

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-054

基于体外合成生物学的健康糖生物制造新技术与产业化进展

石婷^{1,2}, 陈雪梅², 张以恒^{1,2}

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

摘要: 随着全球健康意识的提升, 消费者对低热量、功能性的天然糖(简称健康糖)需求增长。酶催化与体外生物转化(*in vitro* BioTransformation, ivBT)是健康糖的工业生物制造的两大平台技术。酶法生产果葡糖浆的商业化成功开启淀粉糖产业, 随后 Izumoring 策略推动酶法生产稀有糖, 但受原料依赖、转化率低、分离成本高、辅酶循环利用等因素使该策略难以大规模生产健康糖(如D-塔格糖、L-阿拉伯糖)。基于 ivBT 平台, 我们开发了首个非天然戊单糖4-差向异构酶, 实现D型与L型戊糖的直接转换, 无需经过糖醇中间体, 打通D-木糖向L-阿拉伯糖转化新路径; 淀粉制肌醇已成功实现产业化, 验证了 Zhang 策略(“无ATP磷酸化-异构-脱磷酸”策略)的生物制造优势, 该策略拓展至廉价多糖原料合成D-塔格糖、D-阿洛酮糖、D-甘露糖等健康糖; “二氧化碳合成糖类”技术突破了植物光合作用的能效低与速度慢的瓶颈, 为以第三代原料合成健康糖及其衍生物开辟新途径。ivBT平台取得了系列突破性进展, 有望为开发“低成本、高可及性、高功能性”的健康糖提供核心支撑, 引领甜味剂产业的新变革。

关键词: 体外生物转化(ivBT); 健康糖; Izumoring; D型-L型糖异构酶; Zhang策略(“无ATP磷酸化-异构-脱磷酸”策略)

中图分类号: Q81 文献标志码: A

New technologies and industrialization progress in healthy sugar biomanufacturing based on *in vitro* synthetic biology

SHI Ting^{1,2}, CHEN Xuemei², ZHANG Yi-Heng P. Job^{1,2}

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

Abstract: With the increasing global awareness of health, the demand for natural sugars that are low in calories, have

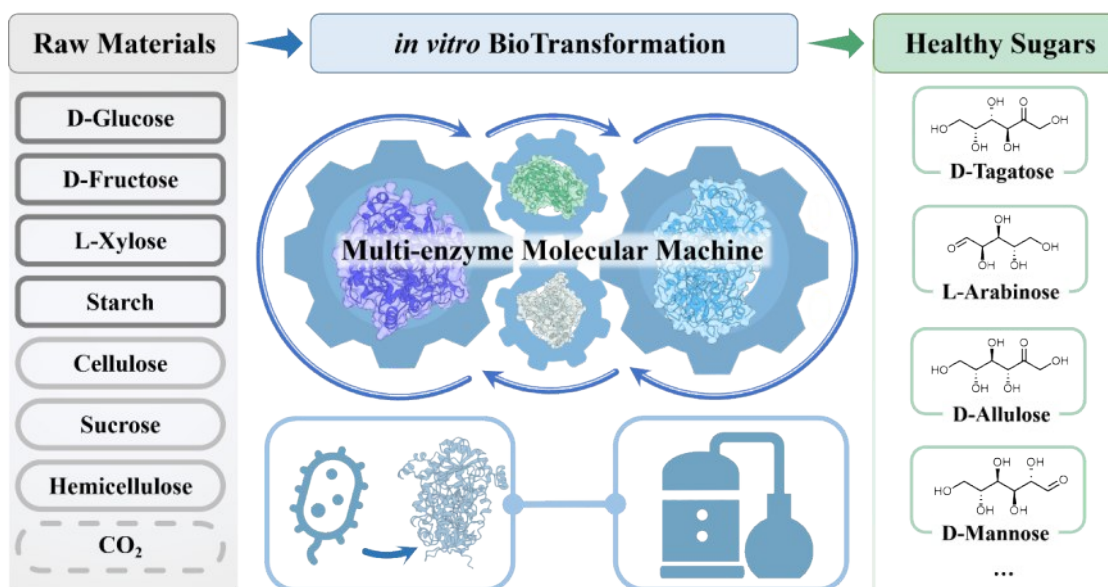
收稿日期: 2025-06-04 修回日期: 2025-08-05

基金项目: 科技部重点专项(2022YFA0912300); 国家自然科学基金面上项目(NSFC32271544); 合成生物学海河实验室颠覆性创新项目(22HHSWS000155); 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, 陈雪梅, 张以恒. 基于体外合成生物学的健康糖生物制造新技术与产业化进展[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-054

Citation: SHI Ting, CHEN Xuemei, ZHANG Yi-Heng P. Job. New technologies and industrialization progress in healthy sugar biomanufacturing based on *in vitro* synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-054

wonderful sweetness and healthful functions continues to grow. However, the traditional sugar industry faces significant constraints related to health concerns, cost, and scalability. Enzymatic biocatalysis and *in vitro* BioTransformation (ivBT) are two pivotal technological platforms in biomanufacturing, playing an increasingly vital role in biomanufacturing of healthy sugars. The successful commercialization of high-fructose corn syrup opened the door of the starchy sweetener industry. Later, the Izumoring strategy opened the door to the rare sugars industry that is based on by enzymatic isomerization and oxidization-reduction of sugars. However, the key products made by the Izumoring strategy suffer from high reliance on limited feedstocks, low product yields due to equilibria of isomerization, high separation costs, and/or the use of costly NAD(P) for the oxidization-reduction of sugars. Based on the ivBT platform, we have developed the first new-to-nature pentose 4-epimerase, enabling the direct conversion of D-type to L-type pentoses without sugar alcohol intermediates, thereby establishing an innovative route for the biotransformation of D-xylose to L-arabinose. The successful industrial-scale production of *myo*-inositol from starch has validated the biomanufacturing advantages of Zhang strategy ("ATP-free Phosphorylation-Isomerization-Dephosphorylation" strategy) as applied to ivBT. This approach has since been extended to the synthesis of a few healthy sugars, such as D-tagatose, D-allulose, and D-mannose, from abundant polysaccharides including starch, cellulose, and sucrose, showing great potential for industrial application. Furthermore, the "carbon dioxide to sugar" ivBT platform overcomes the low energy efficiency and slow productivity bottlenecks of natural plant photosynthesis, opening up a new door for the synthesis of healthy sugars from the third-generation feedstock of CO₂. This ivBT platform has achieved multiple breakthroughs, such as the reconstruction of artificial enzymatic pathways for the biosynthesis of healthy sugars, low-cost biomanufacturing of multi-enzyme molecular machines equipped with thermostable enzyme bricks, great compatibility of multi-enzyme co-immobilization for prolonging enzyme life-time, promotion of the PE value (Product-to-Enzyme Weight Ratio) of multi-enzyme molecular machines, and low-cost separation and purification of healthy sugars. As a disruptive innovation in biomanufacturing, ivBT motivates the rapid development in the biomanufacturing of "affordable, accessible, and effective" healthy sugars and holds promise to drive a new wave of transformation in the sweetener industry.



Keywords: *in vitro* BioTransformation (ivBT); Healthy sugars; Izumoring; D-type-L-type sugar epimerase; Zhang strategy (ATP-free Phosphorylation-Isomerization-Dephosphorylation)

1 引言

甜味剂 (Sweeteners) 是指赋予食品以甜味, 提高食品品质, 满足人们甜味需求的食品添加剂, 在食品工业发展中扮演着至关重要的作用^[1]。2024年全球食品甜味剂市场规模达到1025亿美元, 预计2032年将达到1449亿美元^[2]。甜味剂市场以蔗糖消费为主, 淀粉糖为辅, 分别占据85%和10%的市场份额。与此同时, 世界卫生组织的流行病学数据揭示了严峻的健康挑战: 39%的成年人(约19亿)超重, 9%(约5.37亿)患有糖尿病。随着国内外健康政策与消费观念冲击, 消费者对低热量甜味剂需求呈指数级增长, 全球甜味剂产品的发展围绕“口味性”与“健康性”不断迭代升级^[3]。低热量天然甜味剂生产技术的创新对于保障国家食糖供应与安全, 实施健康中国战略具有重大意义^[4, 5]。

蔗糖与果葡糖浆口味完美。蔗糖是甜味剂的金标准, 价格低廉(中国市场约6000元/吨), 中国年产蔗糖大约1000万吨, 但是国内食糖年消费量约1500万吨, 仍需进口补足缺口。科学研究发现蔗糖具有较高升糖指数(GI=65), 过量摄入加重肝脏负担, 引发肥胖、糖尿病、心血管病、老年痴呆等疾病风险, WHO建议蔗糖每日摄入量不超过25克^[6]。果葡糖浆的口味好, 甜度高(果糖含量42%时甜度接近蔗糖), 是第二大甜味剂, 中国年产果葡糖浆约400万吨, 其成本比蔗糖低约30%, 且生产工艺简单, 替代效应强。但果糖代谢途径易引发肝脏脂肪堆积, 过量摄入增加非酒精性脂肪肝病风险、心血管疾病、糖尿病、肥胖^[7]。

人工高倍甜味剂、糖醇、天然代糖能够提供甜味, 热量低, 有利于控制能量摄入, 降低龋齿发生风险, 为高血糖人群及糖尿病患者提供更丰富的食物选择^[8], 但是它们缺乏食物填充性, 没有美拉德反应, 不具备益生功能, 无法促进益生菌的生长代谢。另外, 人工高倍甜味剂(如三氯蔗糖、阿斯巴甜)与糖醇(如木糖醇、赤藓糖醇等)的安全性也存在争议。基于Cohort团队对105588名参与者的9.1年随访结果显示, 与非消费者相比, 阿斯巴甜、安赛蜜和三氯蔗糖长期过量摄入的消费者(摄入量>16.4 mg/d(男), 18.5 mg/d

(女))患2型糖尿病风险高69%^[9]。伦敦弗朗西斯克里克研究所团队通过小鼠实验研究发现, 三氯蔗糖可能是T细胞介导反应的负调节剂, 大量摄入三氯蔗糖会影响小鼠的免疫系统^[10]。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)评估阿斯巴甜每日耐受量为40 mg/kg^[11]。山东大学齐鲁医院团队联合瑞典卡罗林斯卡学院团队通过小鼠实验发现, 长期摄入阿斯巴甜会加剧动脉粥样硬化的发生^[12]。美国克利夫兰诊所Hazen团队针对来自美国(n=2149)和欧洲(n=833)的两个队列的研究揭示, 赤藓糖醇能够促进血小板的聚集, 使得心血管事件(如心梗、中风)的风险显著增加^[13, 14]。此外, 赤藓糖醇在肠道中无法完全吸收, 过量摄入可能导致腹胀、腹泻等胃肠道不适症状。

甜味剂产业正经历深刻变革。选甜味剂逻辑从单一的“甜味剂”功能演进为兼顾口味性、健康性与普惠性的系统性综合评估。酶催化与体外生物转化(*in vitro* BioTransformation, ivBT)是生物制造的两大关键技术平台, 将为开发“低成本、高可及性、高功能性”的健康糖提供技术支撑, 引领甜味剂产业的新变革。

2 健康糖的产业现状

健康糖是一个相对模糊的概念, 通常指那些具有一定健康益处或对健康影响较小的天然糖(单糖为主的碳水化合物), 包括D-塔格糖、D-阿洛酮糖、D-甘露糖、D-木糖、L-阿拉伯糖等, 其口味性好、有健康功能, 但价格偏高导致普惠性较差。D-塔格糖是天然存在的一种稀少糖, 口感纯正与蔗糖极为近似, 甜度是蔗糖的92%, 具有比蔗糖、葡萄糖和果糖有更强的还原能力, 能够发生更强的美拉德反应。D-塔格糖具有广泛的生理益处, 包括低热量值、低GI值, 无龋齿性, 作为益生元能改善肠道健康, 有助于控制血糖水平, 控制肥胖, 抗氧化等优良营养特性^[15]。2001年, D-塔格糖被美国食品药品监督管理局(FDA)认定为“公认安全”(GRAS, Generally Recognized As Safe)食品成分, 随后也在韩国、欧洲、澳大利亚、新西兰等陆续获批为食品成分, 2014年在

中国获批为新食品原料。D-塔格糖传统生产方法以乳糖或半乳糖为原料合成，受原料供给和制造方法成本限制，其市场价格昂贵且产量规模较小。

L-阿拉伯糖是零卡路里的天然糖，甜度是蔗糖50%，被誉为“蔗糖伴侣”或“蔗糖中和剂”，在蔗糖中添加3.5%-5%的L-阿拉伯糖，可显著抑制人体小肠蔗糖酶活性，减少人体对蔗糖的吸收，减缓血糖快速升高^[16-18]。未被利用的L-阿拉伯糖进入结肠，作为益生元能够增殖肠道中双歧杆菌、嗜黏蛋白阿克曼菌（AKK菌）等有益菌群，促进肠道蠕动，被FDA列为“膳食纤维”^[19, 20]。L-阿拉伯糖在预防糖尿病、预防肥胖和稳定血糖等方面具有重要意义^[21-23]，在食品和饮料、医药和保健品等领域具有广阔的应用前景。美国FDA已批准L-阿拉伯糖作为GRAS食品成分，其食用安全性经过严格评估且添加量没有限制；日本厚生省已批准L-阿拉伯糖作为特定保健用食品添加剂；2008年，我国已批准L-阿拉伯糖作为新食品原料。L-阿拉伯糖的现有生产工艺是植物提取法，以玉米芯、玉米皮等禾本科植物纤维或阿拉伯树胶为原料，经稀酸水解、脱色、脱酸、生物发酵、分离净化、结晶、干燥得到，是生产D-木糖的副产物。该工艺主要问题一是产量规模小，玉米芯、阿拉伯胶等原料利用受制于主产品木糖已饱和的市场需求；问题二是成本高，原因是原料含量低，50吨原料才能产1吨L-阿拉伯糖，产品成分复杂，需要使用色谱分离等复杂的手段，且分离损失大，10-20吨木糖才能分离出1吨L-阿拉伯糖；问题三是不环保，存在严重的污染问题。基于ivBT平台可创制全新人工合成途径，以市场供应充足的D-木糖为原料生物催化合成L-阿拉伯糖，得以从源头上突破上述问题。

D-阿洛酮糖是D-果糖的C-3差向异构体，与糖醇相比具备三个优势：（1）甜度细致柔和，接近蔗糖（约为蔗糖甜度的70%），与蔗糖相比热量更低（0.4 kcal/g）^[24]；（2）高温和酸性环境下均有较强的稳定性，可产生美拉德反应，应用于烘焙产品、调味品、低pH值的食品饮料中^[25]；（3）不会被人体代谢，且具备降血糖、抑制癌变、抗炎等生理功效^[26, 27]。截止目前，D-阿洛酮糖已在全球多个国家被批准为食品成分，包括日本、墨西

哥、加拿大、韩国、美国、澳大利亚和新西兰等，其中美国是首个批准D-阿洛酮糖合规使用的国家。2020年11月18日国家卫健委首次受理D-阿洛酮糖作为新食品原料的申报，2025年3月21日，国家卫健委启动D-阿洛酮糖新食品原料行政许可征求意见，2025年7月2日，国家卫健委发布新食品原料公告行政许可，批准阿洛酮糖作为新食品原料。根据与淀粉糖行业生产企业交流获悉，D-阿洛酮糖中国现有产能约3.4万吨，潜在规划产能超28万吨，国内外具备D-阿洛酮糖千吨产能的公司主要包括韩国CJ、韩国Samyang、英国泰莱、日本松古化学、保龄宝、中大恒源、广业清怡、百龙创园、金禾实业、华康药业、三元生物等。

3 基于体外合成生物学的健康糖生物制造

体外合成生物学包括两个技术平台，分别是酶催化与体外生物转化（ivBT）。其中，酶催化是指由酶分子催化的化学反应，如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）辅酶等重构非天然生化途径，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，尤其是生产健康糖、低值大宗产品与新能源产品等。ivBT是级联酶催化（cascade enzyme biocatalysis, CEB）的进一步发展，与CEB的目标产品、途径设计原则、系统组成酶元件性质要求及反应过程均不同，更适合作为大宗产品的新生物制造平台^[28, 29]。

淀粉制肌醇（*myo*-Inositol）技术的产业化验证了ivBT产业化能力。肌醇是维生素B8，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^[30-32]。传统的肌醇生产方法是植物提取法，从玉米浸出物中提取菲汀，通过高温高压酸水解制备，生产过程中有着产生高含磷废水，排放恶臭污染，能耗高、提取率低、生产成本高等问题。2014年，张以恒教授设计了以淀

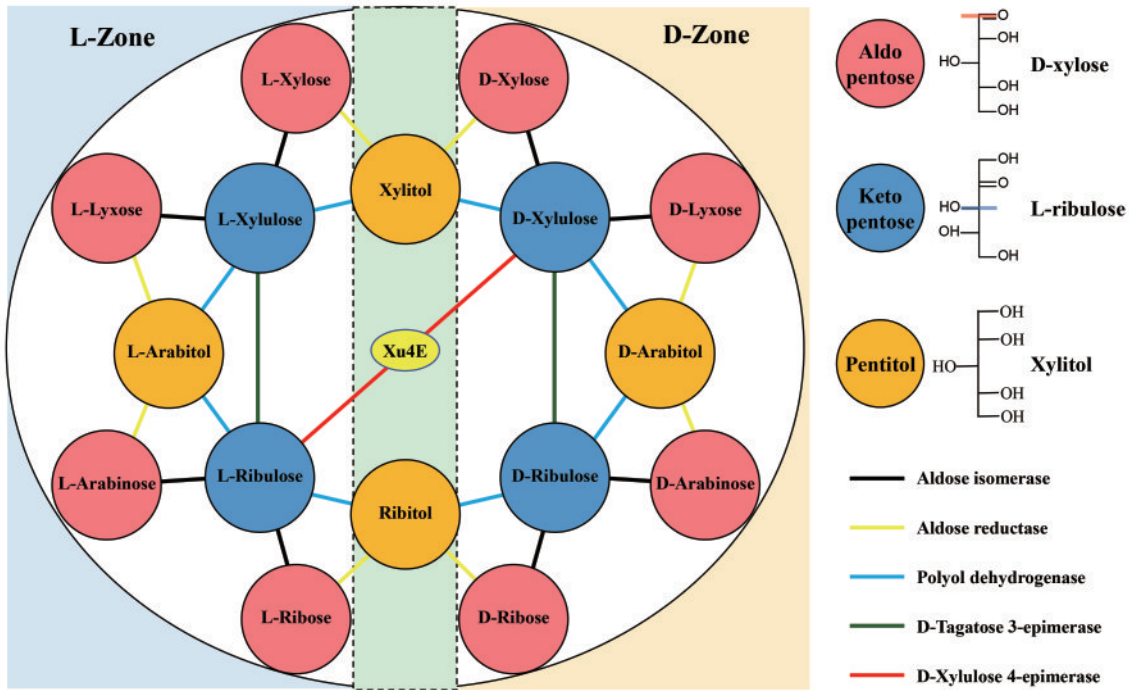


图2 更新的戊糖 Izumoring 策略

(增加D-木酮糖4-差向异构酶催化D-木酮糖合成L-核酮糖)

Fig. 2 Updated Izumoring strategy for pentoses

(Add D-xylulose 4-epimerase to catalyze the synthesis of L-ribulose from D-xylulose)

学秦慧民教授^[42]等通过挖掘和改造不同来源的DAE,大幅提高了酶活性和热稳定性^[37]。然而,游离酶无法满足连续工业催化反应的需求,导致D-阿洛酮糖生产成本较高。通过开发DAE酶固定化技术,使得固定化DAE酶可以在生物制造过程中重复使用,进一步降低生物制造成本^[43-47]。与此同时,在D-阿洛酮糖工业化生产中,由于酶促异构反应平衡转化率较低(大约30%),需要使用色谱分离产物和底物,循环使用果糖提高综合得率。

基于Izumoring策略,以D-半乳糖为原料,通过D-阿拉伯糖异构酶(AI)异构可以得到D-塔格糖,如来源*Geobacillus thermodenitrificans*的AI异构催化,在20小时内即可获得最高浓度为158 g/L的D-塔格糖,体积产率为7.9 g/L/h^[48]。超越Izumoring策略,来自*Thermotoga petrophila*的塔格糖酸3-差向异构酶(EC 5.1.2.7)被发现具有很弱的D-果糖-4-差向异构酶活性(图1),并通过定向进化提高了其在D-果糖上的特异性活性达到0.12 U/mg^[49]。2024年,沐万孟教授及其团队利用人工智能技术,发现了来自*Thermoprotei archaea*

的一种耐热塔格糖4-差向异构酶,展现出了优异的活性(1.73 U/mg)和热稳定性(80 °C下半衰期为198小时)^[50]。截至目前,韩国CJ公司在果糖异构合成塔格糖技术方面已申请专利170件,涉及24个专利族,目标市场区域包括中国、美国、日本、韩国、欧洲、巴西、墨西哥等。酶异构法生产D-塔格糖普遍存在平衡常数低、原料乳糖来源有限且价格昂贵,果糖4-差向异构酶活性极低需要高酶用量、以及需要利用色谱复杂的分离工艺等问题,导致D-塔格糖生产技术尚未实现大规模产业化与广泛应用^[15]。

酶促异构法在稀有糖生物制造中的主要挑战包括:(1)原料如D-半乳糖、D-木糖等的来源有限,且价格昂贵,难以大规模生产,需要寻找更廉价原料及新的异构途径;(2)异构酶催化受到化学反应平衡常数的限制,导致单步酶催化产物转化率低,需要将目标产物与底物进行分离,显著提高生产成本;(3)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。

3.2 新型D-L型糖差向异构酶的应用

Izumoring 策略必须通过糖醇才能实现D-型糖与L-型糖的互相转化（图1，图2）。超越Izumoring 策略，张以恒教授开发了第一个非天然戊单糖4-差向异构酶（图2），能将D-型糖直接转化为L-型糖，无需经过糖醇，不需要NAD(P)辅酶。自然界没有戊单糖4-差向异构酶，张教授探索利用自然界中一些酶的混杂活性进行定向进化，获得具有高效、定向催化D, L-型糖异构功能的戊单糖4-差向异构酶^[51, 52]：首先，根据底物结构的相似性及酶催化机理，筛选获得了源自海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 的塔格糖酮酸-果糖酮酸3-差向异构酶（Tagaturonate-Fructuronate 3-Epimerase）^[53]，其对D-木酮糖存在混杂活性；在此基础上，通过酶定向进化获得高效催化D-木酮糖的D-木酮糖4-差向异构酶（D-Xylulose 4-Epimerase, Xu4E），这是首个能够催化L-型糖（L-核酮糖）与D-型糖（D-木酮糖）直接发生异构反应的非天然酶。

D-木糖是自然界最丰富的戊单糖，是木质纤维素的重要组成部分，主要用于生产木糖醇，人体大量服用木糖醇可能引起腹部不适、渗透性腹泻^[54, 55]。基于人工新酶Xu4E，张教授进一步设计了一条全新人工途径，对D-木糖原料进行高值利用，以三种酶（D-木糖异构酶、Xu4E、AI）催化，经D-木酮糖、L-核酮糖转化合成L-阿拉伯糖，该反应不需要添加辅酶，可以克服Izumoring方法的不足（Izumoring途径需要四步酶催化，其中醛糖还原酶、氧化还原酶参与的反应需添加昂贵的

辅因子NAD(P))，开辟了从D-木糖高效率生产高值产品L-阿拉伯糖的新途径（图3）。

通过将人工创制的D-木酮糖4-差向异构酶（Xu4E）与其他酶元件偶联，可构建更多高效的体外合成途径，以丰富的D-木糖原料作为起始底物，催化生成L-阿拉伯糖、L-核糖、L-木酮糖等一系列功能性稀有戊糖。这一创新突破不仅为稀有戊糖的大规模生物制造开拓了新策略，也为稀有己糖及其他功能性糖类的工业化生产带来新契机。

3.3 Zhang策略合成健康糖

淀粉产肌醇合成途径设计十分巧妙，其利用酶催化多糖生成葡萄糖6-磷酸（“无ATP磷酸化”模块），不依赖辅酶参与的磷酸糖异构化（“异构”模块），可实现高度选择性的脱磷酸反应（“脱磷酸”模块），整个途径自由能为负值，由特异性的脱磷酸不可逆反应推动原料100%转化为产物，可归纳为Zhang策略（“无ATP磷酸化-异构-脱磷酸”策略）在ivBT中的应用。该策略可拓展到多种己单糖合成，如以淀粉、纤维素、蔗糖等大宗廉价原料合成D-塔格糖、D-阿洛酮糖、D-甘露糖等^[15, 56-58]（图4），这些无ATP、无NAD⁺的多酶分子机器为健康糖的大规模工业生产提供了高效且经济的解决方案。

以塔格糖作为健康糖的代表性案例（表1）。Wichelecki博士发现第一个来自 *Agrobacterium tumefaciens* 的塔格糖6-磷酸差向异构酶^[59]，可以催化塔格糖6-磷酸与果糖6-磷酸相互转化。2015

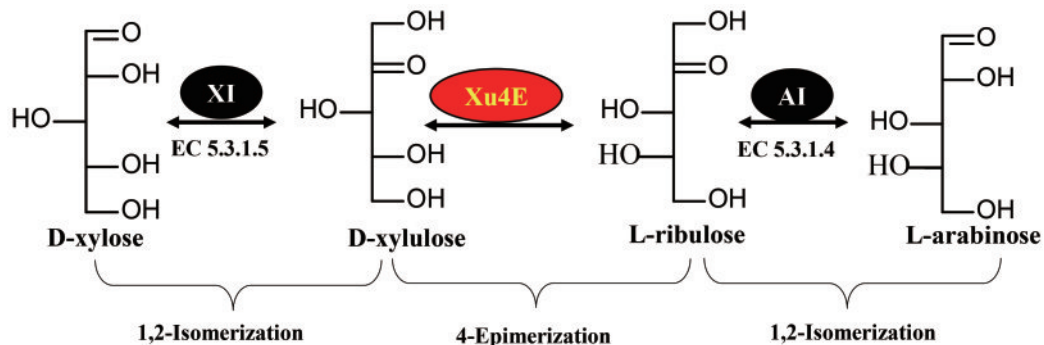


图3 体外生物转化（ivBT）的新应用：D-L型糖差向异构酶制备L-阿拉伯糖

(XI, D-木糖异构酶; Xu4E, D-木酮糖4-差向异构酶; AI, L-阿拉伯糖异构酶)

Fig. 3 Production of L-arabinose using D-L sugar epimerase based on *in vitro* Biotransformation (ivBT)

(XI, D-xylose isomerase; Xu4E, D-xylulose 4-epimerase; AI, L-arabinose isomerase)

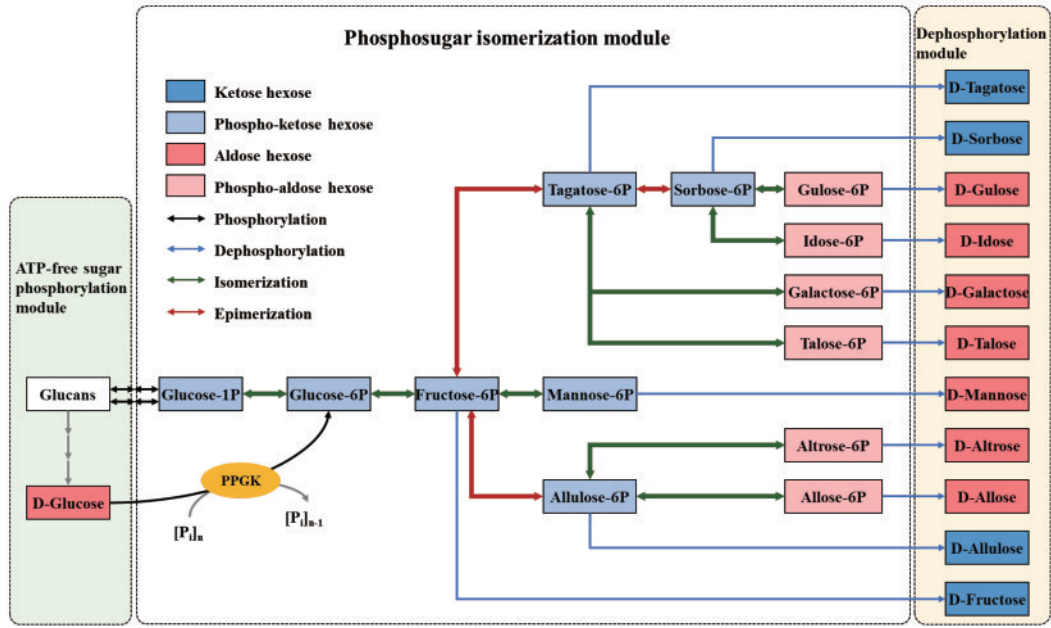


图4 Zhang策略 (“无ATP磷酸化-异构-脱磷”策略)在体外生物转化(ivBT)中的应用:健康糖的多酶分子机器
 Fig. 4 Application of Zhang Strategy ("ATP-free Phosphorylation-Isomerization-Dephosphorylation" strategy) in *in vitro* Biotransformation (ivBT): A multi-enzyme molecular machine for healthy sugars

表1 酶促异构法、全细胞催化、微生物发酵法、ivBT法合成D-塔格糖的关键技术指标比较

Table 1 Comparison of Key Technical Indicators for D-Tagatose Synthesis via Enzymatic Isomerization, Whole-cell Biosynthesis, Microbial Fermentation, and *in vitro* BioTransformation (ivBT)

Production method	Enzyme	Substrate	Titer (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L/h)	Temp (°C)	Reference
Enzymatic isomerization	L-AI from <i>Arthrobacter sp.</i> 22c	100 g/L D-galactose	30	30	0.25	30	[104]
	L-AI from <i>G. stearothermophilus</i>	100 g/L D-galactose	30.6	30.6	1.9	60	[105]
	L-AI from <i>G. thermodenitrificans</i>	300 g/L D-galactose	158	52.7	8	60	[48]
	L-AI from <i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	300 g/L D-galactose	126	42.0	2.6	65	[106]
	L-AI from <i>Thermotoga maritima</i>	1.8 g/L D-galactose	1.0	56.0	0.2	80	[107]
	Tagaturonate 3-epimerase from <i>Thermotoga petrophila</i>	700 g/L D-fructose	213	30.0	107	80	[49]
	Tagatose-4-epimerase from <i>Thermotogae bacterium</i>	200 g/L D-fructose	28	14.0	14	70	[108]
	D-tagaturonate epimerase from <i>Thermotoga neapolitana</i>	100 g/L D-fructose	21.8	21.8	7.3	65	[109]
	Tagatose 4-epimerase from <i>Thermoprotei archaeon</i>	100 g/L D-fructose	18.9	18.9	7.6	70	[50]
Whole-cell biosynthesis	<i>E. coli</i> BL21/pET28a-P3-LfaraAD390V/V468LlacZ	500 g/L lactose	115	23.1	2.4	50	[68]
	<i>E. coli</i> /pETDuet-ogp-pgm and pCDFDuet-pgi-gatz-pgp	20 g/L maltodextrin	3.2	16.0	0.13	60	[70]
	<i>E. coli</i> ER-2GatZ (Δ pDz)	10 g/L maltodextrin	3.38	33.8	1.13	60	[72]
Fermentation	<i>S. cerevisiae</i> EJ2g_iXiG_pXpG	114 g/L lactose	37.7	33	0.13	30	[75]
	<i>B. subtilis</i> BS-3CA4	72 g/L D-galactose	39.6	0.55	0.33	45	[76]
ivBT	α GP, PGM, PGI, TPE, and TPP from <i>B. subtilis</i>	100 g/L maltodextrin	78	78	2.0	37	[110]
	α GP, PGM, PGI, TPE, and TPP from <i>E. coli</i> BL21	20 g/L maltodextrin	17.7	88.5	0.74	50	[61]
	α GP, PGM, PGI, TPE, and TPP from <i>E. coli</i> BL21	50 g/L maltodextrin	37.6	75	1.57	50	[61]

年,张以恒教授基于新发现的塔格糖6-磷酸差向异构酶^[59]、淀粉合成肌醇途径^[33]、以及淀粉合成果糖途径^[60],提出从淀粉合成D-塔格糖的多酶催

化途径^[61]。Zhang策略用于塔格糖合成包括三部分:(1)不依赖ATP的多酶催化淀粉磷酸化生成磷酸糖化合物^[62],(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^[59], 以及 (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^[63]。几乎同期, 天工所也申请了一系列专利, 披露其在塔格糖技术方面的长期研发成果, 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^[64], 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^[65, 66], 以及固定化酶技术催化淀粉合成塔格糖技术^[67]等。

国内外科学家利用酶促异构法、全细胞催化法、微生物发酵法合成 D-塔格糖也取得了显著成果 (表 1)。韩国建国大学的 Oh 教授团队通过对石生嗜热袍菌 (*Thermotoga petrophila*) 来源的 D-tagaturonate epimerase (UxaE) 进行定向改造使其获得塔格糖 4-差向异构活性, 从而可以直接将 700 g/L D-果糖转化为 213 g/L D-塔格糖, 转化率达到 30%, 产率达到 107 g/L/h^[49]。江南大学饶志明教授团队构建重组大肠杆菌全细胞体系, 实现全细胞催化法一步催化乳糖合成 D-塔格糖^[68], 该团队筛选获得发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum* CGMCC 2921) 来源的高活性 L-阿拉伯糖异构酶 (L-arabinose isomerase, AI), 经理性设计获得突变体 D390V/V468L; 进一步通过启动子优化, 将该突变体基因与 β -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中

串联表达, 构建双酶偶联体系, 从而以 500 g/L 乳糖为底物, 催化得到 115 g/L D-塔格糖, 转化率达到 23.1%, 产率达到 2.4 g/L/h^[68]。江南大学江波教授也长期致力于塔格糖相关研究^[69-71], 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, 实现全细胞催化 10 g/L 麦芽糊精合成 3.38 g/L 塔格糖, 转化率达到 33.8%, 产率达到 1.13 g/L/h^[72]。

相对于以 D-半乳糖^[48, 73]、D-果糖^[50, 74]为原料的酶促异构法, 以麦芽糊精^[72]为原料的全细胞催化法、以及乳糖^[75]、D-半乳糖^[76]为原料的微生物发酵法合成 D-塔格糖而言, 基于 Zhang 策略开发的淀粉制 D-塔格糖技术具有原料廉价、得率高的优势 (表 1, 图 5)。美国 Bonumose 公司宣称已利用 ivBT 技术建成年产 1000 吨塔格糖工厂; 2023 年 7 月, 天津怡和生物科技有限责任公司成立, 专注于利用淀粉原料进行塔格糖、甘露糖与阿洛酮糖的生物制造产业化, 都展现出 ivBT 在甜味剂产业中巨大的产业化潜力。

3.4 多酶分子机器利用二氧化碳合成功能性单糖

二氧化碳排放带来全球性气候变化问题, 因此二氧化碳固定和转化成为当前研究热点^[77]。淀粉与蔗糖是地球上生物体 (包括动物、植物与微生物) 的能量储存和利用载体, 也是工业生物制

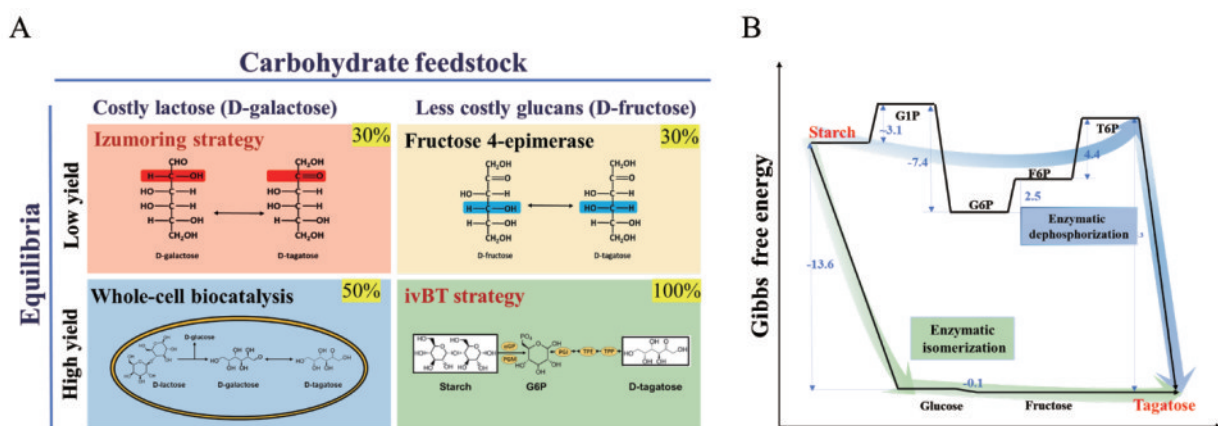


图 5 D-塔格糖的生物制造方法比较

(A, 理论摩尔得率: 30%-100%; B, 吉布斯自由能数据的来源: eQuilibrator: The Biochemical Thermodynamics Calculator (weizmann.ac.il))

Fig. 5 Comparison of biotechnological methods for D-tagatose production

(A, Theoretical molar yield: 30%-100%; B, Sources of Gibbs free energy data: eQuilibrator: The Biochemical Thermodynamics Calculator (weizmann.ac.il))

造的主要碳源^[78, 79]。目前,工业淀粉来自通过农作物的种植、提取和转化,但植物光合作用能量效率低、速度慢^[80, 81]。此外,由于土地退化和稀缺、生态系统退化、由全球变暖导致的极端天气和自然灾害,淀粉与蔗糖稳定供应面临风险。

“二氧化碳合成糖类”体外生物转化平台能够有效解决植物光合作用能量转化效率低、自然禀赋资源约束的问题,是一种全新的人工高效固碳模式^[82, 83]。天工所杨建刚研究员开发了一种“二氧化碳合成糖类”人工途径(artificial CO₂-to-sugars pathway, ACSP)^[84](图6)。ACSP路线图可以分为四个步骤:(1)热化学还原CO₂为一碳甲醇;(2)ATP依赖的多酶级联催化醛缩反应,将C1单元缩合为具有特定立体化学构型的磷酸化己糖,如具有(3S,4R)构型的果糖-6-磷酸(Fructose 6-phosphate, F6P);(3)异构/差向异构反应,改变F6P的立体中心转变为特定的对映异构体,如通过差向异构反应催化F6P合成具有(3R,4R)构型的阿洛酮糖-6-磷酸(A6P),或者通过异构反应催化F6P合成具有(3S,4R)构型的塔格糖6-磷酸(T6P);最后(4)脱磷酸反应,将上步骤合成的磷酸化己糖(如A6P、T6P)进行专一性酶催化的脱磷反应,获得立体构型明确的目标己糖(如D-阿洛酮糖、D-塔格糖等),不可逆的脱磷酸步骤从热力学上推动整个反应向最终产物进行。

基于醛缩反应、异构化/差向异构化和脱磷酸反应的ivBT技术路线,能够将二氧化碳和氢气不对称组装成具有完美立体构型的糖类,这是一条线性的、ATP消耗最小、路径最短的F6P从头合成途径,而F6P已被确认为合成结构多样的单糖、寡糖和多糖及其衍生物的关键前体。通过将F6P衍生路线与二氧化碳化学还原、酶促异构化、脱磷酸反应相结合,能够催化原料二氧化碳合成复杂且手性的多碳糖。杨建刚研究员通过关键酶的挖掘和改造,根据产品导向将多个酶进行组装和优化,实现了几种高能量密度和低升糖指数的功能性己糖精准合成,包括两种醛糖(D-葡萄糖、D-甘露糖)和两种酮糖(D-阿洛酮糖、D-塔格糖)。“二氧化碳合成糖类”人工途径克服了传统“二氧化碳-生物质-糖”过程低碳转化效率的问题,为从二氧化碳合成其他结构多样的糖及其衍生物提供了新途径。

4 ivBT产业化的挑战与机遇

ivBT作为新型工业生物制造平台,在推动健康糖的高得率、低成本、绿色可控、可持续的生物制造方面具备鲜明的优势^[85]。首先是原料来源广泛,ivBT能够利用廉价且来源广泛的原料合成目标产品^[86-88]。其次,产物得率高,ivBT没有细

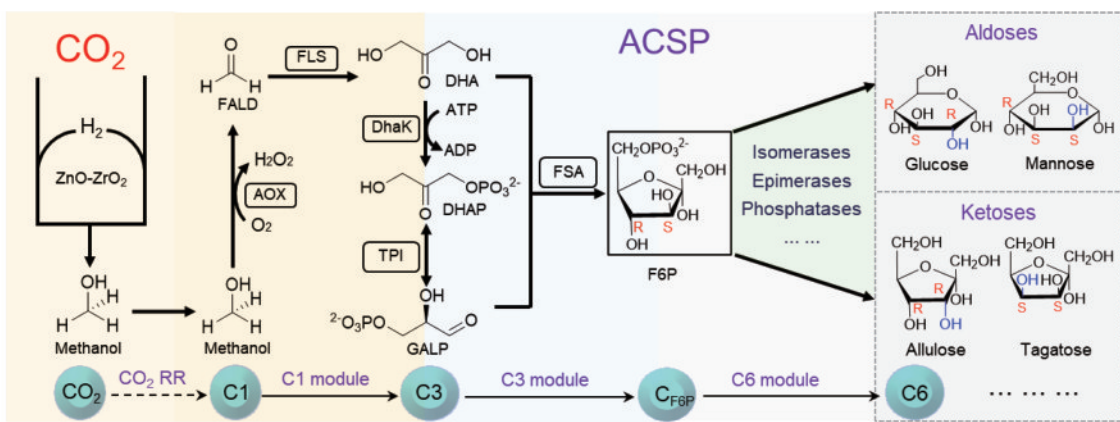


图6 人工二氧化碳制糖路径(ACSP)的设计^[76]

(FALD: 甲醛; DHA: 二羟基丙酮; DHAP: 磷酸二羟基丙酮; GALP: 3-磷酸甘油醛; F6P: 果糖-6-磷酸; AOX: 醇氧化酶; FLS: 甲醛缩合酶; 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)

Fig. 6 Design of artificial CO₂-to-sugars route (ACSP)

FALD: formaldehyde; DHA: dihydroxyacetone; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; GALP: glyceraldehyde 3 phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; AOX: alcoholoxidase; FLS: formolase; DhaK: dihydroxyacetone kinase; TPI: triosephosphate isomerase; FSA: fructose 6-phosphate aldolase.

胞工厂复杂的代谢网络调控，完全消除竞争途径，通过构建巧妙的人工合成途径，能够超越传统酶异构生产的平衡常数，底物全部用于目标产品的合成^[89]，实现接近100%理论得率^[33, 87, 90-92]。第三，工程控制简单，是一个简单开放的转化系统，工艺操作简单易优化，更高（效），更快（反应速率），更稳定、更好放大性；生产过程能量消耗低，低速搅拌，确保反应液混合均匀，无需制冷与供氧，仅需要根据实际转化温度保温或提供少量加热^[28, 29]。

4.1 原料拓展与途径重构

健康糖（如D-塔格糖、L-阿拉伯糖）的传统生产工艺对特定原料高度依赖，导致供应规模小、成本高，成为制约市场发展的关键瓶颈。

以L-阿拉伯糖为例，其生产长期依赖以木糖为主产品的工艺流程。尽管非粮生物质原料来源丰富，但L-阿拉伯糖在其中的含量偏低，受到来源、品种、种植条件等因素影响，如在玉米秸秆中含量约为1%~3%^[93]，在玉米芯中含量约为4%~9%^[94, 95]。这使得L-阿拉伯糖的利用缺乏独立路径，严重受制于木糖市场需求。如果木糖（醇）市场饱和，扩大L-阿拉伯糖的生产就难以实现。D-木糖变L-阿拉伯糖术使得L-阿拉伯糖的制备可以独立利用玉米芯原料，显著提升了该健康糖产业的原料可控性与产业独立性，产能规模可极大提升。D-塔格糖，其以乳糖或半乳糖为原料，原料价格高昂且转化率低（约30%），制约了市场规模。Zhang策略不仅彻底打破了塔格糖原料供给瓶颈，使得更大宗低廉的多糖，如淀粉、纤维素及其衍生物得以成为各类健康糖的普适性原料，巧妙的途径设计理论上可以实现原料糖单元的全利用。

二氧化碳是地球上最丰富的碳源之一，也是生物制造领域的第三代原料。然而，二氧化碳的生物利用面临着还原难、能耗高、转化速度慢等核心挑战：其化学惰性导致活化与固定过程需要克服较高的热力学能垒（二氧化碳分子的C=O键能约750 kJ/mol）；从能量效率看，二氧化碳制糖理论能效是4500度电产出1吨糖，但实际合成中，

受制于电化学合成低碳化合物以及低碳化合物生物转化为糖的低能效，实际能效远低于理论值；同时，碳链延长的催化效率低，进一步降低健康糖合成速度。通过生物制造将二氧化碳转化为各类产品（包括健康糖），为碳减排与碳中和目标的实现提供了终极解决方案。

4.2 多酶机器的制备与使用成本分析

作为体外生物制造的核心“芯片”，酶分子、多酶分子机器在生物制造全成本中占据重要组成部分，笔者可以通过酶单位制造成本（人民币每千克酶干重）与PE值的比值简单估算酶的总体成本（酶成本=酶制备成本/PE）。其中，PE值指产品与非细胞催化剂（酶）重量的比值（Product-to-Enzyme Ratio）^[96]，也可与酶的总转化数TTN（Total Turn-over Number）建立换算关系（PE = TTN × MW_p/MW_e），即PE值可综合反映酶催化效率与使用寿命。当PE值达到10-50区间，对应催化剂成本为25000元/吨产品至5000元/吨产品，是技术产业化的关键阈值。提升PE值的主要途径包括挖掘超稳定酶元件，酶工程改造提升酶分子稳定性，开发酶固定化技术，优化催化反应条件等^[96]。

低成本酶制备是实现ivBT生物制造产业化的先决条件^[28, 29]。当前，分泌酶，如淀粉液化酶、蛋白酶等占据了工业酶的最大市场，其制造成本能够低至每公斤酶干重约100元人民币。胞内酶制剂的生产成本略高于分泌型酶，大规模工业生产时生产成本大约每公斤酶干重250-1000元人民币。胞内酶表达体系技术简单，易于操作，可以在低成本培养基中高密度发酵大肠杆菌或枯草芽孢杆菌，来实现胞内酶的高效低成本生产。笔者成功将大肠杆菌T7表达系统成功转移到枯草芽孢杆菌宿主中，其相较于大肠杆菌底盘在可溶性表达一些容易形成包涵体的目的蛋白方面更具有优势^[97]。除了酶制剂的低成本发酵生产，研究人员还开发了工艺简单且成本低廉的热沉淀法用于纯化制备酶产品^[33, 98]。

酶元件的高效挖掘与改造对降低酶成本至关重要。在Zhang策略中，其途径设计不仅无需使

用昂贵的ATP、NAD(H)辅酶, 无需ATP合成葡萄糖6磷酸, 同时, 中间产物均为磷酸糖, 其反应活性相较游离单糖更高, 且在细胞代谢中, 单糖普遍以磷酸化形式存在, 因此, 自然界中以磷酸糖为底物的酶种类远多于以单糖为底物的酶, 从而可选的异构酶工具更为丰富, 更有利于高效挖掘和改造适于工业生产的稳定酶, 为工艺设计与优化提供了更大的灵活性与潜力。

固定化酶技术是提高酶PE值的最有效方法之一^[47, 99]。固定化酶具有明显的生物制造优势: 延长酶的使用寿命、利于酶的高效回收和重复使用, 降低用酶成本、简化生物催化剂与产品的分离过程、最大限度减少或消除产品的蛋白污染、在连续固定床操作等方面具有成本效益^[43-46]。截至目前, 商业化应用最成功的固定化酶制剂是诺维信公司(Novozymes)生产的固定化葡萄糖异构酶制剂(Sweetzyme IT)。该酶可以满足常见工业设备和加工环境所需要的应用条件, 每公斤固定化酶能够在55°C下生产高达15,000公斤的F42果葡糖浆, 产品与纯酶的重量比(PE值)达到100,000, 按此计算, 酶成本摊入每吨产品仅约20元人民币, 占果葡糖浆售价的比例不足0.5%^[96]。

多酶共固定化是以级联反应体系为基础, 将两种或两种以上的酶固定在同一载体上, 具有较高的原子经济性和重复使用性^[47]。选择适宜的固体载体是提高多酶共固定体系催化效率最基本也是最重要的途径, 酶组件可以随机分布或有序组装在固体载体上。通常, 多酶共固定相较单一酶固定更有效, 它限制了不稳定中间体向外部环境的扩散, 也能够显著提升级联酶促反应的速率^[100]。笔者开发了一种仿生矿化微囊方法, 构建了适配肌醇多酶机器的四酶共固定体系, 用于催化淀粉制备肌醇, 共固定后测试总酶半衰期在70°C下提高到55.5小时, 是未固定化酶混合物的5.9倍^[101]。通过分批补料底物淀粉, 肌醇的产量可提高至210 g/L, 同时大幅度降低肌醇整体生产成本50%。多酶共固定技术处于产业化初期阶段, 需要进一步突破载体设计与适配(载体应匹配不同多酶体系, 确保底物与产物在酶分子间的高效转运), 酶活与酶稳定性共提升(克服“酶构象自由度”与“结构刚性”的矛盾)与规模化生产等

诸多挑战^[96], 但已在肌醇和D-塔格糖的生物制造中初步展示出良好的产业化潜力。

4.3 分离精制: 提升综合得率的关键环节

生物制造的下游环节, 尤其是产品的分离与精制, 在决定整体工艺经济性方面具有关键作用。与细胞工厂不同, ivBT产品制备过程不涉及细胞自身的生长繁殖复制, 不消耗原料。因此, 高效产物分离是提升原料利用率的重要手段^[15]。

模拟移动床(SMB)色谱技术因其高效、连续的分离特性, 成为提升健康糖产业的关键工具^[102, 103], 优势主要体现在以下几个方面: (1) 提升产品纯度与原料综合利用率, 将目标糖的纯度提高到医药级水平, 同时分离未利用原料; (2) 降低运行成本, SMB采用连续操作模式, 可有效减少人工; (3) 实现底物循环利用, 提升整体转化效率, 如在D-阿洛酮糖、D-塔格糖、L-阿拉伯糖生产中, 可实现未反应底物(D-果糖、D-木糖)的高效回收与循环利用; (4) 具备良好的通用性与拓展性, 同一套SMB设备通过调整参数, 可适配多种功能糖的分离需求, 如从D-果糖到D-海藻糖、D-塔格糖、D-阿洛酮糖、L-阿拉伯糖等, 实现柔性生产。

值得注意的是, 健康糖分离精制成本占全生产成本较大。基于ivBT技术设计的多酶分子机器通过推动定向产物合成, 能够突破反应平衡常数的限制(如Zhang策略的巧妙设计, 使得淀粉合成单糖转化效率理论值可达到100%), 进而从生物制造源头上提高产物得率, 减少杂质生成, 反应体系和分离精制步骤将极大简化, 仅通过简易的脱色、脱盐、浓缩及结晶等操作, 即可实现目标产物的高效纯化, 显著降低生产工艺的复杂度与成本。ivBT转化效率的提升与分离精制工艺的简化(如减少SMB应用)将形成深度协同, 为改善健康糖的生物制造经济性, 提供了更系统、更高效的解决方案。

5 结论与展望

食糖产业关系国计民生。随着消费者饮食结

构的转变,对控糖、减糖、低GI食品的需求持续增长,生物制造技术飞速发展,在风险评估与标准体系日益完善的背景下,合成生物学产品在食品领域的市场准入路径日趋清晰,为健康糖产业的技术革新与结构调整带来了全新机遇,未来市场竞争将更加聚焦于“更天然、更具功能性、更具成本优势”的解决方案上。

体外合成生物技术与健康糖制备方面有天然优势(如高得率、高速度、以及可放大性)。ivBT作为新一代的工业生物制造平台,依托需求导向,设计与优化全新体外人工多酶途径,实现超低成本的内重组酶发酵与表达系统,超低成本的高效酶固定化技术等关键核心能力,逐步构建起具有产业竞争力的制造体系。通过生物制造的系统量化衡量指标(PC值、PE值、PX值)识别并解决成本与效率问题,避免实验室研究中常见的“单技术指标最优”思维,更加强调整体经济性提升。在实现高产品得率、高制造强度和低制造成本的同时,ivBT还具备技术保密性强、生物安全性高等产业优势,将在健康糖的生物制造中发挥越来越重要的角色,推动健康糖在食品、饮料、医药、保健品等领域的广泛应用,为全球消费者带来更多健康、美味与可持续的选择。

参 考 文 献

- [1] VALENCIA G A. Natural additives in foods[M]. 2023: Cham, Switzerland: Springer.
- [2] 2024年甜味剂市场现状与发展趋势分析. 2024; Available from: <https://www.chinairm.com/news/20241101/154326616.shtml>.
- [3] PHILIPPE R N, DE MEY M, ANDERSON J, et al. Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014. 26: 155-161.
- [4] XU Y M, WU Y K, LIU Y F, et al. Sustainable bioproduction of natural sugar substitutes: strategies and challenges[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022. 129: 512-527.
- [5] DHAARINI C, TEJASHWINI S, and GAYATHRI M. Biotechnological intervention in production of bioactive compounds: biosynthesis, characterization and applications [M]. 2025: Cham: Springer Nature Switzerland.
- [6] SUN S, ARAKI Y, HANZAWA F, et al. High sucrose diet-induced dysbiosis of gut microbiota promotes fatty liver and hyperlipidemia in rats[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2021. 93: 108621.
- [7] YU S, LI C, JI G, et al. The contribution of dietary fructose to non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021. 12: 783393.
- [8] WANG S and TONG T. Progress of research on sweeteners and human health[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024. 50(17): 371-379.
- [9] DEBRAS C, DESCHASAUX-TANGUY M, CHAZELAS E, et al. Artificial sweeteners and risk of type 2 diabetes in the prospective NutriNet-Santé cohort[J]. *Diabetes Care*, 2023. 46(9): 1681-1690.
- [10] ZANI F, BLAGIH J, GRUBER T, et al. The dietary sweetener sucralose is a negative modulator of T cell-mediated responses [J]. *Nature*, 2023. 615(7953): 705-711.
- [11] Aspartame | EFSA. 2023; Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/aspartame>.
- [12] WU W J, SUI W H, CHEN S Z, et al. Sweetener aspartame aggravates atherosclerosis through insulin-triggered inflammation[J]. *Cell Metabolism*, 2025. 37(5): 1075-1088.
- [13] WITKOWSKI M, WILCOX J, PROVINCE V, et al. Ingestion of the non-nutritive sweetener erythritol, but not glucose, enhances platelet reactivity and thrombosis potential in healthy volunteers-brief report[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2024. 44(9): 2136-2141.
- [14] WITKOWSKI M, NEMET I, ALAMRI H, et al. The artificial sweetener erythritol and cardiovascular event risk[J]. *Nature Medicine*, 2023. 29(3): 710-718.
- [15] FAN L, SHI T, CHEN X, et al. Biosynthesis of a healthy natural sugar D-tagatose: advances and opportunities[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2025: 1-16.
- [16] HAO L, LU X, SUN M, et al. Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats[J]. *Food & Nutrition Research*, 2015. 59: 28886.
- [17] KROG-MIKKELSEN I, HELS O, TETENS I, et al. The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: dose-response studies *in vitro* and in humans[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2011. 94(2): 472-478.
- [18] WANG Y, ZHAO J, LI Q, et al. L-Arabinose improves hypercholesterolemia *via* regulating bile acid metabolism in high-fat-high-sucrose diet-fed mice[J]. *Nutrition & Metabolism*, 2022. 19(1): 30.
- [19] LIU K, DONG H, LI X, et al. L-Arabinose alleviates functional constipation in mice by regulating gut microbiota and metabolites[J]. *Foods*, 2025. 14(5): 900.
- [20] GIBSON G R and ROBERFROID M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics[J]. *The Journal of Nutrition*, 1995. 125(6): 1401-1412.

- [21] POL K and MARS M. L-arabinose and D-xylose: sweet pentoses that may reduce postprandial glucose and insulin responses[J]. *Food & Nutrition Research*, 2021. 65(10): 29219.
- [22] PASMANS K, MEEX R C R, TROMMELEN J, et al. L-arabinose co-ingestion delays glucose absorption derived from sucrose in healthy men and women: a double-blind, randomised crossover trial[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2022. 128(6): 1072-1081.
- [23] POL K, PUHLMANN M L, and MARS M. Efficacy of L-arabinose in lowering glycemic and insulinemic responses: the modifying effect of starch and fat[J]. *Foods*, 2022. 11(2): 157.
- [24] 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 & Vitaminology*, 2002. 48(1): 77-80.
- [25] O'CHAROEN S, HAYAKAWA S, and OGAWA M. Food properties of egg white protein modified by rare ketohexoses through Maillard reaction[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014. 50(1): 194-202.
- [26] KANASAKI A, IIDA T, MURAO K, et al. D-Allulose enhances uptake of HDL-cholesterol into rat's primary hepatocyte via SR-B1[J]. *Cytotechnology*, 2020. 72(2): 295-301.
- [27] MOON S, KIM Y H, and CHOI K. Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by D-allulose[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2020. 25(1): 22-28.
- [28] 石婷, 宋展, 宋世怡, et al. 体外生物转化 (*in vitro* BioTransformation, ivBT): 生物制造的新前沿[J]. *合成生物学*, 2024. 5(6): 1-24.
- [29] ZHANG Y-H P J, ZHU Z, YOU C, et al. *In vitro* BioTransformation (ivBT): Definitions, opportunities, and challenges[J]. *Synthetic Biology and Engineering*, 2023. 1(2): 10013.
- [30] ZAREZADEH M, DEGHANI A, FAGHFOURI A H, et al. Inositol supplementation and body mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Obesity Science & Practice*, 2022. 8(3): 387-397.
- [31] GREFF D, JUHASZ A E, VANCOSA S, et al. Inositol is an effective and safe treatment in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2023. 21(1): 10.
- [32] LOPEZ-GAMBERO A J, SANJUAN C, SERRANO-CASTRO P J, et al. The biomedical uses of inositols: a nutraceutical approach to metabolic dysfunction in aging and neurodegenerative diseases[J]. *Biomedicines*, 2020. 8(9): 295.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] IZUMORI K. Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006. 124(4): 717-722.
- [37] ZHANG W, CHEN D, CHEN J, et al. D-allulose, a versatile rare sugar: recent biotechnological advances and challenges[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023. 63(22): 5661-5679.
- [38] WU H, ZHANG W, and MU W. Recent studies on the biological production of D-mannose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019. 103(21-22): 8753-8761.
- [39] SHEN J D, XU B P, YU T L, et al. Identification of hyperthermophilic D-allulose 3-epimerase from *Thermotoga* sp. and its application as a high-performance biocatalyst for D-allulose synthesis[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2024. 47(6): 841-850.
- [40] JIAJUN CHEN Z H, TING SHI, DAWEI NI, YINGYING ZHU, WEI XU, WENLI ZHANG, WANMENG MU. Engineering D-allulose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* for improved thermostability using directed evolution facilitated by a nonenzymatic colorimetric screening assay[J]. *Food Bioscience*, 2023. 53: 102607.
- [41] YANG J, TIAN C, ZHANG T, et al. Development of food-grade expression system for D-allulose 3-epimerase preparation with tandem isoenzyme genes in *Corynebacterium glutamicum* and its application in conversion of cane molasses to D-allulose[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019. 116(4): 745-756.
- [42] GAO X, FANG S B, MA X Z, et al. Customized self-assembled bimetallic hybrid nanoflowers promoting the robustness of D-allulose 3-epimerase[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024. 484: 149453.
- [43] LI Z Y, LIU T, PEI W W, et al. Immobilization of a novel D-allulose 3-epimerase from *Bacillus cihuensis* within metal-organic frameworks[J]. *Food Bioscience*, 2024. 59: 104202.
- [44] XIAO Z Q, JIANG B, CHEN J J, et al. Immobilization and stabilization of D-allulose 3-epimerase for continuous D-allulose synthesis in packed-bed reactors[J]. *Food Bioscience*, 2025. 64: 105959.
- [45] WEN X, LIN H B, LIU G W, et al. Immobilization of cells expressing D-allulose 3-epimerase and their application in D-allulose bioproduction with the assistance of boric acid[J]. *Food Bioscience*, 2025. 65: 106027.
- [46] SHEN J D, XU B P, HUANG L G, et al. Study on

- immobilization of hyperthermophilic D-allulose 3-epimerase and properties of immobilized enzyme[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2025. 43(2): 42-50.
- [47] REN S, LI C, JIAO X, et al. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019. 373: 1254-1278.
- [48] LIM B C, KIM H J, and OH D K. High production of D-tagatose by the addition of boric acid[J]. *Biotechnology Progress*, 2007. 23(4): 824-828.
- [49] SHIN K-C, LEE T-E, SEO M-J, et al. Development of tagaturonate 3-epimerase into tagatose 4-epimerase with a biocatalytic route from fructose to tagatose[J]. *ACS Catalysis*, 2020. 10(20): 12212-12222.
- [50] CHEN J J, NI D W, ZHU Y Y, et al. Discovery of a thermostable tagatose 4-epimerase powered by structure- and sequence-based protein clustering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024. 72(33): 18585-18593.
- [51] KHERSONSKY O, ROODVELDT C, and TAWFIK D S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006. 10(5): 498-508.
- [52] HULT K and BERGLUND P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2007. 25(5): 231-238.
- [53] RODIONOVA I A, SCOTT D A, GRISHIN N V, et al. Tagaturonate-fructuronate epimerase UxaE, a novel enzyme in the hexuronate catabolic network in *Thermotoga maritima*[J]. *Environmental microbiology*, 2012. 14(11): 2920-2934.
- [54] WILLE D, HAURI-HOHL M, VONBACH P, et al. Too much of too little: xylitol, an unusual trigger of a chronic metabolic hyperchloremic acidosis[J]. *European Journal of Pediatrics*, 2010. 169(12): 1549-1551.
- [55] OKU T and NAKAMURA S. Threshold for transitory diarrhea induced by ingestion of xylitol and lactitol in young male and female adults[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2007. 53(1): 13-20.
- [56] 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.
- [57] TIAN C, YANG J, LI Y, 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.
- [58] WANG P Y, ZHENG Y T, LI Y P, et al. Recent advances in biotransformation, extraction and green production of D-mannose[J]. *Current Research in Food Science*, 2022. 5: 49-56.
- [59] 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.
- [60] MORADIAN A and 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.
- [61] WICHELECKI D J and ZHANG Y-H P. Enzymatic synthesis of D-tagatose: US62236226[P]. 2015-10-02.
- [62] 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.
- [63] HUANG H, PANDYA C, LIU C, et al. Panoramic view of a superfamily of phosphatases through substrate profiling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. 112(16): 1974-1983.
- [64] 马延和, 孙媛霞, 杨建刚, et al. 一种全细胞催化制备塔格糖的方法: CN107988286A[P]. 2017-11-02.
- [65] MA Y H, SUN Y X, YANG J G, et al. Engineering strain for producing tagatose, and construction method and application thereof: CN109666620B[P]. 2019-02-20.
- [66] 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.
- [67] HAN P, WANG X, LI Y, 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.
- [68] LIU Y, QIAO Z, ZHANG H, et al. One-step whole-cell synthesis of D-tagatose from lactose catalyzed by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2025. 41(5): 1974-1993.
- [69] DAI Y, ZHANG J, 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.
- [70] DAI Y W, LI M L, JIANG B, et al. Whole-cell biosynthesis of D-tagatose from maltodextrin by engineered *Escherichia coli* with multi-enzyme co-expression system[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021. 145
- [71] DAI Y, ZHANG T, JIANG B, et al. *Dictyoglomus turgidum* DSM 6724 alpha-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.
- [72] DAI Y, LI C, ZHENG L, et al. Enhanced biosynthesis of D-tagatose from maltodextrin through modular pathway engineering of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022. 178: 108303.

- [73] CHEETHAM P S J and WOOTTON A N. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993. 15: 105-108.
- [74] CHEN J, WEI Y, NI D, et al. Biochemical characterization and biocatalytic application of a hyperthermostable tagatose 4-epimerase from *Infirmifilum uzonense*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025. 305(Pt 1): 141168.
- [75] LIU J J, ZHANG G C, KWAK S, et al. Overcoming the thermodynamic equilibrium of an isomerization reaction through oxidoreductive reactions for biotransformation[J]. *Nature Communications*, 2019. 10(1): 1356.
- [76] ZHANG G, AN Y, ZABED H M, et al. Rewiring *Bacillus subtilis* and bioprocess optimization for oxidoreductive reaction-mediated biosynthesis of D-tagatose[J]. *Bioresource Technology*, 2023. 389: 129843.
- [77] LIU Z, WANG K, CHEN Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂[J]. *Nature Catalysis*, 2020. 3(3): 274-288.
- [78] WEYMOUTH-WILSON A C. The role of carbohydrates in biologically active natural products[J]. *Natural Product Reports*, 1997. 14(2): 99-110.
- [79] KEELING P L and MYERS A M. Biochemistry and genetics of starch synthesis[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2010. 1: 271-303.
- [80] CAI T, SUN H, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. *Science*, 2021. 373(6562): 1523-1527.
- [81] BLANKENSHIP R E, TIEDE D M, BARBER J, et al. Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement[J]. *Science*, 2011. 332(6031): 805-809.
- [82] 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.
- [83] DESMONS S, GRAYSON-STEEL K, NUNEZ-DALLOS N, et al. Enantioselective reductive oligomerization of carbon dioxide into L-erythrulose *via* a chemoenzymatic catalysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021. 143(39): 16274-16283.
- [84] YANG J, SONG W, CAI T, et al. De novo artificial synthesis of hexoses from carbon dioxide[J]. *Science Bulletin*, 2023. 68(20): 2370-2381.
- [85] ZHANG Y-H P J. The enlightenment of the chinese philosophy "Tao-Fa-Shu-Qi" to industrial biomanufacturing[J]. *Synthetic Biology Journal* 2023. 4: 1-11.
- [86] PAN Y, LIU Y, LONG T, et al. Biomanufacturing of inositol from corn stover with biological pretreatment by an *in vitro* synthetic biology platform[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2025. 13(1): 436-446.
- [87] CHENG K, ZHENG W, CHEN H, 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.
- [88] 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.
- [89] TANG S, LIAO D, LI X, et al. Cell-free biosynthesis system: methodology and perspective of *in vitro* efficient platform for pyruvate biosynthesis and transformation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021. 10(10): 2417-2433.
- [90] 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.
- [91] OPGENORTH P H, KORMAN T P, and BOWIE J U. A synthetic biochemistry module for production of bio-based chemicals from glucose[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016. 12(6): 393-395.
- [92] SHI T, LIU S, and ZHANG Y-H P J. CO₂ fixation for malate synthesis energized by starch *via in vitro* metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2019. 55: 152-160.
- [93] MOXLEY G and ZHANG Y-H P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification[J]. *Energy & Fuels*, 2007. 21(6): 3684-3688.
- [94] 舒国伟, 张璐, 刘谕, et al. 玉米芯中提取木聚糖的研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2008. 043(002): 131-135.
- [95] 樊洪玉, 卫民, 赵剑, et al. 玉米芯木聚糖的提取及其相对分子质量分布研究[J]. *生物质化学工程*, 2019. 53(3): 24-32.
- [96] 张以恒, 陈雪梅, and 韩平平. 生物制造的PE值与PX值:定义与应用[J]. *合成生物学*, 2025. 6: 1-14.
- [97] YE J, LI Y J, BAI Y Q, et al. A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022. 9(56): 1-12.
- [98] NINH P H, HONDA K, SAKAI T, et al. Assembly and multiple gene expression of thermophilic enzymes in *Escherichia coli* for *in vitro* metabolic engineering[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015. 112(1): 189-196.
- [99] SHELDON R A and VAN PELT S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013. 42: 6223-6235.
- [100] BETANCOR L and LUCKARIFT H. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2010. 27: 95-114.
- [101] 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.
- [102] 刘宗利, 王乃强, 王明珠, et al. 模拟移动床色谱分离技术在功能糖生产中的应用[J]. *中国食品添加剂*, 2012. 23(S1): 200-204.
- [103] GABSI K, TRIGUI M, HELAL A N, et al. Simulated moving bed technology for the separation of fructose from date syrup [J]. *International Journal of Current Engineering and Technology*, 2015. 5(2): 1183-1190.
- [104] WANARSKA M KUR J. A method for the production of D-tagatose using a recombinant *Pichia pastoris* strain secreting beta-D-galactosidase from *Arthrobacter chlorophenicus* and a recombinant L-arabinose isomerase from *Arthrobacter sp.* 22c[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012. 11: 113.
- [105] KIM H J, RYU S A, KIM P, et al. A feasible enzymatic process for D-tagatose production by an immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor[J]. *Biotechnology Progress*, 2003. 19(2): 400-404.
- [106] JORGENSEN F, HANSEN O C, and STOUGAARD P. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004. 64(6): 816-822.
- [107] LEE D W, JANG H J, CHOE E A, et al. Characterization of a thermostable L-arabinose (D-galactose) isomerase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. 70(3): 1397-1404.
- [108] WANG L, TAN Z, XIE X, et al. Discovery and characterization of a novel tagatose-4-epimerase[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023. 63: 4197-4207.
- [109] XIA W, LIU S, HUANG L, et al. Reshaping the binding pocket of D-tagaturonate epimerase UxaE to improve the epimerization activity of C4-OH for enabling green synthesis of D-tagatose[J]. *Molecular Catalysis*, 2024. 566: 114439.
- [110] MA Y H and SUN Y X, Tagatose preparation method: CN106399427A[P]. 2016-11-01.



通讯作者: 张以恒(1971—), 低碳合成工程生物学全国重点实验室主任, 中国科学院天津工业生物技术研究所体外合成生物学与生物制造中心主任, 曾经任美国弗吉尼亚理工大学终身正教授。他是体外合成生物学的奠基人之一与产业化领跑者, 创建体外生物转化(ivBT)技术平台, 率先提出“人工多酶分子机器”概念并实现万吨级产业化。在秸秆制粮、体外呼吸作用(无氧呼吸作用产氢、有氧呼吸作用制电)、人工合成淀粉、淀粉制塔格糖与肌醇等方向取得了一系列原创性(0-1)突破。

E-mail: zhang_xw@tib.cas.cn



第一作者: 石婷(1984—), 女, 博士, 中国科学院天津工业生物技术研究所正高级工程师。2008年本科毕业于合肥工业大学生物与食品工程学院, 2010年和2014年分别获得天津大学化工学院生物化工专业硕士和博士学位。主要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