

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-050

糖质的体外生物合成技术及应用进展

朱玥明^{1,3}, 杨建刚^{1,3,4}, 曾艳^{1,3}, 董乾震², 孙媛霞^{1,3,4,*}

(¹ 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; ² 合成生物学海河实验室, 天津 300308; ³ 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308; ⁴ 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津 300308)

摘要: 糖质是功能食品、医药、能源与材料领域中至关重要的生物资源。近年来, 作为一种新兴的无细胞合成平台, 体外生物合成技术正逐渐成为糖质制造的重要技术路径。该技术通过整合多种酶在单一反应体系中协同催化, 突破了细胞底盘的稳态限制, 具备更高的路径可控性、反应效率与原子经济性。本文系统回顾了糖质体外合成体系的核心技术进展, 包括新酶挖掘与分子改造、热力学驱动与辅酶循环策略、模块化路径设计及多酶协同适配机制; 同时梳理了该技术在单糖/糖醇、寡糖、多糖及糖衍生物等方面的代表性应用案例, 展现其在廉价资源利用、原子经济性、规模化生产方面的优势。此外, 本文还分析了人工智能在新酶挖掘改造、反应路径优化、工艺参数预测等糖质体外生物合成关键技术中的应用潜力。随着生物学与众多学科的深度交叉融合, 糖质体外生物合成正加速从实验室走向工业化, 有望成为下一代绿色生物制造的重要支撑。

关键词: 糖质资源; 体外生物合成; 酶工程; 路径设计; 热力学驱动; 辅酶循环

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Advances and applications of *in vitro* biosynthesis of carbohydratesZHU Yueming^{1,3}, YANG Jiangang^{1,3,4}, ZENG Yan^{1,3}, DONG Qianzhen², SUN Yuanxia^{1,3,4,*}

(¹Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; ²Haihe Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China; ³National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China; ⁴Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin 300308, China)

Abstract: Carbohydrates are essential bioresources with wide-ranging applications in the fields of functional foods, pharmaceuticals, energy, and advanced materials. The traditional methods for carbohydrate production, which typically rely on cellular systems, often suffer from inherent limitations such as low product yield, complex pathway regulation, and limited scalability. In recent years, *in vitro* biosynthesis technology has emerged as a groundbreaking alternative, offering a highly versatile, cell-free platform for the efficient synthesis of carbohydrates. This technology integrates multiple enzymes within a single reaction system, enabling them to work synergistically without the constraints of a living cell. This approach offers several significant advantages over traditional cellular synthesis. First, it bypasses the

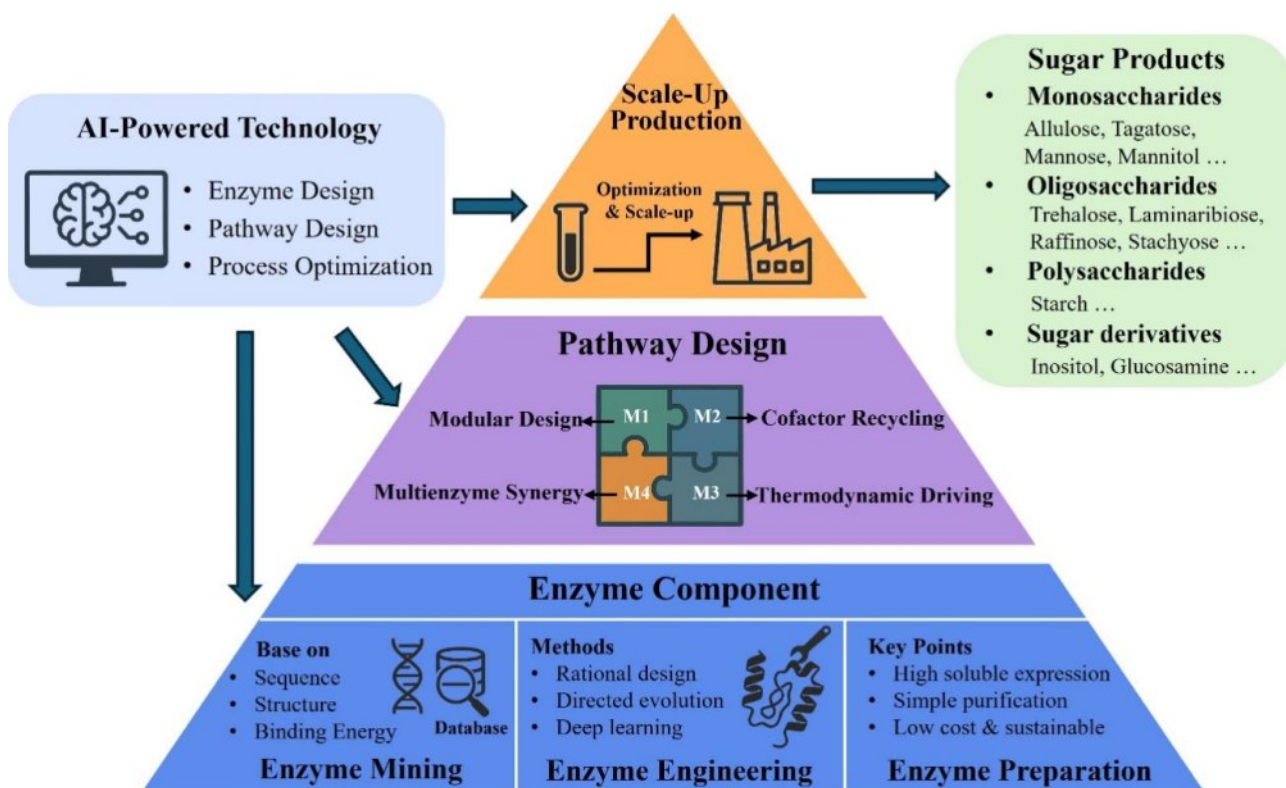
收稿日期: 2025-05-28 修回日期: 2025-07-08

基金项目: 中国科学院关键核心技术攻关先导专项 (XDC0120203), 合成生物学海河实验室颠覆性创新项目 (22HHSWSS00016), 合成生物学海河实验室攻关项目 (22HHSWSS00003), 天津合成生物技术创新能力提升行动 (TSBICIP-KJGG-028), 山东省重点研发计划项目 (2023CXGC010714)

引用本文: 朱玥明, 杨建刚, 曾艳, 董乾震, 孙媛霞. 糖质的体外生物合成技术及应用进展[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-050

Citation: ZHU Yueming, YANG Jiangang, ZENG Yan, DONG Qianzhen, SUN Yuanxia. Advances and applications of *in vitro* biosynthesis of carbohydrates[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-050

steady-state limitations of cellular systems, allowing for higher reaction rates and enhanced product yields. Second, it provides greater pathway controllability, making it possible to fine-tune reaction conditions for optimal performance. Third, it enhances the atomic economy, as the absence of cellular byproducts leads to more efficient use of substrates. These attributes make *in vitro* biosynthesis a powerful tool for the scalable and sustainable production of a wide range of carbohydrate products. This review provides a comprehensive overview of the core technological advancements in the *in vitro* carbohydrate synthesis. The discovery, engineering and expression of target enzymes are the foundation of the *in vitro* biosynthesis, providing the basic elements for pathway construction. For the pathway design, thermodynamic driving and cofactor recycling strategies ensure sustained catalytic activity and energy efficiency. Furthermore, the modular design of synthesis pathways allows for flexible configuration and rapid optimization of multi-enzyme systems, while synergistic adaptation mechanisms enable the efficient coordination of enzyme functions. This review also highlights representative applications of *in vitro* biosynthesis technology in the production of various monosaccharides, sugar alcohols, oligosaccharides, polysaccharides, and sugar derivatives, demonstrating its advantages in utilizing low-cost resources, achieving atomic economy, and enabling scalable production. Moreover, the potential of artificial intelligence to further enhance *in vitro* carbohydrate biosynthesis is discussed, particularly in the areas of enzyme discovery and modification, pathway optimization, and process parameter prediction. As the convergence of biology with advanced computational tools continues, *in vitro* carbohydrate biosynthesis is expected to accelerate its transition from laboratory research to industrial-scale applications, becoming a key enabler of next-generation green biomanufacturing.



Keywords: carbohydrate resources; *in vitro* biosynthesis; enzyme engineering; pathway design; thermodynamic driving; cofactor recycling

1 引言

近十余年来,合成生物学作为融合生物学、化学和工程学等领域的新兴学科发展迅速,已成为推动生物制造革新的重要驱动力^[1]。该学科基于传统代谢工程手段,引入“设计-构建-测试-学习”工程循环理念^[2],加速生物合成路径的设计与优化进程,通过构建高效的微生物细胞工厂,实现了化学品、药品、食品、生物能源、生物材料等诸多物质的合成生产^[3-4]。

然而,基于活细胞的合成体系目前依然面临诸多挑战^[5]。首先,合成生物学需要协调细胞生长和产物积累之间的平衡关系^[6-7]。由于细胞的代谢资源必须同时满足自身生长和外源产物合成的需求,如何实现二者之间的最佳平衡成为合成生物学的核心难题。Radde等提出了一条经验准则:代谢改造不应使细胞生长速率降低超过30%。一旦超过这一阈值,过高的代谢负担将引发意外的进化效应,导致细胞工厂的功能丧失^[8]。其次,最大程度减少外源途径导入对宿主细胞带来的代谢负担。细胞工厂构建过程中,外源基因过表达以及中间产物和终产物的积累,会干扰细胞的正常代谢并带来一定潜在毒性^[9-10]。Corrêa等指出,

在工程菌中增强蛋白质或化学产物的合成往往会显著加重代谢负担,导致细胞生长减缓,并引发异质性细胞群体的形成^[11]。再次,克服细胞膜/壁对底物和产物在跨膜运输中的屏障作用^[12]。当底物或产物为大分子物质时,这种屏障作用对细胞工厂合成效率的影响更为显著。例如,由于大分子底物无法有效进入细胞内,转化反应效率将大幅下降;大分子产物无法顺利分泌到胞外,导致产物分离纯化的难度及成本大幅增加。

体外生物合成技术是一种新兴的合成生物学平台,其特点是在无细胞体系中重构生物合成途径,从而克服细胞底盘局限,增强目标产物合成的高效性和经济性^[13-14]。该技术在体外开放环境中实现多酶级联协同催化^[15],由于不依赖完整活细胞,避免了细胞生长代谢和复杂调控等限制,具备更高的灵活性、模块化程度和精确可控性。研究表明,通过催化路径设计及转化条件优化,体外生物合成系统在产物得率、反应速率与反应条件宽泛性方面表现优异,转化效率远超传统细胞体系^[16-17]。此外,体外生物合成系统具有更高的毒性产物耐受性,特别适合生产对活细胞具有毒性的化合物^[18]。

体外生物合成技术在糖质资源的生产中展现出显著的灵活性和高效性(图1)。一方面,体外

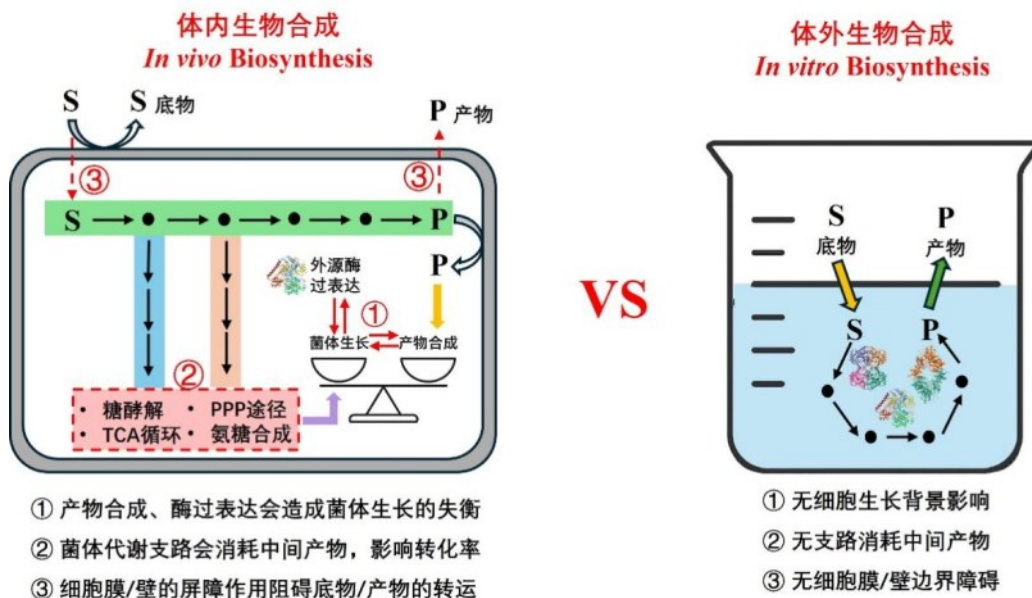


图1 体外生物合成与体内生物合成的比较

Fig. 1 Comparison of *in vitro* biosynthesis and *in vivo* biosynthesis

生物合成技术有效避免了细胞膜的屏障作用，能够以廉价大分子物质为原料，进行功能性糖类的生物制备。例如，You等建立了以非粮纤维素资源制备淀粉的体外生物合成技术，通过最优路径设计实现了纤维素向淀粉的高产率、低成本转化^[19]。与此相比，传统的微生物细胞转化，需先在体外进行纤维素水解^[20]，然后小分子水解产物进入菌体内进行淀粉合成，细胞膜的隔离作用导致产率低、反应慢。另一方面，体外生物合成技术具有更加集中的反应路径，有效避免了胞内多种糖类代谢途径的干扰，促使底物或中间产物专一性地用于合成目标产物，大幅提升了转化效率。例如，果糖-6-磷酸(F6P)是利用体外生物合成技术制备多种功能稀少糖的重要前体物质^[21-22]，若采用体内转化技术合成，需要削弱糖酵解、氨基糖合成、磷酸戊糖途径等多个代谢通路以减少F6P的消耗，但这一策略常常对宿主菌株的生长产生不利影响。

为了充分发挥体外生物合成系统高效且灵活的优势，首先必须确保酶元件具备良好的活性、稳定性和底物选择性。因此，酶的高效挖掘、精准改造与规模化制备是构建体外生物合成体系的关键基础，决定着整个系统的催化效率与工业应用潜力。

2 体外生物合成关键技术开发与创新

2.1 酶元件使能技术是体外生物合成的基石

在体外生物合成技术中，酶元件的挖掘、分子改造和高效生产是整个体系的基础。酶元件的挖掘包括从自然界中筛选或利用生物信息学工具预测潜在的高效酶，是体外生物合成路径构建的基石；酶分子改造是指通过理性设计或定向进化优化酶的活性、特异性和稳定性，使其在多酶级联路径中表现出优异的催化性能；酶的高效表达确保了这些酶元件能够以低成本和高产量获取，从而满足大规模生产的需求（图2）。

2.1.1 酶元件的高效挖掘和功能预测

丰富的酶元件库为体外生物合成的途径设计提供了灵活的“模块”。随着生物信息学和结构生物学等学科快速发展，目前已有多种数据库资源可用于酶元件挖掘^[23-25]。常用的序列同源性搜索(BLAST)技术，将已知功能酶的序列作为探针，通过NCBI^[26]、UniProt^[27]、InterPro^[28]等数据库检索发现新酶品种。嗜热菌来源的热稳酶不仅能够显著提高整个系统的稳定性，还可以通过简单的加热方法实现纯化^[29-30]，在体外生物合成领域中

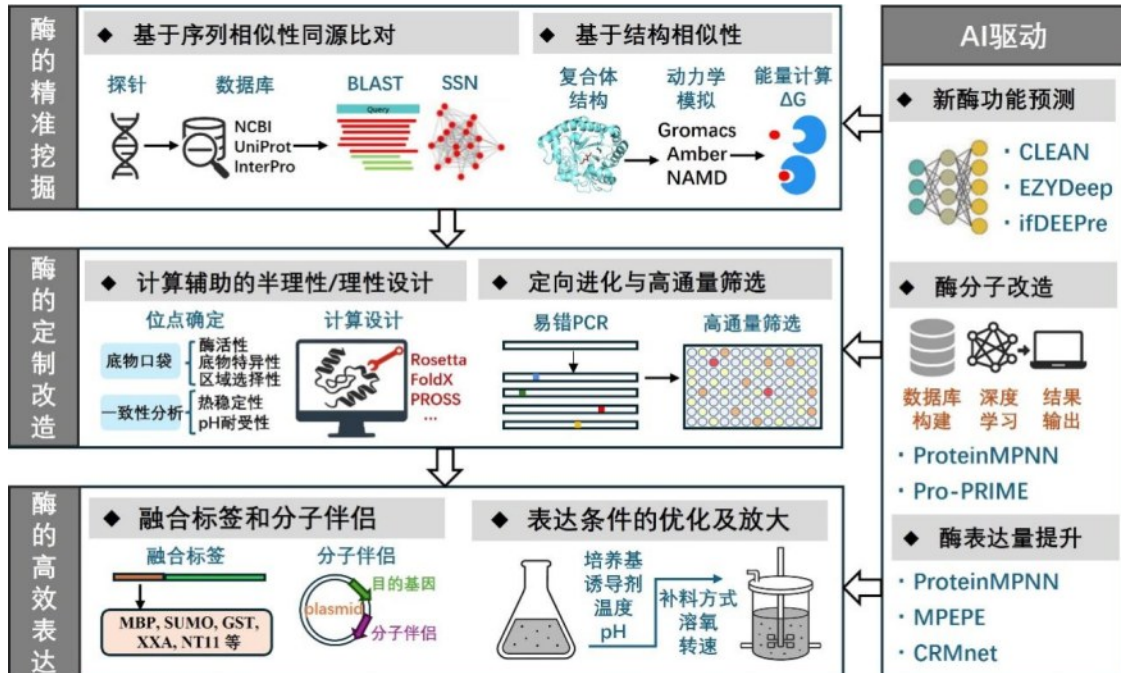


图2 酶元件的挖掘、分子改造与高效表达

Fig. 2 Discovery, molecular engineering, and expression of enzyme components

表现出极高的应用潜力。Wang等以来源于嗜热菌的木酮糖异构酶作为探针，在UniProt数据库中进行BLAST搜索，筛选获得50℃下半衰期超过8天、热稳定极强的新型木酮糖异构酶（RmXI），利用其对L-赤藓酮糖的异构化活性构建了体外合成路线，实现从廉价一碳原料甲醛到L-赤藓糖的高效生物合成^[31]。

将序列相似性与酶催化结构相结合能够大幅提高酶元件挖掘的高效性和精准性。例如，You等将序列相似性网络（SSN）和分子对接相结合，通过酶相似性工具EFI-EST（Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool）^[32]构建SSN，同时从底物特异性出发，筛选具有相同“帽”结构^[33]的耐热D-阿洛酮糖6-磷酸磷酸酶（A6PP），以此构建以廉价淀粉为原料制备D-阿洛酮糖的体外生物合成路径^[34]。Mak等为挖掘酮异戊酸脱羧酶（KIVD）建立了生物信息学与分子建模相融合的方法^[35]，首先通过序列相似性比对获得候选酶，然后利用Rosetta^[36]、MMPBSA^[37]等软件进行底物对接与界面能量计算，最终获得特异性提升100倍的新型KIVD。

近年来，随着人工智能（Artificial Intelligence, AI）技术的快速发展，涌现出一系列机器学习与深度学习平台，能够从序列、结构等角度高效预测酶的功能特性，为新酶挖掘提供了重要依据^[38-39]。例如，由Yu等开发的CLEAN（Contrastive Learning-Enabled Enzyme Annotation）机器学习算法基于对比学习框架，能够注释以往研究较少的未知酶、纠正功能注释错误的酶、识别具有两个或更多EC编号的多功能“兼性酶”，预测准确性、可靠性和灵敏度均优于当前主流工具BLASTp^[40]。另一种序列驱动的酶分类工具EZYDeep则采用卷积神经网络对蛋白序列进行特征提取和分类，在所有四级EC分类上均取得了超过95%的准确率，显示了纯序列信息在酶功能预测中的价值^[41]。ifDEEPre是2024年推出的一款酶功能预测平台，引入了自注意力机制和大型蛋白质语言模型嵌入的预训练知识，能够自动捕捉关键氨基酸序列基序，提升了酶功能预测的速度和可解释性^[42]。

2.1.2 酶元件的分子改造

从自然界中挖掘获得的天然酶通常在某些方

面表现优异，但可能存在催化活性不足、稳定性较差、底物范围受限以及易受产物抑制等缺陷，难以完全满足体外生物合成系统的需求^[43]。因此，需要对酶进行分子改造以保证体外生物合成系统的高效性和稳定性。经典的酶分子改造策略包括理性/半理性设计和定向进化^[44]，新兴的AI驱动改造方法为酶工程提供了全新的设计思路和高效的优化工具^[45]。

理性/半理性设计策略通过对酶三维结构及催化机制的研究，精准定位影响酶活、稳定性或底物特异性的氨基酸残基，构建“小而精”的突变体库用于筛选，所需突变体的数量较少^[46-47]。分子建模技术^[48-49]和分子对接技术^[50-51]为缺乏晶体结构的酶分子的理性设计提供了有力支持，分子动力学模拟技术^[52-53]则成为研究酶结构稳态和揭示催化机制的有效工具。Tian等利用理性设计手段对天然磷酸酶的底物泛杂性进行改造，成功获得了多个具有定制底物偏好的突变体，分别专一识别F6P和甘露糖-6-磷酸（M6P）后，在此基础上构建体外生物合成途径，将廉价淀粉高效转化为果糖和甘露糖，产率高达94 - 96%^[54]。Zhang等结合一致性分析、疏水相互作用、脯氨酸引入等策略，对*Marinobacter adhaerens*来源的葡萄糖基甘油磷酸化酶（MaGGP）进行半理性设计改造，克服了酶改造中常见的“活性-稳定性权衡”难题，实现了MaGGP的热稳定性（1200倍）和催化效率（13.7倍）同时显著提升，并构建了以廉价淀粉为原料的体外生物合成系统，实现了甘油葡萄糖苷的高转化率合成^[55]。

定向进化通过模拟自然进化过程，引入随机突变构建突变体库，筛选出性能改良的突变体并进行迭代进化，从而获得性能显著提升的改造酶^[56]。易错PCR技术是一种经典的突变引入方法，可用于构建突变体库，进而筛选出优势突变体作为模板用于后续迭代进化^[57]。相比理性/半理性设计，定向进化策略需要构建更大规模的突变体文库，筛选过程对高通量筛选手段依赖程度更高。Zhang等建立双层平板筛选法对6-磷酸葡萄糖脱氢酶（6PGDH）突变体文库进行高效初筛，通过在第二层平板中添加与NADH反应生成黑色沉淀的TNBT、PMS底物，达到肉眼快速初筛的目的^[58]，

该技术已拓展至其他氧化还原酶及NAD(P)H生成酶的定向进化改造^[59-60]。Zhu等建立了基于比色法的转氨酶高通量筛选技术，成功筛选获得了比酶活提升31.2倍、热稳定性提高200倍的转氨酶突变体，并以此建立了氮杂糖的体外生物合成路径^[61]。

随着计算机算力的大幅提升，AI驱动的设计工具被加速应用于酶分子改造^[62]。经典的软件如Rosetta、FoldX等通过能量打分函数预测突变对蛋白稳定性或结合能的影响，从而构建虚拟筛选突变库。近年出现的图神经网络模型(GNN)也已用于酶分子设计，如诺贝尔奖获得者David Baker开发的ProteinMPNN模型，利用蛋白质结构图谱来生成与给定结构相适应的新序列，可以显著改善天然酶的理化性质而不损失功能^[63]。此外，机器学习与深度学习模型为酶分子的智能突变设计提供了有力支持，如Bian等基于不同突变体的训练数据，构建了一个温度引导的蛋白语言模型Pro-PRIME，用于学习高阶相互作用特征并设计组合突变体，成功获得了50个热稳定性显著提升的组合突变体^[64]。

2.1.3 酶元件的高效异源表达

体外生物合成的最终目标是规模化生产目标产物，因此酶的低成本、高效制备技术成为体外生物合成能否实现实际应用的关键。实现目标酶的高水平可溶性表达，是酶低成本规模化制备的基础。针对目标酶表达水平低的问题，可通过更换强启动子、改良非编码区(如5' UTR和3' UTR)、优化密码子等策略，从mRNA转录、蛋白质翻译多层面提升蛋白表达效率。针对目标酶表达量虽高，但以包涵体形式存在这种情况，可以采用融合标签引导表达(促溶标签)、分子伴侣共表达等策略提升可溶蛋白含量。常见的促溶标签包括MBP^[65]、SUMO^[66]、GST^[67]、XXA^[68]、NT11^[69]等，其具有促进目标酶正确折叠，显著减少包涵体形成的功能。通过分子伴侣的共表达能促进目标酶在翻译后正确折叠，从而有效防止错误构象蛋白聚集形成包涵体^[70]。此外，深度学习模型也可用于预测目标蛋白的表达水平以及辅助设计突变位点以提升表达水平，如上文提到的ProteinMPNN模型就具备这一功能。Ding等开发了一个用于提升蛋白表达的突变位点预测工具——MPEPE

(Mutation Predictor for Enhanced Protein Expression)，可用于识别有助于蛋白表达的有利突变位点，成功提升了漆酶与葡萄糖脱氢酶的表达量和酶活性^[71]。

酶异源表达的宿主菌包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、毕赤酵母等，其中大肠杆菌是最常见的蛋白表达菌株，但其表达的酶定位于细胞内，需要分离破碎菌体等操作才能释放。枯草芽孢杆菌、毕赤酵母因其较强的蛋白分泌能力被开发为分泌型表达工程菌株，显著降低了菌体破碎和蛋白纯化步骤带来的成本压力。由于分泌表达依赖于信号肽的引导，目标蛋白实现分泌表达的首要步骤是筛选并优化合适的信号肽。Khadye等构建了一个包含来自*B. subtilis* 168基因组的173种信号肽库，将其分别与目标蛋白 β -葡萄糖苷酶进行融合，通过胞外表达测试筛选获得将目标酶分泌水平提高16倍的CitHSP信号肽^[72]。毕赤酵母的甲醇诱导系统不仅具备高密度发酵、高效分泌外源蛋白以及纯化简便的优势^[73]，还特别适用于在原核生物中难以表达的酶的高水平可溶性表达，尤其是那些需要形成分子内二硫键的酶^[74]。

2.2 糖质体外合成中原子经济性与能量驱动途径设计

体外合成中的原子经济性对技术应用极为重要，Zhang等提出了“市本率”(Price to Cost-of-raw-materials Ratio, PC值)这一创新指标，并根据PC值大小，将生物制造产品划分为高值产品、增值产品、大宗产品和情怀产品^[75]。体外生物合成聚焦于低PC值产品的生产，即以更加廉价的原料、开发更为先进的体外转化技术进行大宗产品的生产。这说明构建体外生物合成路径时，必须统筹兼顾原料和生产方式的经济性和高效性，体外生物合成的原子经济性优势主要体现在能量驱动和辅酶循环再生两个方面。

2.2.1 热力学驱动在体外合成途径设计中的应用

在体外生物合成体系中，热力学驱动策略是实现高转化率、强方向性和高能量效率的核心设计理念之一。通过引入不可逆反应步骤、精细调控反应势能差、耦合高能分子循环，能够有效突破常见的反应平衡限制，大幅提升合成效率。目

前, 研究学者开发了多个在线计算平台 (如 eQuilibrator 等) 可以方便地对反应底物与产物进行热力学分析^[76]。通过计算反应的吉布斯自由能变化 (ΔG) 衡量反应的难易程度^[77]。例如, D-果糖到 D-阿洛酮糖的差向异构化反应, 在标准条件下对应的 ΔG 大于零, 反应平衡时阿洛酮糖的转化率最高为 30%^[78]。而磷酸化 - 去磷酸化多酶级联反应路线通过最后步骤引入磷酸酶介导的去磷酸化不可逆反应, 推动整个级联路径向产物 D-阿洛酮糖生成方向进行, 从而打破热力学对转化率的限制, 理论转化率可达 100%。Wen 等将单糖激酶与酸性磷酸酶联用, 成功合成了包括 D-阿洛酮糖在内的多种 D-和 L-型稀有酮糖, 其中大部分产物转化率超过 90%^[79]。

另外, 单糖的磷酸化步骤依赖 ATP 作为辅因子, 实现高能 ATP 分子的稳定供给是体外生物合成的另一个关键因素。传统的 ATP 再生体系主要通过耦合高能磷酸化合物与磷酸转移酶, 将 ADP 或 AMP 重新磷酸化为 ATP, 以维持反应体系中的 ATP 浓度。磷酸烯醇式丙酮酸-丙酮酸激酶 (PEP-K) 体系和乙酰磷酸-乙酸激酶 (AcP-AcK) 体系, 是两种最常见的 ATP 再生方式^[80]。但是, PEP 等高能磷酸供体价格昂贵, 不利于大规模应用。一个替代的 ATP 再生方式是聚磷酸 - 聚磷酸激酶 (polyP-PPK) 体系^[81], 该体系以无机聚磷酸 (polyP) 为底物, 成本低, 反应副产物为聚磷酸或无机磷酸 (P_i), 不存在额外的碳基副产物累积, 体现了更强的原子经济性。另一种策略是将寡糖 (如蔗糖、纤维二糖) 或多糖 (如纤维素和淀粉) 作为体外生物合成的原料。在磷酸化酶的催化下, 这些糖类分子中的糖苷键能量通过 P_i 转化为磷酸化糖, 直接进入下游反应路径, 无需额外添加 ATP^[82]。例如, You 等构建了一个以淀粉为原料制备肌醇的体外生物合成体系, 淀粉在 α -葡聚糖磷酸化酶 (α GP) 作用下生成葡萄糖-1-磷酸 (G1P) 后经一系列级联催化反应获得肌醇产物^[83]。该策略也被成功应用于以蔗糖或纤维二糖为底物合成肌醇^[84], 以及以淀粉合成高能磷酸代谢物果糖-1,6-二磷酸^[85]。

2.2.2 辅酶循环再生在体外合成途径设计中的应用

许多糖类体外生物合成途径涉及辅酶 (如

NADH、NADPH) 或高能供体 (如 ATP、核苷酸糖供体) 的消耗。依靠外源添加辅酶/供体会大幅增加生产成本, 同时产生大量副产物, 既降低了原子利用率, 也可能对后续步骤造成反馈抑制。除 ATP 循环再生策略外, NAD(P)H 和核苷酸糖的循环利用方式在体外合成系统中也发挥重要作用。NAD(P)H 辅酶作为质子供体对许多氧化还原反应至关重要。其再生策略的原子经济性主要体现在减少副产物生成、提高原料利用率以及构建闭环循环体系等。常用的 NAD(P)H 再生系统包括: 甲酸/甲酸脱氢酶 (FDH)^[86]、葡萄糖/葡萄糖脱氢酶 (GDH)^[87]、葡萄糖-6-磷酸/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH)^[88] 系统等。其中, FDH 系统能够实现近乎不可逆的反应驱动, 有利于产物的完全转化; GDH 系统具有 NADH 和 NADPH 双辅酶活性及底物廉价等优点; G6PDH 系统作为磷酸戊糖途径关键酶, 可提供 NADPH 的稳定供给。

糖基供体的循环利用主要用于糖基转移反应中活性糖供体的再生。糖基转移酶利用核苷酸糖 (如 UDP-葡萄糖、GDP-甘露糖等) 将糖基转移给受体分子, 释放具有反馈抑制效应的核苷二磷酸 (如 UDP) 副产物。通过原位再生糖核苷酸中间体, 可在仅使用少量糖核苷酸的情况下有效降低核苷酸磷酸副产物的积累, 从而降低糖核苷酸成本, 缓解产物抑制问题^[89]。糖基供体的原位再生需要在反应中引入核苷二磷酸糖焦磷酸化酶或蔗糖合酶等酶, 将生成的核苷二磷酸重新合成为核苷酸糖供体。例如, 利用蔗糖合酶可催化蔗糖与 UDP 生成 UDP-葡萄糖和果糖, UDP-葡萄糖被糖基转移酶利用, 而 UDP 则不断循环。Li 等利用蔗糖合酶和不同区域选择性的 UDP-糖基转移酶构建了罗汉果苷 V 的体外生物合成路线^[90]。

2.3 体外生物合成的模块化设计与协同适配优化

在体外生物合成系统中, 通常需要多种酶协同作用以完成多步酶促反应。然而, 由于来源不同、性质各异, 这些酶的最优反应条件往往存在显著差异。这种差异会在同一反应体系中带来一系列挑战, 如反应效率受限、酶活性损耗以及酶间协同效果不佳, 最终影响整体转化效率。因此,

模块化设计与协同适配优化策略成为构建高效体外生物合成系统不可或缺的手段。

2.3.1 体外生物合成的模块化设计

模块化设计将复杂的多步酶反应途径拆解为若干功能明确、可单独优化的酶模块，通过“模块拼接”的方式构建完整反应流程。这种模块化设计的理念不仅便于体系的调试和路径拓展，也为不同功能酶的整合提供了高度自由度，从而提升了体外生物合成系统效率，实现了路径灵活组装优化。

利用游离酶混合物“一锅法”进行体外转化，是体外生物合成最初级的模式^[83]。这种方式操作简便且易于调整酶配比，但由于不同酶反应条件的差异，在同一系统中反应可能导致某些酶不稳定，且具有中间产物传递效率低等缺陷^[91]。利用多酶复合体或固定化策略，可以改善临近路径中酶的微环境，加强中间产物的传质效率，同时提升酶的稳定性，进而提升体外生物合成系统的效率。通过融合蛋白或人工支架（如DNA、蛋白质支架）策略可拉近同一模块中相互关联酶的距离，降低中间产物扩散距离，减少副反应。例如，Fan等构建了利用甲醇为原料合成F6P的三酶融合蛋白，反应速率显著高于游离酶混合物^[92]。利用蛋白质共价（SpyTag-SpyCatcher）^[93]或非共价（cohesin-dockerin）^[94]偶联技术能够更为便捷地构建多酶复合体。Sun等利用SpyTag-SpyCatcher的自组装策略，构建葡聚糖磷酸化酶（GPs）和葡糖基甘油磷酸化酶（GGPs）的复合体，以低成本的麦芽糊精和甘油为原料合成2 α -葡萄糖基甘油（2 α GG），产率达到游离酶的3倍^[95]。另外，共固定化策略不仅能有效增强中间产物传递效率，还提高酶的稳定性，并且便于酶回收和重复使用。例如利用多孔聚多巴胺微球共固定化催化淀粉合成肌醇的四酶体系，其反应速率与游离酶相当，但热稳定性和回收稳定性显著提升^[96]；以硅酸盐/聚乙烯亚胺仿生矿化微囊封装相同四酶，半衰期达游离酶的5.9倍，肌醇产物浓度达210 g/L，具备工业化潜力^[97]。

2.3.2 体外生物合成路径的协同适配优化

模块化设计理念指导的体外生物合成系统具有显著优势，其核心在于将整个反应路径按功能

划分为多个独立模块。每个模块可以分别进行酶元件和反应条件的优化，从而获得一系列高效的模块化组件。通过灵活调整和组合这些模块，确保各反应步骤在最优条件下高效运行，能够实现多酶协同效率的显著提升。一锅多步/段法可调控路径不同模块的反应时间和条件，是实现模块高效协同与动态适配的关键策略。在每段/步的反应过程中，可利用不同条件进行反应，借助条件切换（如pH、温度、辅酶状态）精准调控酶的活性水平，确保每个模块在最优环境中高效运行。这种模块化的设计方式有效缓解了多酶系统中因酶性质差异带来的反应条件不一致问题，同时降低了反应体系复杂度和能耗，提升了碳原子转化效率与操作集成度。例如，Yang等构建了二氧化碳制糖的体外生物合成路线，将整个反应划分为C1、C3、C6等酶促反应模块，不同模块依次作用，将二氧化碳合成转化为F6P基元后，在多种异构酶、磷酸酶的级联作用下转化为葡萄糖、甘露糖、阿洛酮糖、塔格糖等各种醛糖或酮糖^[98]。

近年来，计算机辅助路径设计已成为体外生物合成途径构建和优化的重要工具。通用的代谢通路设计流程，包括五个关键步骤：数据库构建、代谢网络表示、网络剪枝、搜索算法实现、通路排序，旨在筛选最优的目标通路^[99]。随着AI技术与生物资源数据库的快速发展，深度学习和强化学习等数据驱动方法进一步丰富了途径设计技术^[100]。Wei等开发了高质量的跨物种代谢网络模型（CSMN）和定量异源通路设计算法（QHEPath），通过CSMN和QHEPath的系统性计算，研究评估了12,000种生物合成场景，识别出13种工程策略，并将其归类为碳守恒型和能量守恒型两大类，其中5种策略在超过100种产物生产中表现出广泛适用性^[101]。

3 体外生物合成在糖质制备中的应用

体外生物合成技术已广泛应用于包括单糖、糖醇、寡糖、多糖以及糖衍生物等多种糖质资源的生物制备，展现出高度的灵活性、可扩展性和原子经济性。本节将通过经典案例进行详细说明。

3.1 单糖/糖醇的体外生物合成制备

单糖和糖醇是人类最常用的甜味剂，例如由葡萄糖和果糖构成的果葡糖浆广泛应用于食品、饮料、调味品中。但是，果糖等常规餐桌糖对肝脏的代谢负担较大，容易引发糖尿病、肥胖等慢性疾病。因此，具有一定甜度且低热量的糖醇（木糖醇、赤藓糖醇等）以及功能性稀少糖（D-阿洛酮糖、D-塔格糖等）引起了广泛关注。Izumori建立了稀少糖类的酶法转化 Izumoring 策略，利用差向异构酶、醛糖异构酶、多元醇脱氢酶实现 34 种六碳糖的生物转化^[102]。在此基础上，研究人员开发了多条多酶级联体外生物转化路径，以廉价的天然底物生产稀少糖（图 3A）。例如，Men 等以热稳酶 D-葡萄糖异构酶（GI）与 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶（DAE）构建体外生物转化途径，使用果葡糖浆、富含葡萄糖和果糖的枣汁作为原料生产含有 D-阿洛酮糖的阿果糖浆和功能枣汁产品^[103-104]。Zhu 等将外切菊粉酶（BvInu）与 DAE 联用，开发了以菊芋为原料制备阿果糖浆的一锅法体外生物合成体系，通过反应条件优化，使菊芋原料中的菊粉几乎完全转化为单糖^[105]，扩展了稀少糖生物转化制备的原料来源（图 3A）。

受热力学限制的影响，基于 Izumoring 策略的单糖转化方法在最大转化率上存在固有限制。张以恒研究团队提出热力学驱动理念，构建了一种基于磷酸化-去磷酸化驱动的体外生物合成体系^[34]，以廉价的淀粉为原料合成多种功能稀少糖（图 3B）。孙媛媛研究团队通过关键磷酸酶的分子改造，获得了多个专一性识别某一种磷酸化糖的磷酸酶突变体，并以此构建了体外生物合成途径，成功将廉价的蔗糖和淀粉高效转化为果糖和甘露糖，产率高达 94 - 96%^[54]。功能糖醇的体外生物合成系统中往往需要整合 NAD(P)H 辅酶循环再生模块。例如，Wei 等利用模块化策略构建了由 3 个模块、9 个酶组成的体外生物合成体系合成甘露醇，其中核心催化模块中包含 6 个关键酶，以甲酸-FDH 系统实现 NADH 的循环再生。该体系采用热力学驱动的策略，利用整个路径最后一个不可逆的磷酸酶拉动了反应平衡提高转化率，甘露醇的产率高达 95% - 98%^[106]。同时，该体系选用嗜热菌来

源的热稳酶进行路径构建，大幅增强了整个体系运行时的稳定性，简化了关键酶的纯化步骤，降低了反应的成本，具有很强的工业化生产潜力。

除了廉价淀粉可作为体外生物合成系统的理想原料，随着低碳经济的发展，二氧化碳也被用作糖质体外生物合成途径的原料。Yang 等创建了一条多功能的化学-酶偶联人工二氧化碳制糖路线（Artificial CO₂-to-Sugars pathway, ACSP）^[98]，整合了醛醇缩合、异构化/差向异构化以及脱磷酸等反应，将 CO₂和 H₂在对映选择性完全可控的条件下组装为糖类分子。该体外生物合成体系的核心催化模块基于热力学驱动策略，构建了 ATP 消耗最少、路径最短的合成途径，自下向上实现了从一碳底物甲醇到糖类前体 F6P 的合成，为进一步合成其他糖类及衍生物奠定了基础。通过反应路径限速酶的工程改造，体系实现了 D-阿洛酮糖等功能性己糖的合成，终产物浓度达 63 mmol L⁻¹，CO₂到产物的转化速率为 25 mmol C L⁻¹ h⁻¹。该路线具有良好的拓展性，有望实现从 CO₂精准合成其他更高阶糖类分子的目标（图 3C）。

3.2 寡糖的体外生物合成制备

寡糖作为一种益生元物质，对人体肠道健康具有显著功效，在医药、食品等领域中具有较强的应用潜力。寡糖的传统生物制备通常采用多糖酶解的方法，即利用糖苷酶或裂解酶对天然多糖分子的降解获得产物。例如，Yan 等利用两种不同类型的琼脂酶建立“一锅两步法”模块化策略，实现新琼二糖的体外生物转化。在第一模块中，利用嗜热型内切型琼脂酶（AgaA）在高温条件下高效液化琼脂，形成不同聚合度的新琼寡糖，随后通过降低反应温度、添加外切型琼脂酶（AgaB）进入第二模块，促使新琼寡糖的聚合度均一化，最终获得高纯度新琼二糖，该策略可将 10 g/L 的琼脂完全转化为新琼二糖^[107]。

寡糖的制备方法既可采用多糖“自上而下”的降解策略，也可以通过单糖“自下而上”的组装合成途径实现。在“自下而上”的体外生物合成途径中，糖基转移酶和核苷酸糖供体的循环再生系统至关重要^[108]。Tian 等开发了以蔗糖为底物

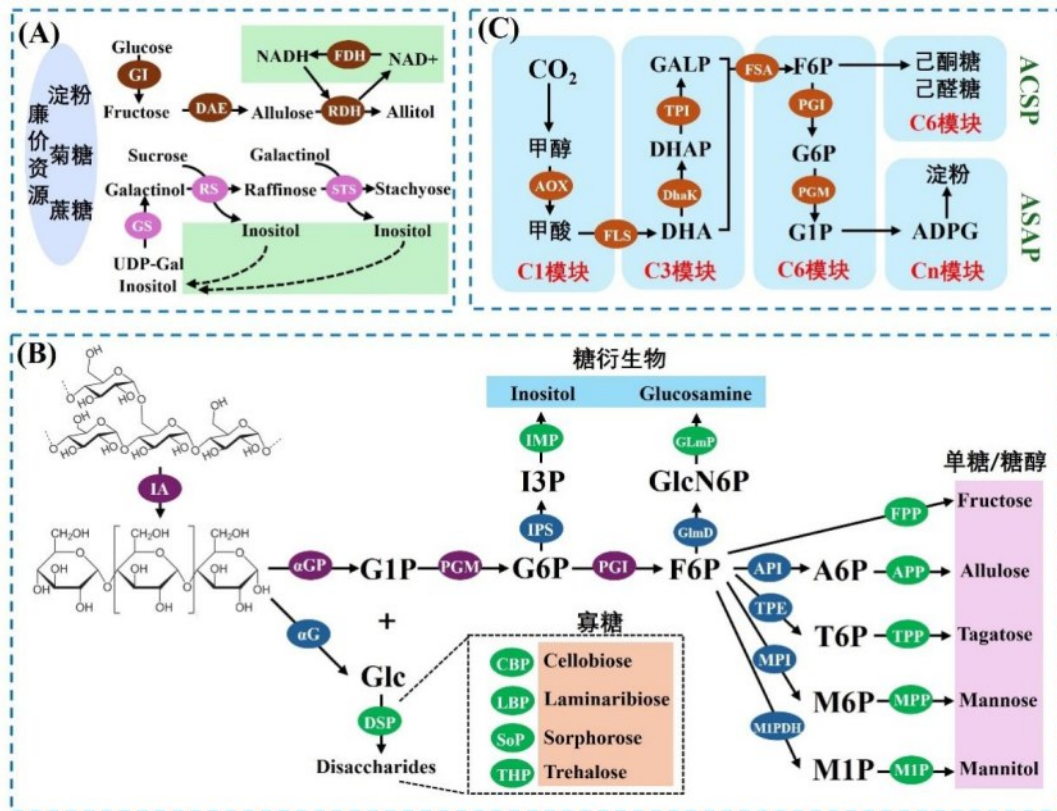


图3 体外生物合成在糖类制备中的应用

(A) 辅酶循环策略在体外生物合成中的应用. GI, 葡萄糖异构酶; DAE, D-阿洛酮糖 3-差向异构酶; RDH, 核糖醇脱氢酶; FDH, 甲酸脱氢酶; GS, 肌醇半乳糖合成酶; RS, 棉子糖合成酶; STS, 水苏糖合成酶. (B) 热力学驱动策略在体外生物合成中的应用. IA, 异淀粉酶; αGP, α-葡聚糖磷酸化酶; PGM, 磷酸葡萄糖变位酶; PGI, 葡萄糖 6-磷酸异构酶; API, 阿洛酮糖 6-磷酸异构酶; TPE, 塔格糖 6-磷酸 4-差向异构酶; MPI, 甘露糖 6-磷酸异构酶; MIPDH, 甘露醇 1-磷酸 5-脱氢酶; FPP, 果糖 6-磷酸磷酸酶; APP, 阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶; TPP, 塔格糖 6-磷酸磷酸酶; MPP, 甘露糖 6-磷酸磷酸酶; M1P, 甘露醇 1-磷酸磷酸酶; αG, α-葡萄糖苷酶; DSP, 二糖磷酸化酶; CBP, 纤维二糖磷酸化酶; LBP, 昆布二糖磷酸化酶; SoP, β-1,2-寡聚葡聚糖磷酸化酶; THP, 海藻糖磷酸化酶; IPS, 肌醇 1-磷酸合成酶; IMP 肌醇单磷酸酶; GldD, 葡萄糖胺 6-磷酸脱氨酶; GlnP, 葡萄糖胺 6-磷酸磷酸酶. (C) 二氧化碳制糖和淀粉的体外生物合成途径. AOX, 乙醇氧化酶; FLS, 甲酸缩合酶; DhaK, 二羟基丙酮激酶; TPI, 磷酸丙糖异构酶; FSA, 果糖 6-磷酸醛缩酶; PGI, 葡萄糖 6-磷酸异构酶; PGM, 磷酸葡萄糖变位酶.

Fig. 3 Application of *in vitro* biosynthesis in carbohydrate production

(A) Application of coenzyme recycling in the *in vitro* biosynthesis. GI, glucose isomerase; DAE, D-allulose 3-epimerase; RDH, ribitol dehydrogenase; FDH, formate dehydrogenase; GS, galactinol synthase; RS, raffinose synthase, STS, stachyose synthase. (B) Application of thermodynamic driving in the *in vitro* biosynthesis. IA, isoamylase; αGP, α-glucan phosphorylase; PGM, phosphoglucomutase; PGI, phosphoglucose isomerase; API, allulose 6-phosphate isomerase; TPE, tagatose 6-phosphate 4-epimerase; MPI, mannose 6-phosphate isomerase; MIPDH, mannitol 1-phosphate 5-dehydrogenase; FPP, fructose 6-phosphatase; APP, allulose 6-phosphatase; TPP, tagatose 6-phosphatase; MPP, mannose 6-phosphatase; M1P, mannitol 1-phosphatase; αG, α-glucosidase; DSP, disaccharide phosphorylase; CBP, cellobiose phosphorylase; LBP, laminaribiose phosphorylase; SoP, 1,2-β-oligoglucan phosphorylase; THP, trehalose phosphorylase; IPS, inositol 1-phosphate synthase; IMP, inositol monophosphatase; GldD, glucosamine 6-phosphate deaminase; GlnP, glucosamine 6-phosphate phosphatase. (C) In vitro biosynthetic pathways for sugar and starch production from carbon dioxide. AOX, alcohol oxidase; FLS, formolase; DhaK, dihydroxyacetonekinase; TPI, triosephosphateisomerase; FSA, fructose 6-phosphate aldolase; PGI, phosphoglucose isomerase; PGM, phosphoglucomutase.

合成棉子糖和水苏糖等大豆寡糖的体外生物合成体系 (图 3A), 包含蔗糖合成酶 (SUS)、UDP-葡萄糖-4-差向异构酶 (GalE)、玉米肌醇半乳糖苷合成酶 (GS)、棉子糖合成酶 (RS) 和水苏糖合成酶 (STS), 其中四种合成酶均为糖基转移酶。

SUS 主要功能是将蔗糖转化为 UDP-葡萄糖作为大豆寡糖合成中的糖基供体, 同时发挥 UDP 循环再利用的作用, 这种巧妙设计使 UDP 的循环周转数达到 337 次, 显著提高了原子经济性^[109]。

与 D-阿洛酮糖、甘露糖、甘露醇等单糖/糖醇

体外生物合成途径类似，双糖等寡糖分子的合成也可以通过热力学驱动策略进行。Sun等构建了以低成本淀粉为原料高效合成多种高附加值二糖的体外生物合成系统（图3B）。该系统由三种核心酶组成，包括 α -葡聚糖磷酸化酶（ α GP）、 α -葡萄糖苷酶（ α G）以及二糖磷酸化酶（DSP）。首先，淀粉在 α GP和 α G的分别作用下，生成葡萄糖-1-磷酸（G1P）和葡萄糖，然后这两种中间产物在不同类型的DSP催化下缩合形成目标二糖^[110]。DSP对底物具有严格的立体选择性和区域选择性，因此常被用于合成特定结构的二糖类化合物^[111]。该研究通过动力学模型对反应条件进行优化，高效合成了昆布二糖（laminaribiose）、纤维二糖（cellobiose）、海藻糖（trehalose）和异麦芽二糖（sophorose），产率均超过80%。

3.3 多糖的体外生物合成制备案例

淀粉是最重要的储能多糖和粮食资源。2021年，中国科学院天津工业生物技术研究所的科研团队首次报道了在无细胞条件下从二氧化碳合成淀粉分子的多酶催化路线，该人工淀粉体外生物合成体系（Artificial Starch Anabolic Pathway, ASAP）采用化学-酶偶联的策略将CO₂转化为淀粉，基于空间与时间分离控制的模块化组装策略，通过计算机辅助途径设计将整个路径划分为包含11个核心反应步骤的C1模块、C3模块、C6模块和C_n模块（图3C）。淀粉的实验室产率约0.27 mg/h，相当于传统玉米光合作用效率的8.5倍，充分体现了“自下而上”的多糖合成策略优势^[112]。ASAP的重大意义在于证实了可以人工构建出复杂多步的碳同化与聚合途径，绕过植物光合作用直接进行“粮食制造”。除了以CO₂合成淀粉，研究人员还开发了一种以秸秆等农业废弃物为原料的体外生物合成淀粉路径，开辟了从非粮生物质出发实现粮食资源可持续生产的新方向^[113]。

3.4 糖衍生物的体外生物合成制备案例

磷酸化-去磷酸化驱动的体外生物合成体系在糖衍生物的生物合成中也有着广泛的应用（图3B）。You等构建了肌醇的体外生物合成路线，由四种核

心酶和两种辅助酶组成，整个体系无需补加ATP或NAD⁺等辅酶即可将淀粉转化为肌醇，肌醇产率高达98.9%，并在20,000 L反应器中成功放大运行^[83]，体现出体外生物合成系统的原子经济性和可放大性。Li等在肌醇合成模块的基础上，叠加由肌醇氧化酶（MIOX）、尿酸脱氢酶（UDH）和产水型NADH氧化酶（NOX）三种中温酶组成的葡萄糖二酸合成模块以及辅酶再生模块生产葡糖酸二钠，并通过两步温度控制、酶分步添加等策略确保各模块的高效协同和效率最大化，葡糖酸二钠产量高达52.1 g/L，原子利用率可达96.6%^[114]。类似的，Meng等利用体外生物合成技术以麦芽糊精和无机氨为原料成功合成了氨基葡萄糖^[115]。上述研究均构建了磷酸化-去磷酸化驱动的体外多酶级联系统，其中以特异性磷酸酶催化的不可逆去磷酸化反应作为主要热力学驱动力，有效实现了肌醇等糖衍生物的高效合成。该类体系具有转化率高、原子利用率高等显著优势，充分体现了磷酸化-去磷酸化驱动策略在糖质体外生物合成中的通用性与应用潜力。

4 挑战与展望

体外生物合成技术作为一种新兴的无细胞合成平台，凭借其高效的酶催化体系和灵活的路径控制，逐渐成为糖质生物制造的重要选择。与传统的细胞合成体系相比，体外生物合成技术通过多种酶的协同催化，突破了细胞稳态的限制，具备更高的路径可控性、反应效率和原子经济性。本文系统回顾了糖质体外合成技术的核心进展，涵盖新酶挖掘与分子改造、热力学驱动与辅酶循环策略、模块化路径设计以及多酶协同适配机制；总结了体外生物合成在单糖、糖醇、寡糖、多糖及糖衍生物等糖质资源制备中的典型应用，展示了其在廉价资源利用、碳转化效率和工业可扩展性方面的显著优势。

尽管糖质体外生物合成技术已取得显著进展，但目前仍面临诸多重大挑战。首先，体外生物合成体系依赖于多种酶的直接参与，因此，实现高效、低成本的大规模酶制备技术仍是控制成本的关键所在。这不仅要求在酶的表达体系、纯化方

式及固定化技术方面进行优化, 还需要综合考虑宿主菌选择、发酵工艺放大和酶保存运输等多个环节的集成创新。同时, 由于体外生物合成系统需要多种酶在同一体系中协同作用, 一方面需要通过酶工程手段对酶的催化性能(如催化效率、底物特异性、区域选择性)和鲁棒性(如热稳定性、pH耐受性、抗反馈抑制能力等)进行分子改造, 另一方面需要加强反应路径设计的理念, 综合利用模块化设计、时空划分、辅酶再生、化学-酶偶联策略, 以提升整个体外生物合成系统的高效性和原子经济性, 最大限度地提高中间产物的利用率和最终产物的产率。

随着AI技术在生物领域的应用深入, 未来机器学习和深度学习技术将有望成为推动体外生物合成技术持续发展的核心驱动力, 在新酶挖掘改造、反应路径优化、工艺参数预测等方面发挥关键作用。深度学习技术将加速从海量序列与结构数据资源中预测具有特定功能的新酶, 并辅助设计高活性、高稳定性的突变体; AI模型可用于构建代谢网络模型并实现多目标优化, 从而快速筛选原子经济性高、能量利用效率佳的最优反应路径; 通过训练大规模实验数据, 有望实现对酶浓度、温度、pH、底物比例等关键工艺参数的精准预测与智能调控, 提高体系运行效率与可重复性。总之, 随着生物学与化学、计算科学、工程学等学科交叉融合的深入, 体外生物合成技术有望成为强大的糖质生物制造工业级平台。

参 考 文 献

- [1] CAMERON D E, BASHOR C J, COLLINS J J. A brief history of synthetic biology [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(5): 381-390.
- [2] FOLDI J, CONNOLLY J A, TAKANO E, et al. Synthetic biology of natural products engineering: recent advances across the discover-design-build-test-learn cycle [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(9): 2684-2692.
- [3] MENG F, ELLIS T. The second decade of synthetic biology: 2010-2020 [J]. *Nature Communication*, 2020, 11(1): 5174.
- [4] VOIGT C A. Synthetic biology 2020-2030: six commercially-available products that are changing our world [J]. *Nature Communication*, 2020, 11(1): 6379.
- [5] CLAASSENS N J, BURGENER S, VOGELI B, et al. A critical comparison of cellular and cell-free bioproduction systems [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 60: 221-229.
- [6] WU G, YAN Q, JONES J A, et al. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(8): 652-664.
- [7] JUNG S W, YEOM J, PARK J S, et al. Recent advances in tuning the expression and regulation of genes for constructing microbial cell factories [J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 50: 107767.
- [8] RADDE N, MORTENSEN G A, BHAT D, et al. Measuring the burden of hundreds of BioBricks defines an evolutionary limit on constructability in synthetic biology [J]. *Nature Communication*, 2024, 15(1): 6242.
- [9] MAO J, ZHANG H, CHEN Y, et al. Relieving metabolic burden to improve robustness and bioproduction by industrial microorganisms [J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 74: 108401.
- [10] CHUBUKOV V, MUKHOPADHYAY A, PETZOLD C J, et al. Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals [J]. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2016, 2: 16009.
- [11] CORREA G G, LINS MRDCR, SILVA B F, et al. A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis* [J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 326-334.
- [12] BADRI A, WILLIAMS A, AWOFIRANYE A, et al. Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli* [J]. *Nature Communication*, 2021, 12(1): 1389.
- [13] ZHANG Y-HP, ZHU Z, YOU C, et al. *In vitro* BioTransformation (ivBT): definitions, opportunities, and challenges [J]. *Synthetic Biology and Engineering*, 2023, 1(2): 10013.
- [14] WEI X, YANG X, HU C, et al. ATP-free *in vitro* biotransformation of starch-derived maltodextrin into poly-3-hydroxybutyrate via acetyl-CoA [J]. *Nature Communication*, 2024, 15(1): 3267.
- [15] 石婷, 宋展, 宋世怡, 等. 体外生物转化(ivBT):生物制造的新前沿[J]. *合成生物学*, 2024, 5(6): 1437-1460.
SHI T, SONG Z, SONG S, et al. *In vitro* BioTransformation (ivBT): a new frontier of industrial biomanufacturing [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(6): 1437-1460.
- [16] ZHANG Y H. Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: challenges and opportunities [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105(4): 663-677.
- [17] QIN Y, LI Q, FAN L, et al. Biomanufacturing by *in vitro* Biotransformation (ivBT) using purified cascade multi-enzymes [J]. *Advances in Biochemical Engineering-*

- Biotechnology, 2023, 186: 1-27.
- [18] ZHANG P, WANG J, DING X, et al. Exploration of the tolerance ability of a cell-free biosynthesis system to toxic substances [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(4): 1096-1107.
- [19] YOU C, CHEN H, 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.
- [20] DESVAUX M, GUEDON E, PETITDEMANGE H. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2461-2470.
- [21] PERSSON O, VALADI A, NYSTROM T, et al. Metabolic control of the *Escherichia coli* universal stress protein response through fructose-6-phosphate [J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(4): 968-978.
- [22] RICHARDS G R, PATEL M V, LLOYD C R, et al. Depletion of glycolytic intermediates plays a key role in glucose-phosphate stress in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(21): 4816-4825.
- [23] XING M N, ZHANG X Z, HUANG H. Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(4): 920-929.
- [24] HON J, BORKO S, STOURAC J, et al. EnzymeMiner: automated mining of soluble enzymes with diverse structures, catalytic properties and stabilities [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(W1): W104-W109.
- [25] JIA B, HAN X, KIM K H, et al. Discovery and mining of enzymes from the human gut microbiome [J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40(2): 240-254.
- [26] JOHNSON M, ZARETSKAYA I, RAYTSELIS Y, et al. NCBI BLAST: a better web interface [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(Web Server issue): W5-9.
- [27] UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [28] BLUM M, CHANG H Y, CHUGURANSKY S, et al. The InterPro protein families and domains database: 20 years on [J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D344-D354.
- [29] DUMORNE K, CORDOVA D C, ASTORGA-ELO M, et al. Extremozymes: a potential source for industrial applications [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(4): 649-659.
- [30] LI L, LIU X, BAI Y, et al. High-throughput screening techniques for the selection of thermostable enzymes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(8): 3833-3845.
- [31] WANG Y, LI W, WANG D, et al. Screening and characterization of thermostable xylose isomerase from *Rhodothermus marinus* for erythrose production from one-carbon source [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2025, 186: 110607.
- [32] GERLT J A, BOUVIER J T, DAVIDSON D B, et al. Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): A web tool for generating protein sequence similarity networks [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1854(8): 1019-1037.
- [33] BURROUGHS A M, ALLEN K N, DUNAWAY-MARIANO D, et al. Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes [J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 361(5): 1003-1034.
- [34] LI Y, SHI T, HAN 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.
- [35] MAK W S, TRAN S, MARCHESCHI R, et al. Integrative genomic mining for enzyme function to enable engineering of a non-natural biosynthetic pathway [J]. Nature Communication, 2015, 6: 10005.
- [36] SONG Y, DIMAIO F, WANG R Y, et al. High-resolution comparative modeling with RosettaCM [J]. Structure, 2013, 21(10): 1735-1742.
- [37] MILLER B R III, MCGEE T D, SWAILS J M, et al. MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations [J]. Journal of chemical theory and computation, 2012, 8(9): 3314-3321.
- [38] BONETTA R, VALENTINO G. Machine learning techniques for protein function prediction [J]. Proteins, 2020, 88(3): 397-413.
- [39] WANG Y, HAN S, WANG Y, et al. Artificial intelligence technology assists enzyme prediction and rational design [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(12): 7065-7073.
- [40] YU T, CUI H, LI J C, et al. Enzyme function prediction using contrastive learning [J]. Science, 2023, 379(6639): 1358-1363.
- [41] BOULAHROUF K, ALIOUANE S E, CHEHILI H, et al. EZYDeep: a deep learning tool for enzyme function prediction based on sequence information [J]. The Open Bioinformatics Journal, 2023, 16(1): 1-8.
- [42] TAN Q, XIAO J, CHEN J, et al. ifDEEPre: large protein language-based deep learning enables interpretable and fast predictions of enzyme commission numbers [J]. Briefings in Bioinformatics, 2024, 25(4): bbae225.
- [43] REETZ M T, SUN Z, QU G. Enzyme engineering: selective catalysts for applications in biotechnology, organic chemistry, and life science [M]. John Wiley & Sons, 2023.

- [44] VICTORINO I, GONSALES N, ANTONIO F, et al. Enzyme engineering and its industrial applications [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(2): 389-409.
- [45] MAZURENKO S, PROKOP Z, DAMBORSKY J. Machine learning in enzyme engineering [J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(2): 1210-1223.
- [46] SONG Z, ZHANG Q, WU W, et al. Rational design of enzyme activity and enantioselectivity [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11:1129149.
- [47] CHICA R A, DOUCET N, PELLETIER J N. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(4): 378-384.
- [48] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [49] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 [J]. *Nature*, 2024, 630(8016): 493-500.
- [50] SOUSA S F, FERNANDES P A, RAMOS M J. Protein-ligand docking: current status and future challenges [J]. *Proteins*, 2006, 65(1):15-26.
- [51] YANG C, CHEN E A, ZHANG Y. Protein-ligand docking in the machine-learning era [J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4568.
- [52] VAN DER SPOEL D, LINDAHL E, HESS B, et al. GROMACS: fast, flexible, and free [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26(16):1701-1718.
- [53] LEE T S, ALLEN B K, GIESE T J, et al. Alchemical binding free energy calculations in AMBER20: advances and best practices for drug discovery [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2020, 60(11): 5595-5623.
- [54] TIAN C, YANG J, LIU C, et al. Engineering substrate specificity of HAD phosphatases and multienzyme systems development for the thermodynamic-driven manufacturing sugars [J]. *Nature Communication*, 2022, 13(1): 3582.
- [55] ZHANG T, LIU P, WEI H, et al. Protein engineering of glucosylglycerol phosphorylase facilitating efficient and highly regio- and stereoselective glycosylation of polyols in a synthetic system [J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(24): 15715-15727.
- [56] ROMERO P A, ARNOLD F H. Exploring protein fitness landscapes by directed evolution [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(12): 866-876.
- [57] COPP J N, HANSON-MANFUL P, ACKERLEY D F, et al. Error-prone PCR and effective generation of gene variant libraries for directed evolution [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1179: 3-22.
- [58] 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.
- [59] MA C, LIU M, YOU C, et al. Engineering a diaphorase via directed evolution for enzymatic biofuel cell application [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2020, 7: 23.
- [60] ZHOU W, HUANG R, ZHU Z, 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.
- [61] ZHU Y, CHEN P, DONG Q, et al. Protein engineering of transaminase facilitating enzyme cascade reaction for the biosynthesis of azasugars [J]. *iScience*, 2024, 27(3): 109034.
- [62] YANG K K, WU Z, ARNOLD F H. Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(8): 687-694.
- [63] SUMIDA K H, NUNEZ-FRANCO R, KALVET I, et al. Improving protein expression, stability, and function with ProteinMPNN [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(3): 2054-2061.
- [64] BIAN J, TAN P, NIE T, et al. Optimizing enzyme thermostability by combining multiple mutations using protein language model [J]. *mLife*, 2024, 3(4): 492-504.
- [65] REUTEN R, NIKODEMUS D, OLIVEIRA M B, et al. Maltose-Binding Protein (MBP), a secretion-enhancing tag for mammalian protein expression systems [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152386.
- [66] GUERRERO F, CIRAGAN A, IWAI H. Tandem SUMO fusion vectors for improving soluble protein expression and purification [J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 116: 42-49.
- [67] REBAY I, FEHON R G. Preparation of soluble GST fusion proteins [J]. *Cold Spring Harb Protocols*, 2009, 2009(11): pdb.prot4996.
- [68] XIE X, WU P, HUANG X, et al. Retro-protein XXA is a remarkable solubilizing fusion tag for inclusion bodies [J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 1(1):51.
- [69] NGUYEN T K M, KI M R, SON R G, et al. The NT11, a novel fusion tag for enhancing protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(5): 2205-2216.
- [70] DE MARCO A. Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli* [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(10): 2632-2639.
- [71] DING Z, GUAN F, XU G, et al. MPEPE, a predictive approach to improve protein expression in *E. coli* based on deep learning [J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 1142-1153.
- [72] KHADYE V S, SAWANT S, SHAIKH K, et al. Optimal

- secretion of thermostable β -glucosidase in *Bacillus subtilis* by signal peptide optimization [J]. Protein Expression and Purification, 2021, 182: 105843.
- [73] PAN Y, YANG J, WU J, et al. Current advances of *Pichia pastoris* as cell factories for production of recombinant proteins [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1059777.
- [74] INAN M, ARYASOMAYAJULA D, SINHA J, et al. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 93(4): 771-778.
- [75] 张以恒, 陈雪梅, 石婷. 生物制造的市本率(PC值):定义与应用[J]. 合成生物学, 2025, 6(1): 8-17.
ZHANG Y H, CHEN X, SHI T. Price to Cost-of-raw-materials Ratio (PC) of biomanufacturing: definition and application [J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(1): 8-17.
- [76] BEBER M E, GOLLUB M G, MOZAFFARI D, et al. eQuilibrator 3.0: a database solution for thermodynamic constant estimation [J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D603-D609.
- [77] GAO J, MA S, MAJOR D T, et al. Mechanisms and free energies of enzymatic reactions [J]. Chemical Reviews, 2006, 106(8): 3188-3209.
- [78] YANG J, ZHANG T, TIAN C, et al. Multi-enzyme systems and recombinant cells for synthesis of valuable saccharides: advances and perspectives [J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(7): 107406.
- [79] WEN L, HUANG K, WEI M, et al. Facile enzymatic synthesis of ketoses [J]. Angewandte Chemie-international Edition, 2015, 54(43):12654-12658.
- [80] ANDEXER J N, RICHTER M. Emerging enzymes for ATP regeneration in biocatalytic processes [J]. Chembiochem, 2015, 16(3): 380-386.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] YOU C, SHI T, LI Y, 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.
- [84] 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.
- [85] WANG W, LIU M, 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.
- [86] ZHU Y, LI H, LIU P, et al. Construction of allitol synthesis pathway by multi-enzyme coexpression in *Escherichia coli* and its application in allitol production [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(5): 661-669.
- [87] SATOH Y, TAJIMA K, TANNAI H, et al. Enzyme-catalyzed poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from acetate with CoA recycling and NADPH regeneration *in Vitro* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(4): 335-341.
- [88] RELYEA H A, VAN DER DONK W A. Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase [J]. Bioorganic Chemistry, 2005, 33(3): 171-189.
- [89] ZHAO H, VAN DER DONK W A. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14(6): 583-589.
- [90] LI J, MU S, YANG J, et al. Glycosyltransferase engineering and multi-glycosylation routes development facilitating synthesis of high-intensity sweetener mogrosides [J]. iScience, 2022, 25(10): 105222.
- [91] BAULER P, HUBER G, LEYH T, et al. Channeling by proximity: the catalytic advantages of active site colocalization using brownian dynamics [J]. Journal of Physical Chemistry Letters, 2010, 1(9): 1332-1335.
- [92] FAN L, WANG Y, TUYISHIME P, et al. Engineering artificial fusion proteins for enhanced methanol bioconversion [J]. Chembiochem, 2018, 19(23): 2465-2471.
- [93] TIAN J, JIA R, WENGE D, et al. One-step purification and immobilization of recombinant proteins using SpyTag/SpyCatcher chemistry [J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(5): 1075-1087.
- [94] STAHL S W, NASH M A, FRIED D B, et al. Single-molecule dissection of the high-affinity cohesin-dockerin complex [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(50): 20431-20436.
- [95] SUN X, ZHANG T, LIU Y, et al. Self-assembled multienzyme complex facilitates synthesis of glucosylglycerol from maltodextrin and glycerol [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(1): 266-272.
- [96] HAN P, ZHOU X, YOU C. Efficient multi-enzymes immobilized on porous microspheres for producing inositol from starch [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 380.
- [97] HAN P, YOU C, LI Y, 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.
- [98] YANG J, SONG W, CAI T, et al. De novo artificial synthesis of hexoses from carbon dioxide [J]. Science Bulletin (Beijing),

- 2023, 68(20): 2370-2381.
- [99] WANG L, DASH S, NG C Y, et al. A review of computational tools for design and reconstruction of metabolic pathways [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(4): 243-252.
- [100] JANG W D, KIM G B, KIM Y, et al. Applications of artificial intelligence to enzyme and pathway design for metabolic engineering [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 73: 101-107.
- [101] WEI F, CAI J, MAO Y, et al. Unveiling metabolic engineering strategies by quantitative heterologous pathway design [J]. *Advanced Science*, 2024, 11(45): e2404632.
- [102] IZUMORI K. Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124(4): 717-722.
- [103] MEN Y, ZHU P, ZHU Y, et al. The development of low-calorie sugar and functional jujube food using biological transformation and fermentation coupling technology [J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(4): 1302-1310.
- [104] MEN Y, ZHU Y, ZENG Y, et al. Co-expression of D-glucose isomerase and D-psicose 3-epimerase: development of an efficient one-step production of D-psicose [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 64-65: 1-5.
- [105] ZHU P, ZENG Y, CHEN P, et al. A one-pot two-enzyme system on the production of high value-added D-allulose from Jerusalem artichoke tubers [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 88: 90-96.
- [106] WEI X, LI Q, HU C, et al. An ATP-free *in vitro* synthetic enzymatic biosystem facilitating one-pot stoichiometric conversion of starch to mannitol [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(5):1913-1924.
- [107] YAN J, CHEN P, ZENG Y, et al. Production of neoagarobiose from agar through a dual-enzyme and two-stage hydrolysis strategy [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 160: 288-295.
- [108] ALI M Y, LIAQAT F, KHAZI M I, et al. Utilization of glycosyltransferases as a seamless tool for synthesis and modification of the oligosaccharides-A review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 249: 125916.
- [109] TIAN C, YANG J, ZENG Y, et al. Biosynthesis of raffinose and stachyose from sucrose via an *in vitro* multienzyme system [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(2): e02306-18.
- [110] SUN S, WEI X, ZHOU X, et al. Construction of an artificial *in vitro* synthetic enzymatic platform for upgrading low-cost starch to value-added disaccharides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(1): 302-314.
- [111] SUN S, YOU C. Disaccharide phosphorylases: Structure, catalytic mechanisms and directed evolution [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 6(1): 23-31.
- [112] CAI T, SUN H, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide [J]. *Science*, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [113] XU 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.
- [114] LI Y, YOU C, ZHANG YH. *In vitro* biotransformation of high-titer D-glucarate by stepwise-added enzyme cocktails [J]. *Organic Process Research & Development*, 2024, 28(2): 478-486.
- [115] MENG D, WEI X, 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.



通讯作者: 孙媛霞(1963—),女,博士,研究员。研究方向为糖生物学、糖工程与酶工程,建立了功能糖类及其衍生物的绿色生物制造技术。

E-mail: sun_yx@tib.cas.cn



第一作者: 朱玥明(1982—),男,博士,副研究员。研究方向为酶工程、微生物代谢工程。

E-mail: zhu_ym@tib.cas.cn