[28]</sup>、葡糖二酸<sup>[79]</sup>等有机酸类化学品也可以通过体外生物合成方法进行生产（表2）。

表2 有机酸类化学品的体外生物合成

Tab. 2 *In vitro* biosynthesis for organic acid chemicals, including  $\alpha$ -ketoglutarate, pyruvate, lactic acid, D-2-aminobutyric acid, cysteine and glucaric acid

化学品	原料	所使用的关键酶	参考文献
$\alpha$ -酮戊二酸	D-葡萄糖醛酸	$\alpha$ -酮戊二酸半醛脱氢酶、5-酮-4-脱氧葡萄糖酸脱水酶	[15]
丙酮酸	甲壳素	烯醇化酶等12种酶	[18]
乳酸	葡萄糖	葡萄糖酸脱水酶、乳酸脱氢酶	[42]
D-2-氨基丁酸	L-苏氨酸	L-苏氨酸裂解酶、D-氨基酸脱氢酶	[78]
半胱氨酸	葡萄糖	邻磷酸丝氨酸巯基化酶等11种酶	[28]
葡糖二酸	蔗糖	肌醇加氧酶、尿酸脱氢酶	[79]

### 3.3 醇类化学品

乙醇是一种常用的化学品，在化工、医疗、食品、农业生产中都有广泛的用途<sup>[80]</sup>。在乙醇的微生物发酵生产中，菌体对温度和溶剂条件的低耐受性是导致其转化效率低下的主要原因。Guterl等<sup>[16]</sup>构建了以葡萄糖为原料合成乙醇的体外生物合成系统，该系统首先以葡萄糖脱氢酶、二羟酸脱水酶、2-酮-3-脱氧葡萄糖酸醛缩酶、甘油醛脱氢酶为催化剂构建了葡萄糖合成丙酮酸的高效中间体平台，再利用丙酮酸脱羧酶与乙醇脱氢酶催化丙酮酸催化合成乙醇（图6）。当葡萄糖浓度为25 mmol/L时，乙醇的浓度经19 h可达到28.7 mmol/L。此外，基于丙酮酸的中间体平台，该路径还可用于异丁醇的生产，经23 h的酶催化，19.1 mmol/L的葡萄糖可转化为10.3 mmol/L的异丁醇。

1,3-丙二醇是生产不饱和聚酯、多种药物及中间体、表面活性剂和乳化剂的原料<sup>[81]</sup>。传统上以甘油为原料发酵生产1,3-丙二醇的方法由于体内复杂的代谢路径，仅能达到60%的产率<sup>[81-82]</sup>。Rieckenberg等<sup>[19]</sup>构建了由甘油生产1,3-丙二醇的体外生物合成路径，以甘油脱水酶、丙二醇氧化还原酶同工酶和氢化酶为催化剂，构建了两步级联反应，其中氢化酶作为辅因子再生模块可消耗氧气为体外生物合成系统供给NADPH，该体外生物合成途径有着很高的原子经济性（转化率接近100%）。同时，通过添加辅酶维生素B<sub>12</sub>、ATP和镁，延长了甘油脱氢酶的耐久性，相比于发酵过程，该路径可简化在工业化生产中下游的分离步骤。

此外，正丁醇、异丁醇、肌醇、二氨基山梨醇等醇类化学品也可以通过体外生物合成方法进行生产（表3）。

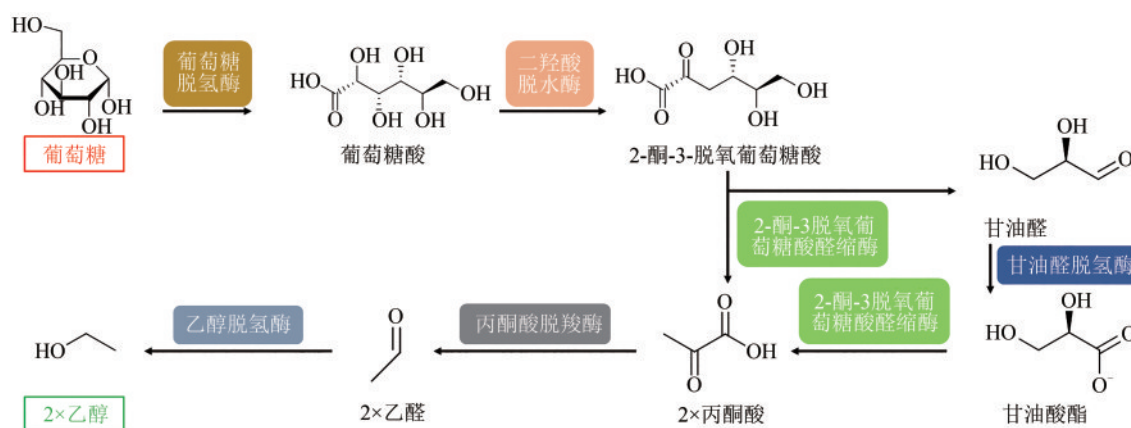


图6 使用葡萄糖生产乙醇的体外生物合成途径

Fig. 6 *In vitro* biosynthesis pathway for conversion of glucose to ethanol

(Metabolites and product were glucose, gluconate, 2-keto-3-desoxy-gluconate, pyruvate, glyceraldehyde, glycerate, acetaldehyde and ethanol. Enzymes involved were glucose dehydrogenase, dihydroxy acid dehydratase, 2-keto-3-desoxygluconate aldolase, glyceraldehyde dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, alcohol dehydrogenase)

表3 醇类化学品的体外生物合成

Tab. 3 *In vitro* biosynthesis for alcohol chemicals, including ethanol, isobutanol, 1,3-propanediol, butanol, diaminosorbitol and inositol

化学品	原料	所使用的关键酶	参考文献
乙醇	葡萄糖	丙酮酸脱羧酶等6种酶	[16]
异丁醇	葡萄糖	乙酰乳酸合酶等9种酶	[16]
1,3-丙二醇	甘油	甘油脱水酶等3种酶	[19]
正丁醇	葡萄糖	3-羟酰基辅酶A脱氢酶等16种酶	[23]
二氨基山梨醇	异山梨醇	基于连接肽的多酶组装体( $\omega$ -氨基转移酶、醇脱氢酶)	[50]
肌醇	淀粉	肌醇单磷酸酶等4个酶	[83-84]

### 3.4 其他化学品

除了上述3类大宗化学品, 体外生物合成系统还可用于合成其他具有不同结构和功能的化学品, 包括一些复杂的天然产物和药物, 如 Islatravir、氮霉素、异戊二烯、间苯三酚和柚皮素等(表4)。

核苷型类似物 Islatravir 是一种人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)逆转录酶易位抑制剂, 目前正在进行临床试验研究, 有望用于HIV暴露前的预防感染, 以及降低治疗的给药频率<sup>[89]</sup>。由于需要构建多个保护基以保护 Islatravir 的活性基团和2-脱氧核糖核苷的立体选择性, 目前多种化学合成路线均需要长达12~18步的合成步骤<sup>[90]</sup>。默克公司的 Huffman 等<sup>[20]</sup>在细菌核苷补救途径的启发下, 采用逆向合成思路(图1), 设计了一条无需保护基步骤的 Islatravir 的体外生物合成路线, 该方

法以脱氧核糖-5-磷酸醛缩酶、磷酸突变酶、嘌呤核苷磷酸化酶等酶为催化剂, 以2-乙炔基甘油为原料, 经过三步催化步骤合成 Islatravir (图7)。通过优化酶催化的各个路径, 首次实现了 Islatravir 的体外规模化合成, 其总产量高达51%, 纯度高达95%。

氮霉素(azomycin)是一种硝基咪唑类抗生素药物, 是目前治疗厌氧细菌感染的最有效的药物之一。Eguchi 等<sup>[91]</sup>发现在菌株 *Streptomyces eurocidicus* 中, L-精氨酸可通过2-氨基咪唑转化为氮霉素。受前人工作的启发, Hedges 和 Ryan<sup>[21]</sup>以L-精氨酸为原料, 吡哆醛-5-磷酸依赖型精氨酸氧化酶、二氢二吡啶甲酸合酶、胍基乙醛脱水酶、铁氧化酶为催化剂, 首次构建了氮霉素的体外生物合成系统, 该工作为今后体外生物合成氮霉素或其他硝基咪唑类化学品提供了借鉴。

表4 其他化学品的体外生物合成

Tab. 4 *In vitro* biosynthesis for other chemicals, including isoprene, phloroglucinol, islatravir, naringenin, deoxyinosine, cytidine-5-monophosphate, azomycin, 3-hydroxybutyryl limonene, pinene, hinokene and L-glutathione

化学品	原料	所使用的关键酶	参考文献
异戊二烯	葡萄糖	异戊二烯合酶等12种酶	[12]
间苯三酚	甲酸	间苯三酚合酶	[85]
Islatravir	乙炔基甘油、核碱基	嘌呤核苷磷酸化酶等9种酶	[20]
柚皮素	对香豆酸	查尔酮异构酶等3种酶	[26]
脱氧肌苷	双脱氧核糖	嘌呤核苷磷酸化酶等3种酶	[31]
胞苷-5-单磷酸	胞苷	胞苷激酶	[86]
氮霉素	L-精氨酸	二氢二吡啶甲酸合酶	[21]
3-羟基丁酰基 CoA	泛硫乙胺	甲羟戊酸激酶等7种酶	[87]
柠檬烯	葡萄糖	柠檬烯合酶等12种酶	[88]
蒎烯	葡萄糖	蒎烯合酶等12种酶	[88]
桉烯	葡萄糖	柠檬烯合酶等12种酶	[88]
L-谷胱甘肽	谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸	谷胱甘肽合酶	[85]

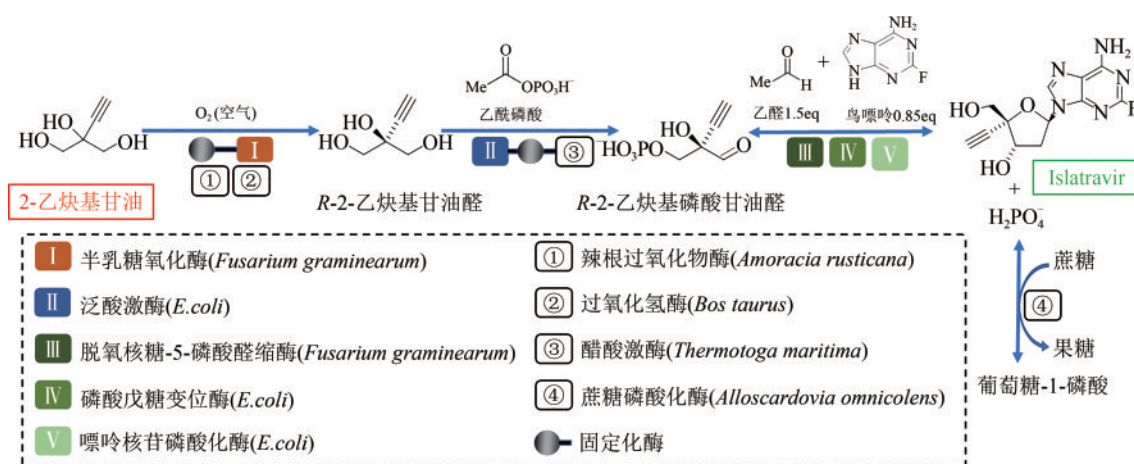


图7 Islatravir的体外生物合成途径

Fig. 7 *In vitro* biosynthesis pathway for conversion of ethynyl glycerol, acetaldehyde and guanine to islatravir [Metabolites and product were ethynyl glycerol, (*R*)-enantiomer of aldehyde, 2-ethynylglycerolaldehyde 3-phosphate and islatravir. Enzymes involved were galactose oxidase, horseradish peroxidase, catalase, pantothenate kinase, acetate kinase, deoxyribose 5-phosphate aldolase, phosphopentomutase and purine nucleoside phosphorylase]

## 4 总结与展望

21世纪以来，以合成生物学和蛋白质工程为代表的现代生物技术的迭代进步，为化学品体外生物合成的发展提供了强有力的保障。以美国和欧盟为代表的发达国家和地区在化学品体外生物合成领域的发展快速，我国在该领域内的自主创新也展现出强劲活力。然而，作为一种新兴的绿色合成方式，化学品体外生物合成还处于技术发展的初期阶段，目前还存在一定的挑战，具体表现如下：

(1) 化学品体外生物合成的途径设计困难。化学品体外生物合成技术现有的发展多是基于自然界中已发现的生物合成途径。然而，绝大部分化学品并没有天然合成途径，这给很多化学品体外生物合成的途径设计带来了一定困难。

(2) 化学品体外生物合成的关键酶元件缺乏。酶元件是构建化学品体外生物合成途径的关键，然而，很多理论转化率很高的途径，由于缺少合适的酶元件，难以达到预期的效果。

(3) 化学品体外生物合成的成本较高。很多化学品体外生物合成需要ATP及辅酶的参与，然而，昂贵的ATP及辅酶原料极大增加了体外生物合成的成本。同时，酶在体外的稳定性和可重复使用率较差，也是造成体外生物合成的成本居高

不下的重要原因之一。

针对上述化学品体外生物合成技术存在的挑战，笔者分析总结了体外生物合成途径设计的两个重要原则，包括原子经济性原则和能量最优原则；介绍了体外生物合成中用于酶元件组装的3类常见生物大分子，包括连接肽、蛋白支架、DNA等；并对近年来体外生物合成在化学品生产中的应用案例作了介绍，包括氨基葡萄糖、甘油葡萄糖苷、丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、乙醇、1,3-丙二醇、Islatravir和氮霉素等。最后，笔者对化学品体外生物合成的发展趋势进行展望，具体如下：

(1) 随着计算机技术的发展，可以使用人工智能技术对代谢路径进行大数据分析和理论计算，以筛选出最优的途径供体外生物合成使用。

(2) 随着非理性设计到理性设计的蛋白质改造技术以及新酶设计能力的不断提高，希望可以快速获得具有理想催化功能的关键酶元件供体外生物合成使用。此外，还可通过酶元件与绿色环保的化学催化剂串联/并联使用，实现化学品的体外绿色合成。

(3) 开发辅因子再生系统或者人工仿生辅酶，降低辅因子的使用成本。同时，期望通过重构体外生物合成的途径，设计出不需要ATP或辅酶参与的路线，以降低化学品体外生物合成的成本。

(4) 开发具备工业应用前景的酶固定化或自

组装技术, 提高酶在体外生物合成系统中的稳定性, 增加酶的回收和重复使用率, 降低体外生物合成的成本。

总之, 随着体外生物合成设计能力的不断提高, 体外生物合成的途径设计将朝着智能化、高效化发展, 化学品体外合成的效率也将逐步提高, 体外生物合成有望涵盖所有化学品的生物合成。同时, 也希望通过合成生物学技术的辅助, 使化学品体外生物合成的成本不断降低, 并成为未来化学品合成的主要方式之一。

### 参 考 文 献

- [1] LU Y. Biosynthetic inorganic chemistry [J]. *Angewandte Chemie International Edition* 2006, 45(34): 5588-5601.
- [2] 王文豪, 闻鹏飞, 许孔亮, 等. 工业环境下酶蛋白的催化行为与适应性改造研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1857-1869.  
WANG W H, WEN P F, XU K L, et al. Catalysis of enzymes under industrial environment and their adaptive modifications: a review [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(10): 1857-1869.
- [3] SHELDON R A, WOODLEY J M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry [J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(2): 801-838.
- [4] SIGRIST R, DA COSTA B Z, MARSAIOLI A J, et al. Nature-inspired enzymatic cascades to build valuable compounds[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(5): 394-411.
- [5] ZHANG Y H. Production of biofuels and biochemicals by *in vitro* synthetic biosystems: opportunities and challenges[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1467-1483.
- [6] NYERGES Á, CSÖRGŐ B, NAGY I, et al. A highly precise and portable genome engineering method allows comparison of mutational effects across bacterial species[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(9): 2502-2507.
- [7] LIAN J Z, HAMEDIRAD M, HU S M, et al. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1688-1696.
- [8] JESCHEK M, GERNGROSS D, PANKE S. Combinatorial pathway optimization for streamlined metabolic engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 47: 142-151.
- [9] JESCHEK M, GERNGROSS D, PANKE S. Rationally reduced libraries for combinatorial pathway optimization minimizing experimental effort[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11163.
- [10] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production [J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 694-697.
- [11] ZHANG Y H, SUN J, ZHONG J J. Biofuel production by *in vitro* synthetic enzymatic pathway biotransformation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(5): 663-669.
- [12] KORMAN T P, SAHACHARTSIRI B, LI D, et al. A synthetic biochemistry system for the *in vitro* production of isoprene from glycolysis intermediates[J]. *Protein Science*, 2014, 23(5): 576-585.
- [13] YE X T, HONDA K, SAKAI T, et al. Synthetic metabolic engineering - a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 120.
- [14] MENG D D, WEI X L, BAI X, et al. Artificial *in vitro* synthetic enzymatic biosystem for the one-pot sustainable biomanufacturing of glucosamine from starch and inorganic ammonia[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(23): 13809-13819.
- [15] BEER B, PICK A, SIEBER V. *In vitro* metabolic engineering for the production of  $\alpha$ -ketoglutarate[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 5-13.
- [16] 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.
- [17] ZHANG T G, YANG J G, TIAN C Y, et al. High-yield biosynthesis of glucosylglycerol through coupling phosphorolysis and transglycosylation reactions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(51): 15249-15256.
- [18] HONDA K, KIMURA K, NINH P H, et al. *In vitro* bioconversion of chitin to pyruvate with thermophilic enzymes [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 124/125/126/127/128/129(3): 296-301.
- [19] RIECKENBERG F, ARDAO I, RUJANANON R, et al. Cell-free synthesis of 1,3-propanediol from glycerol with a high yield [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2014, 14(4): 380-386.
- [20] HUFFMAN M A, FRYSZKOWSKA A, ALVIZO O. Design of an *in vitro* biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir [J]. *Science*, 2019, 366(6470): 1255-1259.
- [21] HEDGES J B, RYAN K S. *In vitro* reconstitution of the biosynthetic pathway to the nitroimidazole antibiotic azomycin[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(34): 11647-11651.
- [22] 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.
- [23] KRUTSAKORN B, HONDA K, YE X T, et al. *In vitro* production of *n*-butanol from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 20: 84-91.
- [24] RUALES-SALCEDO A V, HIGUITA J C, FONTALVO J, et al. Design of enzymatic cascade processes for the production of

- low-priced chemicals[J]. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences*, 2019, 74(3/4): 77-84.
- [25] 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.
- [26] ZANG Y, ZHA J, WU X, et al. *In vitro* naringenin biosynthesis from *p*-coumaric acid using recombinant enzymes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(49): 13430-13436.
- [27] MINAMI A, SHIMAYA M, SUZUKI G, et al. Sequential enzymatic epoxidation involved in polyether lasalocid biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(17): 7246-7249.
- [28] HANATANI Y, IMURA M, TANIGUCHI H, et al. *In vitro* production of cysteine from glucose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(19): 8009-8019.
- [29] COREY E J. The logic of chemical synthesis-multisteps synthesis of complex carbogenic molecules [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1991, 30(5): 455-465.
- [30] CARBONELL P, PLANSON A G, FAULON J L. Retrosynthetic design of heterologous pathways[M]// ALPER H S. *Systems Metabolic Engineering*. Springer, 2013: 149-173.
- [31] BIRMINGHAM W R, STARBIRD C A, PANOSIAN T D, et al. Bioretrosynthetic construction of a didanosine biosynthetic pathway [J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(5): 392-399.
- [32] MINAMI A, MIGITA A, INADA D, et al. Enzymatic epoxide-opening cascades catalyzed by a pair of epoxide hydrolases in the ionophore polyether biosynthesis[J]. *Organic Letters*, 2011, 13(7): 1638-1641.
- [33] MENG D D, LIANG A L, WEI X L, et al. Enzymatic characterization of a thermostable phosphatase from *Thermomicrobium roseum* and its application for biosynthesis of fructose from maltodextrin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(15): 6129-6139.
- [34] HWANG E T, LEE S. Multienzymatic cascade reactions *via* enzyme complex by immobilization [J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(5): 4402-4425.
- [35] 贺俊斌, 孟松, 潘海学, 等. 多酶催化串联策略在复杂天然产物合成中的应用[J]. *合成生物学*, 2020, 1(2): 226-246.
- HE J B, MENG S, PAN H X, et al. Applications of the multienzyme-catalyzed tandem strategy in the synthesis of complex natural products[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(2): 226-246.
- [36] WANG W, YANG J G, SUN Y X, et al., Artificial ATP-free *in vitro* synthetic enzymatic biosystems facilitate aldolase-mediated C-C bond formation for biomanufacturing [J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(2): 1264-1271.
- [37] MORDHORST S, ANDEXER J N. Round, round we go - strategies for enzymatic cofactor regeneration[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(10): 1316-1333.
- [38] WANG Y R, ZHANG Y H P. Cell-free protein synthesis energized by slowly-metabolized maltodextrin [J]. *BMC Biotechnology*, 2009, 9: 58-65.
- [39] ZHANG X, WU H, HUANG B, et al. One-pot synthesis of glutathione by a two-enzyme cascade using a thermophilic ATP regeneration system [J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 241: 163-169.
- [40] MORDHORST S, SINGH J, MOHR M K F, et al. Several polyphosphate kinase 2 enzymes catalyse the production of adenosine 5'-polyphosphates [J]. *Chembiochem*, 2019, 20(8): 1019-1022.
- [41] SIEBERS B, HENSEL R. Glucose catabolism of the hyperthermophilic archaeum *thermoproteus-tenax* [J]. *Fems Microbiology Letters*, 1993, 111(1): 1-8.
- [42] OKANO K, ZHU Q, HONDA K. *In vitro* reconstitution of non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway for lactate production[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(3): 269-275.
- [43] MARSH J A, TEICHMANN S A. Structure, dynamics, assembly, and evolution of protein complexes [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84, 551-575.
- [44] SCHOFFELEN S, VAN HEST J C. Chemical approaches for the construction of multi-enzyme reaction systems [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23(4), 613-621.
- [45] WANG S Z, ZHANG Y H, REN H, et al. Strategies and perspectives of assembling multi-enzyme systems[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(8): 1024-1037.
- [46] HAGA T, HIRAKAWA H, NAGAMUNE T. Fine tuning of spatial arrangement of enzymes in a PCNA-mediated multienzyme complex using a rigid poly-L-proline linker[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75114.
- [47] ITURRATE L, SÁNCHEZ-MORENO I, DOYAGÜEZ E G, et al. Substrate channelling in an engineered bifunctional aldolase/kinase enzyme confers catalytic advantage for C-C bond formation[J]. *Chemical Communications*, 2009(13): 1721-1723.
- [48] HUANG Z, YE F, ZHANG C, et al. Rational design of a tripartite fusion protein of heparinase I enables one-step affinity purification and real-time activity detection[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163(1): 30-37.
- [49] FAN L W, WANG Y, TUYISHIME P, et al. Engineering artificial fusion proteins for enhanced methanol bioconversion[J]. *Chembiochem*, 2018, 19(23): 2465-2471.
- [50] LERCHNER A, DAAKE M, JARASCH A, et al. Fusion of an alcohol dehydrogenase with an aminotransferase using a PAS linker to improve coupled enzymatic alcohol-to-amine conversion[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2016, 29(12): 557-562.
- [51] 魏欣蕾, 游淳. 体外多酶分子机器的现状和最新进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1870-1888.

- WEI X L, YOU C. *In vitro* multi-enzyme molecular machines—a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(10): 1870-1888.
- [52] VAZANA Y, BARAK Y, UNGER T, et al. A synthetic biology approach for evaluating the functional contribution of designer cellulosome components to deconstruction of cellulosic substrates[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 182.
- [53] ANANDHARAJ M, LIN Y J, RANI R P, et al. Constructing a yeast to express the largest cellulosome complex on the cell surface[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(5): 2385-2394.
- [54] YOU C, ZHANG Y H P. Self-assembly of synthetic metabolons through synthetic protein scaffolds: one-step purification, co-immobilization, and substrate channeling[J]. ACS Synthetic Biology, 2013, 2(2): 102-110.
- [55] JEONG D W, HYEON J E, SHIN S K, et al. Trienzymatic complex system for isomerization of agar-derived D-galactose into D-tagatose as a low-calorie sweetener[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(10): 3195-3202.
- [56] SHIMADA J, MARUYAMA T, KITAOKA M, et al. Programmable protein-protein conjugation *via* DNA-based self-assembly[J]. Chemical Communications, 2012, 48(50): 6226-6228.
- [57] SONG J Y, HE W T, SHEN H, et al. Self-assembly of a magnetic DNA hydrogel as a new biomaterial for enzyme encapsulation with enhanced activity and stability[J]. Chemical Communications, 2019, 55(17): 2449-2452.
- [58] SIMMEL F C. DNA-based assembly lines and nanofactories [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(4): 516-521.
- [59] XU K L, CHEN X X, ZHENG R C, et al. Immobilization of multi-enzymes on support materials for efficient biocatalysis[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 660.
- [60] XIN L, ZHOU C, YANG Z Q, et al. Regulation of an enzyme cascade reaction by a DNA machine[J]. Small, 2013, 9(18): 3088-3091.
- [61] FU J L, YANG Y H R, JOHNSON-BUCK A, et al. Multi-enzyme complexes on DNA scaffolds capable of substrate channeling with an artificial swinging arm[J]. Nature Nanotechnology, 2014, 9(7): 531-536.
- [62] MÜLLER J, NIEMEYER C M. DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 377(1): 62-67.
- [63] MA Q Y, GAO X Z. Categories and biomanufacturing methods of glucosamine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(19): 7883-7889.
- [64] JIANG Z, LÜ X Q, LIU Y F, et al. Biocatalytic production of glucosamine from *N*-acetylglucosamine by diacetylchitobiose deacetylase[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(11): 1850-1858.
- [65] LV Y M, LABORDA P, HUANG K, et al. Highly efficient and selective biocatalytic production of glucosamine from chitin [J]. Green Chemistry, 2017, 19(2): 527-535.
- [66] SU C, ALLUM A J, AIZAWA Y, et al. Novel glyceryl glucoside is a low toxic alternative for cryopreservation agent[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 476(4): 359-364.
- [67] TAKENAKA F, UCHIYAMA H. Effects of  $\alpha$ -D-glucosylglycerol on the *in vitro* digestion of disaccharides by rat intestinal enzymes[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(7): 1458-1463.
- [68] KRUTSAKORN B, IMAGAWA T, HONDA K, et al. Construction of an *in vitro* bypassed pyruvate decarboxylation pathway using thermostable enzyme modules and its application to *N*-acetylglutamate production[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 91.
- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] HONDA K, MAYA S, OMASA T, et al. Production of 2-deoxyribose 5-phosphate from fructose to demonstrate a potential of artificial bio-synthetic pathway using thermophilic enzymes[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 148(4): 204-207.
- [72] GRIMAUD F, PIZZUT-SERIN S, TARQUIS L, et al. *In vitro* synthesis and crystallization of  $\beta$ -1,4-mannan[J]. Biomacromolecules, 2019, 20(2): 846-853.
- [73] 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.
- [74] KIM J E, ZHANG Y H P. Biosynthesis of D-xylulose 5-phosphate from D-xylose and polyphosphate through a minimized two-enzyme cascade[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(2): 275-282.
- [75] HUANG H J, LIU L M, LI Y, et al. Redirecting carbon flux in *Torulopsis glabrata* from pyruvate to  $\alpha$ -ketoglutaric acid by changing metabolic co-factors[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(2): 95-98.
- [76] STOTTMEISTER U, AURICH A, WILDE H, et al. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(11/12): 651-664.
- [77] GUO H W, MADZAK C, DU G C, et al. Effects of pyruvate

- dehydrogenase subunits overexpression on the  $\alpha$ -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(16): 7003-7012.
- [78] CHEN X, CUI Y F, CHENG X K, et al. Highly atom economic synthesis of D-2-aminobutyric acid through an *in vitro* tri-enzymatic catalytic system [J]. ChemistryOpen, 2017, 6(4): 534-540.
- [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] ATSUMI S, HANAI T, LIAO J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. Nature, 2008, 451(7174): 86-89.
- [81] GALVAGNO M A, IANNONE L J, BIANCHI J, et al. Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol[J]. Revista Argentina de Microbiologia, 2011, 43(3): 218-225.
- [82] AHRENS K, MENZEL K, ZENG A, et al. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture (III): Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59(5): 544-552.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] ZHANG R B, LIU W, CAO Y J, et al. An *in vitro* synthetic biosystem based on acetate for production of phloroglucinol[J]. BMC Biotechnology, 2017, 17(1): 66.
- [86] 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.
- [87] VALENCIA L E, ZHANG Z C, CEPEDA A J, et al. Seven-enzyme *in vitro* cascade to (3R)-3-hydroxybutyryl-CoA [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2019, 17(6): 1375-1378.
- [88] 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.
- [89] BARRETT S E, TELLER R S, FORSTER S P, et al. Extended-duration MK-8591-eluting implant as a candidate for HIV treatment and prevention [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(10):18-30.
- [90] MCLAUGHLIN M, KONG J, BELYK K M, et al. Enantioselective synthesis of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine (EF-dA) via enzymatic desymmetrization[J]. Organic Letters, 2017, 19(4): 926-929.
- [91] NAKANE A, NAKAMURA T, EGUCHI Y. A novel metabolic fate of arginine in *Streptomyces eurocidicus*. Partial resolution of the pathway and identification of an intermediate [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1977, 252(15): 5267-5273.



通讯作者：郑仁朝(1980—)，男，博士，教授。研究方向为工业生物催化应用基础和产业化研究等。  
E-mail: zhengrc@zjut.edu.cn



第一作者：万逸尘(1996—)，男，博士研究生。研究方向为无细胞酶催化与多酶蛋白结构组装等。  
E-mail: 459377623@qq.com