

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-064

糖质 ivBT 生物合成的核心元件及关键技术

裴彩霞^{1,2}, 李建军^{1,2}, 杜昱光^{1,2}

(¹ 中国科学院过程工程研究所, 生物药制备与递送全国重点实验室, 北京 100190; ² 中国科学院过程工程研究所, 国家生化工程技术研究中心(北京), 北京 100190)

摘要: 糖质 (glycans) 是构成生命的基本生物分子, 在生物过程中发挥重要作用, 与人类健康和疾病密切相关。由于糖质结构的复杂性, 糖质所携带的密码信息大大超过核酸及蛋白质等任何其它生物大分子。为了破译糖质携带的密码信息, 就需要获得一定量的、结构明确的糖质。合成仍然是获得糖质的最佳方式。体外生物转化 (*in vitro* biotransformation, ivBT) 是一个基于体外多酶催化的新型工业生物制造技术, 由酶、辅酶等元件体外重构生化反应途径, 实现目标产物的高效合成, 正逐渐发展成为合成糖质的一种重要技术。本文综述了 ivBT 在糖质合成中的应用、ivBT 糖质合成相关的糖核苷合成、糖基转移、NTP 再生等核心元件及酶的固定化、微流控、酶促自动化合成、动力学模拟、离子液体等关键技术, 展望了糖质 ivBT 合成相关的酶的协同性、特殊重组酶生产成本的降低、仿生辅酶的循环再生、多酶复合体的应用、硫酸化糖质的合成、AI 辅助的反应条件优化等发展方向, 旨在为糖质 ivBT 合成的未来发展提供指导。

关键词: 糖质的体外生物合成; 体外生物转化; 酶催化模块; NTP 再生; 糖质体外生物合成的关键技术

中图分类号: Q814.9 文献标志码: A

Core Elements and Key Technologies of ivBT-based Glycan Synthesis

PEI Caixia^{1,2}, LI Jianjun^{1,2}, DU Yuguang^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Biopharmaceutical Preparation and Delivery, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; ² National Engineering Research Center for Biotechnology (Beijing), Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Glycans are the fundamental biomolecules that make up life and play important roles in biological processes, including cell growth and proliferation, immune responses, angiogenesis and tumor cell metastasis, toxin interaction, protein folding and degradation, cell-cell communications, and cell-pathogen interactions, and are closely related to human health and disease such as occurrence, development, and metastasis of tumor, inflammation, viral or bacterial infections, etc. Due to their structural complexity arising from the number of chemically similar (and often isomeric) monosaccharide building blocks, the position and orientation of glycosidic linkages, branching, and non-

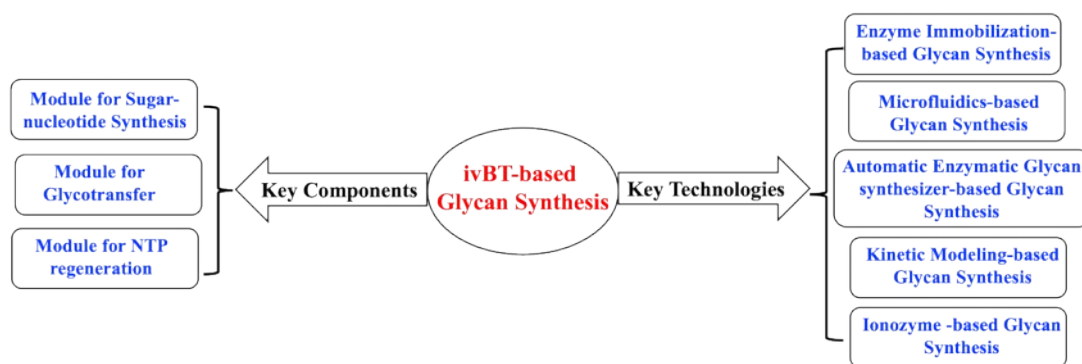
收稿日期: 2025-06-23 修回日期: 2025-08-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21877114)

引用本文: 裴彩霞, 李建军, 杜昱光. 糖质 ivBT 生物合成的核心元件及关键技术[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-064

Citation: PEI Caixia, LI Jianjun, DU Yuguang. Core Elements and Key Technologies of ivBT-based Glycan Synthesis[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-064

template-driven biosynthesis, the coding information they carry far exceeds that of any other biological macromolecules such as nucleic acids and proteins, which are generally linear structures and biosynthesized based on templates. To decipher the code information carried by glycans, it is necessary to obtain some structurally defined pure glycans. Since it is not possible to separate and purify glycans with defined structures from natural environment, synthesis remains the best approach to obtaining glycans. In vitro biotransformation (ivBT), a novel industrial biomanufacturing platform based on multi-enzyme catalysis in vitro, has become an essential approach to obtain high value-added products due to its appealing advantages in rapid construction of nonnatural enzymatic pathways, higher product yields, faster reaction rates, and better tolerances to toxic compounds. ivBT is gradually being developed into an important means of glycan synthesis. This article reviews application of ivBT in glycan synthesis, the core elements such as synthesis of sugar-nucleotides, glycosyl transfer and NTP regeneration, and key technologies of ivBT-based glycan synthesis like enzyme immobilization, microfluidics, enzyme-mediated automatic synthesis, dynamic simulation, and ion liquids, aiming to provide guidance for its future development, including synergism of multi-enzyme, reduction of production costs for special recombinant enzymes, regeneration of biomimetic coenzymes, application of complexes of multi-enzyme, ivBT synthesis of sulfated glycans and AI-assisted optimization of reaction conditions of ivBT synthesis, etc.



Keywords: ivBT-based glycan synthesis; In vitro biotransformation (ivBT); Enzymatic modules; NTP regeneration; Key technologies of ivBT-based glycan synthesis

糖质 (glycans) 是地球上蕴藏最为丰富的有机分子, 结构高度复杂, 由 (不同) 单糖通过不同糖苷键 (1→2/1→3, 等等) 按一定排列顺序组成, 具有分支多样性和立体异构性 (α/β) 等特点, 信息容量远超核酸与蛋白质, 同时有高度稳定性, 可能做超量数据的超长期存储。故相比作为遗传密码的 DNA, 蕴含巨量生物信息的载体-糖质也被称为“生命的密码”^[1]。揭示生命密码及其功能是亟待解决的科学难题。影响人类健康的每一种疾病都与“生命的密码”密切相关。糖质在胚胎发育、信号传导、肿瘤等疾病的发生和发展、以及病原体侵入宿主等诸多复杂的生命活动中发挥重要作用, 如: 糖质的序列决定抗体活性功能, 糖

质的结构决定病原感染结合及识别位点, 糖质化修饰是病毒逃逸宿主免疫系统的重要途径, 糖质结构改变是癌症普遍存在的特征, 在肿瘤发生过程中起到重要作用, 许多疫苗也以糖质为基础。

糖质已成为继蛋白质和核酸研究之后探索生命奥秘的第三大科学^[2]。要真正认识生命现象就必须揭示糖质的结构和功能 (深层次“生命密码”), 然而许多糖质的功能仍然不清楚^[3]。一旦这些“生命密码”被人类破译, 不但使我们进一步认识了生命过程, 同时将会带来一场意义重大的生物技术及生物产业的革命。糖科学研究的重点是糖质的结构解析、糖质的自动化合成、糖质的结构-功能关系研究等, 而今后的研究重点应该

是糖质的功能研究,即功能糖组学研究。为了研究糖质的结构-功能关系(或为了解密糖质携带的密码信息),就需要获得足够量的纯的糖质。为了人类的健康安全,食品添加剂、制糖工业等领域对糖质的纯度有更高、更严格的标准和要求。由于糖质结构的复杂性以及糖复合物糖质的低丰度,分离、提取纯的糖质是非常困难的,因此合成仍然是获得结构明确糖质的最佳选择^[3, 4]。

目前,糖质的合成方法主要包括化学合成、酶催化合成、细胞工厂合成等(表1)^[5-7]。虽然糖质的化学合成研究取得了非常大的进展,但是由于糖质结构的复杂性,化学方法合成糖质仍然存在一定的局限性。酶催化合成糖质日益受到重视。随着合成生物学的发展,糖质的生物合成也逐渐展示在人们的视野中。生物合成也被称为合成代谢,是生物体内由许许多多酶系统(代谢途径)参与完成的高度协调的细胞活动。生物合成是简

单小分子前体形成大复合物的过程,参与这一过程的酶系统组成了这一物质的生物合成路径或代谢通路。生物合成的反应需要能量的参与,通常以ATP的磷酸基转移的形式进行,以及NADH, NADPH和FADH₂形式的还原力。糖质的生物合成可以在体内进行,通过基因编辑技术,使活的细胞生产我们的目标产物,即细胞工厂^[8]。然而,基于细胞工厂的发酵技术存在局限性。因为发酵本身是活细胞系统的一种代谢过程,在此过程中,大量资源(如能量和碳源)被用于细胞自身的增殖、代谢维持及其他生理功能,这通常会导致目标产物的转化率相对较低^[9]。体外的反应可以利用酶或整个细胞作为生物催化剂^[10]。全细胞生物催化剂或其裂解液(含有多种酶)被用于复杂的反应,例如葡萄糖乙醇发酵、而无细胞系统则主要用于蛋白质合成^[11]、N-糖基化蛋白和糖缀合物^[12]、二氧化碳固定^[13]及其他复杂合成反应。

表1 三种糖质合成方法的比较

Table 1 Comparison of three methods for glycan synthesis

	化学法	酶法	细胞工厂法
专一性	低	最高	高
选择性 (区域、立体选择性)	低	最高	高
反应过程	繁琐(涉及到保护、脱保护以及活化单糖的过程)、反应时间长	反应过程简单、反应时间短	反应过程简单、反应时间短
反应条件	某些反应需要剧烈或特殊的条件(如高温、低温、高压等)	温和(37℃左右、pH接近中性等)	温和(37℃左右、pH接近中性等)
环境	不友好(使用有机溶剂及重金属催化剂等)	友好(水溶液中反应、不用重金属催化剂)	友好(水溶液中反应、不用重金属催化剂)
设备	某些反应需要特殊的设备(高压、低温等)	传统设备(发酵罐、反应罐)	传统设备(发酵罐)
转化率	低	高	低
产量	低	高	低
规模化生产	不适合	可以	可以

ivBT(体外生物转化, in vitro biotransformation)通过体外重构途径合成目标产品,规避了细胞代谢负担。本文系统综述了糖质ivBT合成的核心元件及关键技术等方面的研究进展,首先介绍了ivBT及其在糖质合成方面的应用,进而系统阐述了糖质ivBT合成的核心元件及关键技术,最后展望了该技术未来发展的方向与商业化应用前景。

1 体外生物转化(ivBT)及在糖质合

成中的应用

1.1 ivBT介绍

体外生物转化(in vitro biotransformation, ivBT)是一种基于体外多酶催化的新型工业生物制造平台,由天然酶或人工酶、(仿生或天然)辅酶、(人工)膜和细胞器等元件重新构建生化反应途径,实现目标产物的高效合成^[14, 15]^[16]。ivBT是介于细胞工厂与酶催化之间的新的生物制造平

台,即构建基于多酶分子机器的体外转化技术,被称为第三个工业生物制造平台。ivBT是一个新兴的生物制造平台,不受活细胞的限制,不存在细胞复制、基本代谢、复杂调控、能量消耗等情况,它可以摆脱生物体自我繁殖的局限,超越细胞合成极限,实现重要生化转化与超限生物能量转换。ivBT的设计原则共包括五部分:1)合成路线设计(包括路线组装、辅因子平衡、ATP平衡、热力学分析、反应平衡等);2)酶的选择(包括酶的特性、酶的挖掘等);3)酶的蛋白质工程改造(包括理性设计、定向进化、基于AI的新酶设计等);4)酶的生产(包括酶的低成本生产、酶的低成本纯化等);5)过程工程(包括酶的固定化、酶的稳定性、辅因子稳定性、产品的(原位)分离与纯化、产品的一锅法或多反应器制备、AI辅助优化反应条件、微流控反应器等)^[16]。ivBT可以通过上述各技术领域的集成创新实现迭代提升。

ivBT技术相比于单酶催化,如利用葡萄糖异构酶催化葡萄糖转化为果糖^[17],而酰胺酶则用于 β -内酰胺类抗生素的半合成^[18],更适用于复杂的体外生物合成路线。例如,纤维素水解需要内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和 β -葡萄糖苷酶的协同作用^[19]。其他实例包括利用NAD(P)H再生体系合成手性醇^[20],以及通过糖苷酶和糖基转移酶对青霉素等生物活性化合物进行糖基化修饰^[21-23]。目前,ivBT在多种化合物的工业化规模生产中极具应用潜力。该体系具有多项核心优势,包括高生产力和产物得率、反应过程易于操控与调整、不需要解决底物和产物进出细胞的问题、非天然合成途径的便捷构建等。此外,多酶体系的建模比复杂细胞机制的建模更为简单,从而为监测和控制各类工艺参数提供了更可靠的方法^[16, 24]

ivBT起始于单酶催化^[25]。第二次世界大战期间,英国泰莱公司使用固定化蔗糖酶生产糖浆。1969年,日本Tanabe Seiyaku公司利用固定化氨基酰化酶工业化生产L-蛋氨酸。1967年,美国克林顿玉米加工公司率先利用葡萄糖异构酶生产果葡糖浆。随后,ivBT由单酶催化逐渐向多酶级联催化(cascade enzyme biocatalysis, CEB)方向发展。CEB具有时空产率高、反应体积小、反应时间短、

操作单元少和生产污废少等优点^[26]。制药领域经常使用CEB解决高值手性药物合成中辅酶、NAD(P)H及ATP循环再生的问题^[20]。截至2019年,制药行业利用CEB生产了数百种小分子活性药物成分。ivBT是CEB的进一步发展,但是二者之间存在显著差异^[16]。

1.2 糖质的ivBT合成

糖质的ivBT合成主要通过两种酶催化实现:对糖苷键形成有效的糖苷合成酶是由糖苷水解酶通过理性设计和定向进化获得的,然而,仅有非常有限的糖苷合成酶成功应用于糖链的合成。相比而言,糖基转移酶催化合成糖链越来越受到重视^[6]。自然界中,糖核苷依赖(Leloir型)的糖基转移酶是催化合成各种结构糖链的主要酶。糖基转移酶可以根据它们转移的单糖(如葡萄糖Glc、半乳糖Gal、N-乙酰基葡萄糖胺GlcNAc、N-乙酰基半乳糖胺GalNAc、岩藻糖Fuc、N-乙酰-D-神经氨酸Neu5Ac等)进行分类。糖基转移酶需要利用核苷酸活化的单糖作为底物:唾液酸转移酶利用胞苷酸(cytidine 5'-monophosphate, CMP)活化的唾液酸(CMP-Sia),其它糖基转移酶利用二磷酸核苷酸(nucleotide 5'-diphosphate, NDP)活化的单糖:尿苷二磷酸单糖(UDP-monosaccharide)(Glc、Gal、GlcNAc、GalNAc、葡萄糖醛酸GlcA和木糖Xyl)和鸟苷二磷酸单糖(GDP-monosaccharides)(岩藻糖Fuc和甘露糖Man)。NDP活化的单糖可以通过合适的糖类激酶(GlyK, Glycokinase)和糖核苷焦磷酸化酶sugar nucleotide pyrophosphorylase(或核苷转移酶, nucleotidyltransferase, NucT)催化单糖、ATP以及NTP之间的反应得到。胞苷酸活化的唾液酸(CMP-Sia)则通过CMP-唾液酸合成酶催化唾液酸和CTP的反应获得(图1)^[6]。

针对不同单糖的糖核苷的合成,通常需要使用等当量高能量的ATP、UTP、GTP、CTP等NTP,由于NTP的价格比较昂贵(几千-万元/公斤),因此上述的合成路线不适合糖质的工业化生产^[27]。为了解决NTP的高成本问题,实现NTP的循环再生是一个有效策略(图2)。基于此,把糖

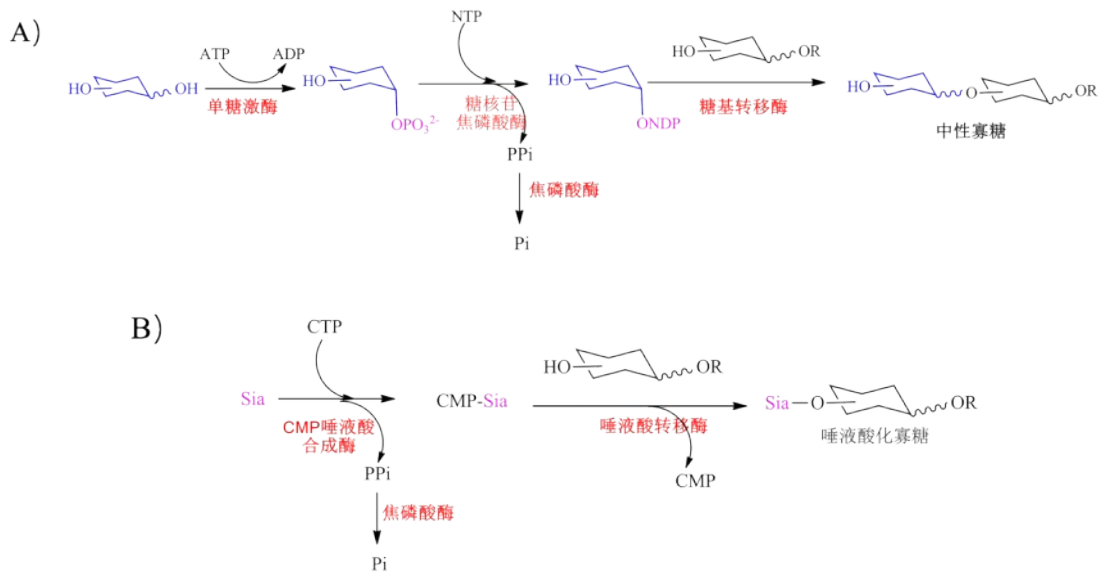


图1 中性 (A) 和唾液酸化 (B) 糖质的 ivBT 合成 (非 NTP 再生条件)

Fig. 1 ivBT synthesis of neutral (A) and sialylated (B) oligosaccharides under conditions of non-NTP-regeneration

质的 ivBT 合成分为非 NTP 再生条件下糖质的 ivBT 合成和 NTP 再生条件下糖质的 ivBT 合成两大类。

1.2.1 非 NTP 再生条件下糖质的 ivBT 合成

ivBT 合成糖质的有效途径是把糖核苷的生物合成反应和糖基转移酶催化的反应结合在一起^[6, 28]。加利福尼亚大学戴维斯分校陈曦教授和南方科技大学的王鹏教授的课题组已经开发了多种高效的非 NTP 再生条件下的一锅多酶体系 (OPME, one-pot multienzyme, 包括糖核苷合成相关的酶和相应的糖基转移酶) 或称为酶催化模块 (Enzymatic Modules) 用于合成糖-核苷和包含了 9 个常见哺乳动物单糖 (GlcNAc、GalNAc、Gal、Glc、GlcA、Xyl、Man、Fuc、Neu5Ac) 之一及其衍生物的糖质 (图 1)。该技术通过模块化酶组分实现寡糖链的定向延伸, 显著简化了复杂寡糖的合成流程。OPME 系统通过精确控制单糖单元与糖苷键类型, 已成为高效生产多样化寡糖的核心工具^[6]。按一定顺序进行的 OPME 体系已经成功用于合成各种结构的糖质, 15 个天然 ABO 组织血型抗原糖链^[29]、O-甘露糖糖链的合成^[30, 31]、人乳寡糖 (Human Milk Oligosaccharides, HMOs) 的合成^{[32], [33]}。

1.2.2 NTP 再生条件下糖质的 ivBT 合成

为了降低 ATP、UTP、CTP、GTP 等 NTP 的成本, NTP 再生系统被引入了糖质的 ivBT 合

成 (图 2)。

2013 年, Wong 等人通过使用丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)/磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 再生系统实现了 UTP、CTP、ATP、GTP 等四种 NTP 的再生, 并成功用于的肿瘤相关的抗原 globopentaose (Gb5)、岩藻糖基化 Gb5 (Globo H) 及唾液酸化 Gb5 (SSEA4) 等糖质的克级制备^[34]。该再生系统也应用于非对称 HMOs 等糖质的合成^[35]。

2017 年, Rexer 等人通过使用单结构域的聚磷酸盐激酶 (polyphosphate kinase, PPK) 2 (1D-PPK2)/聚磷酸盐 (polyphosphate, polyP_n) 再生系统实现了 GTP 和 ATP 的再生, 并应用于脂质连接糖质的 ivBT 合成^[36]。

2021 年, Fang 等人通过使用乙酰磷酸盐 (acetyl phosphate)/乙酸激酶 (acetate kinase) 再生系统实现 ATP 的再生, 同时通过引入丙酮酸氧化酶 (pyruvate oxidase, PyoD) 和过氧化氢酶 (catalase) 把原位产生的磷酸盐转化为乙酰磷酸盐, 最终实现了乳糖-N-二糖 (Galβ1-3GlcNAc) (lacto-N-biose, LNB) 的 ivBT 合成, 但是需要价格昂贵的焦磷酸硫胺素 (TPP) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 作为辅因子^[37]。

最近, 我们课题组通过使用聚磷酸盐/聚磷酸盐激酶再生体系实现了 ATP、CTP、UTP 等 NTP 的

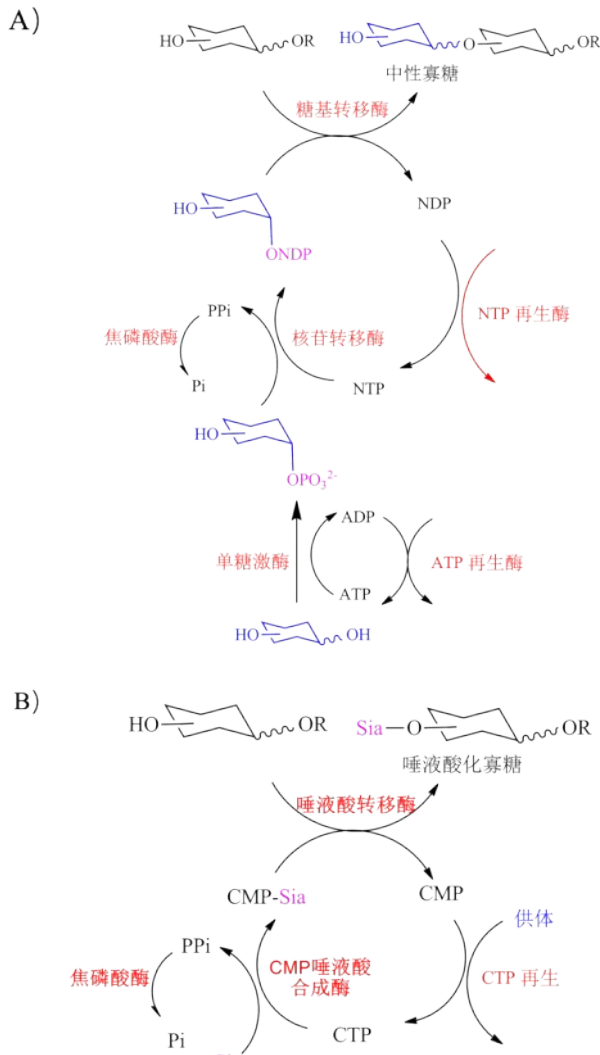


图2 NTP再生条件下中性(A)和唾液酸化(B)糖质的ivBT合成

Fig. 2 ivBT synthesis of neutral (A) and sialylated (B) oligosaccharides under conditions of NTP-regeneration

再生, 大大降低了NTP的用量和成本, 并成功应用于N-乙酰乳糖胺(N-acetyllactosamine, LacNAc)、6'-唾液酸乳糖胺(6'-SLN)、3'-唾液酸乳糖胺(3'-SLN)的5升规模高效制备, 产率都在90%以上, 为它们的产业化奠定了基础^[38, 39]。

综合比较来看, 由于PEP的价格非常昂贵(阿拉丁价格: 225元/克), 所以基于丙酮酸激酶/磷酸烯醇丙酮酸的NTP再生系统不适合应用于糖质的ivBT工业化生产。由于乙酰磷酸盐存在稳定性差的问题, 因此基于乙酰磷酸盐/乙酸激酶的

ATP再生技术不适合用于糖质的规模化ivBT合成^[27]。和其它用于NTP再生的磷酸盐供体相比, PolyPn非常便宜(阿拉丁价格: 114元/公斤)并且非常稳定, 是糖质ivBT工业化生产的最佳选择^[27]。

2 糖质ivBT生物合成的关键模块与应用

糖质ivBT生物合成的关键元件主要包括糖核苷合成、糖基转移、NTP再生等3个模块, 其中糖核苷合成和糖基转移是糖质ivBT合成的两个基本模块, NTP再生模块是为了解决NTP的高成本而引入的。

2.1 糖核苷合成模块

糖核苷合成模块主要由单糖激酶、核苷转移酶或糖核苷焦磷酸化酶、焦磷酸酶组成。

生成UDP-半乳糖(UDP-Gal)、UDP-N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)、UDP-GalNAc、UDP-GlcA等糖核苷的合成路线如图3所示, 首先在单糖激酶的催化下, 单糖和ATP反应生成单糖-1-磷酸盐, 然后在核苷转移酶或糖核苷焦磷酸化酶的作用下, 单糖-1-磷酸盐和UTP反应进一步转化为UDP-单糖和PPi。PPi作为副产物可能抑制反应进程。无机焦磷酸酶(Inorganic pyrophosphatase, EC: 3.6.1.1)通过水解焦磷酸(盐)生成无机磷酸(盐), 驱动尿苷转移酶或者糖核苷焦磷酸化酶反应的热力学平衡向产物方向移动^[6]。

UDP-Glc的合成路线包括: 葡萄糖首先被葡萄糖糖激酶(Glucokinase)催化转化为葡萄糖-6-磷酸盐, 然后在磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucomutase)的作用下异构为葡萄糖-1-磷酸盐, 随后葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶(glucose-1-phosphateuridylyltransferase)进一步催化葡萄糖-1-磷酸盐和GTP反应生成UDP-Glc和PPi(图4A)^[40]。传统的UDP-Xyl合成途径从葡萄糖开始, 至少需要5个酶, 并且涉及到NAD⁺依赖的氧化还原反应, 过程非常复杂(图4B)^[41, 42]。Voglmeir团队最近发现UDP-Xyl也可以通过UDP-Gal等尿苷二磷酸类糖核苷合成的

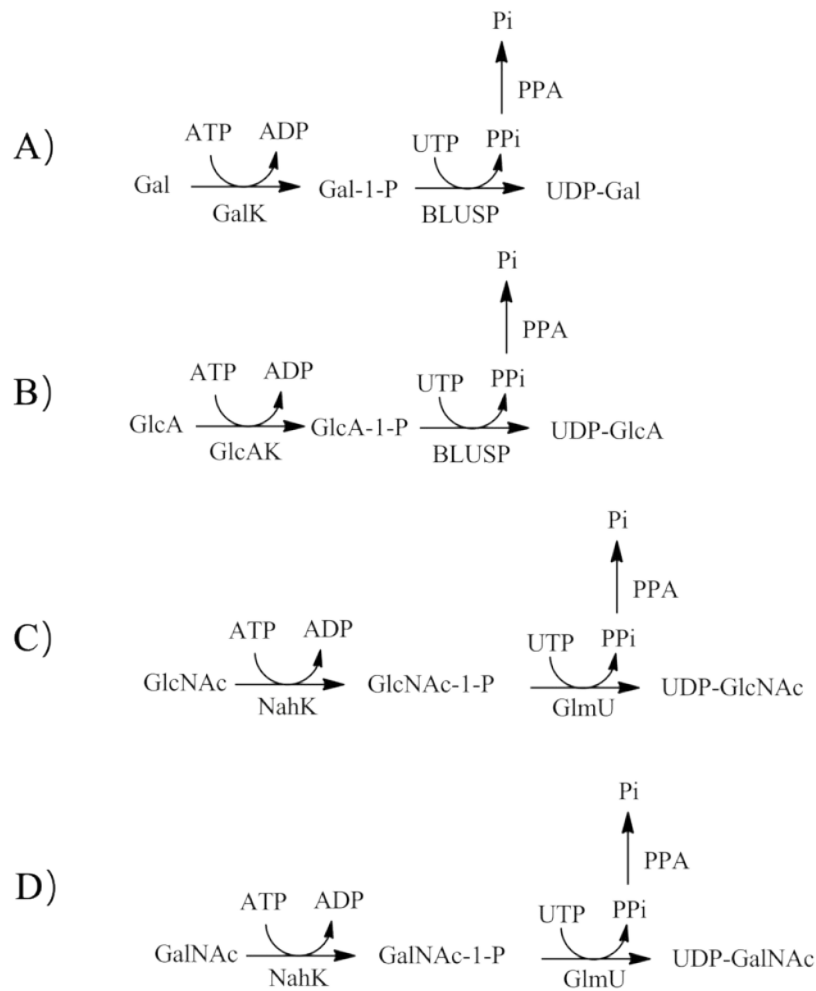


图3 UDP-Gal (A)、UDP-GlcA (B)、UDP-GlcNAcA (C)、UDP-GalNAcA (D) 的ivBT合成

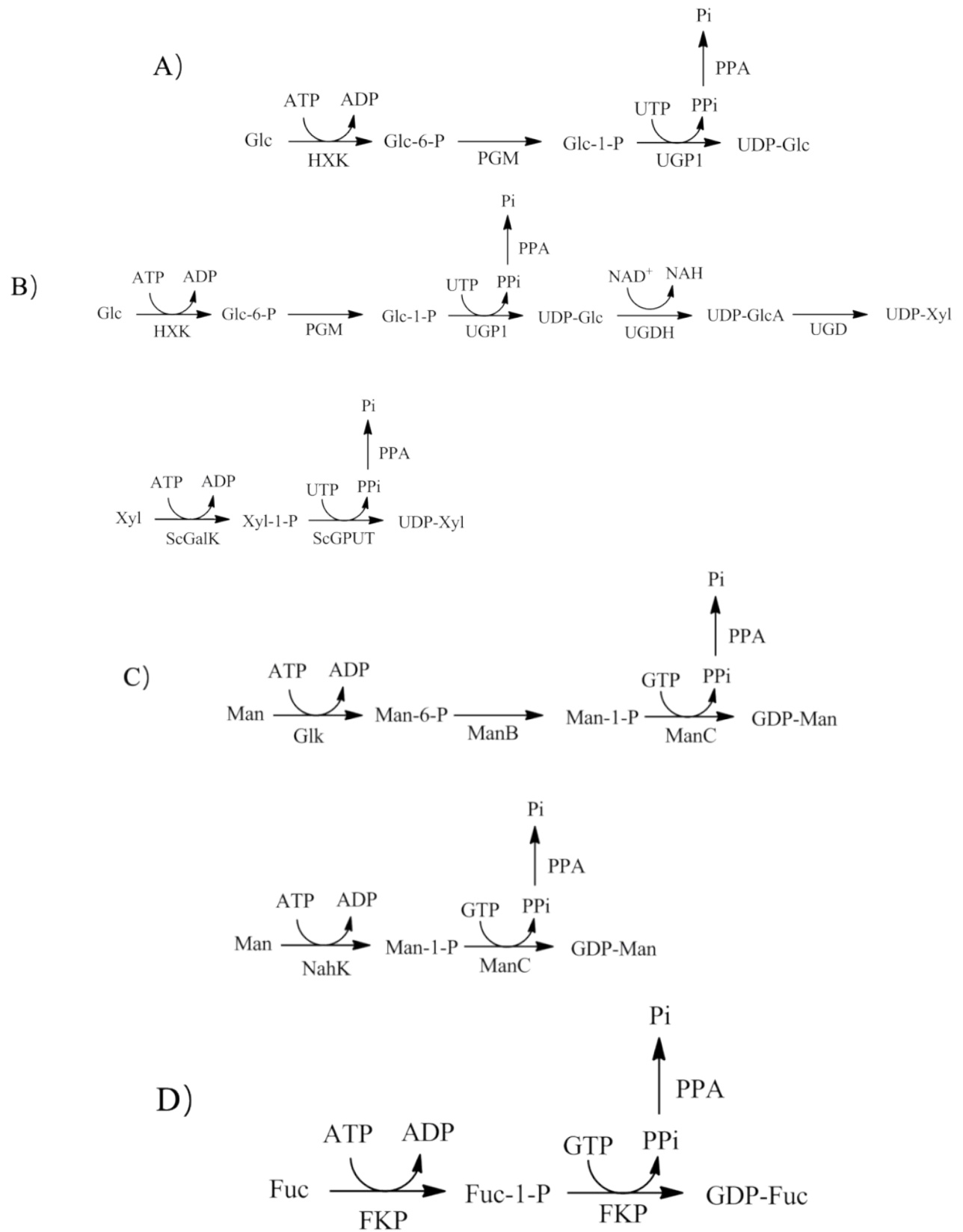
GalK: 半乳糖激酶; BLUSP: UDP-糖焦磷酸化酶; PPA: 焦磷酸酶; GlcAK: 葡萄糖醛酸激酶; NahK: *N*-乙酰己糖胺 1-激酶; GlmU: *N*-乙酰葡萄糖胺-1 磷酸尿苷酰转移酶或UDP-GlcNAc焦磷酸化酶

Fig. 3 ivBT synthesis of UDP-Gal(A)、UDP-GlcA(B)、UDP-GlcNAcA(C)、UDP-GalNAcA(D)

GalK: galactokinase; BLUSP: UDP-sugar pyrophosphorylase; PPA: pyrophosphatase; GlcAK: glucuronokinase; NahK: *N*-acetylhexosamine 1-kinase; GlmU: UDP-GlcNAc pyrophosphorylase or *N*-acetylglucosamine-1-phosphateuridylyltransferase

路线, 从木糖 (Xylose) 开始合成: 来源于沼泽红假单胞菌 (*Solitalea canadensis*) 的半乳糖激酶能催化木糖的 1-磷酸化, 来源于该菌的葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (glucose-1-phosphate uridylyltransferase) 进一步催化 1-磷酸化木糖和 UTP 反应生成 UDP-Xyl 和 PPi (图 4B)^[41, 42]。按照文献 GDP-Man 可以通过两个路线合成: A) 甘露糖首先被葡萄糖激酶 (glucokinase) 催化转化为甘露糖-6-磷酸盐, 然后在磷酸甘露糖变位酶 (phosphomannomutase) 的作用下异构为甘露糖-1-磷酸盐, 随后甘露糖-1-磷酸鸟嘌呤转移酶 (mannose-1-phosphate-guanylyltransferase) 进一步催化甘露糖-1-磷酸盐和 GTP 反应生成

GDP-Man 和 PPi (图 4C)^[36]; B) 甘露糖首先被底物广谱性的 *N*-乙酰己胺激酶 (NahK) 催化转化为甘露糖-1-磷酸盐, 然后 GDP-甘露糖焦磷酸化酶进一步催化甘露糖-1-磷酸盐和 GTP 反应生成 GDP-Man 和 PPi (图 4C)^[6]。GDP-岩藻糖 (GDP-Fuc) 是通过一个来源于脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragili*) 的双功能酶 FKP (具有岩藻糖激酶和 GDP-岩藻糖焦磷酸化酶的双功能活性) 催化岩藻糖和 GTP 反应合成的, 并伴有 PPi 的生成 (图 4D)^[6]。CMP-唾液酸是通过 CMP-唾液酸合成酶催化唾液酸和 CTP 反应合成的, 同时伴随着 PPi 的生成 (图 4E)^[6]。



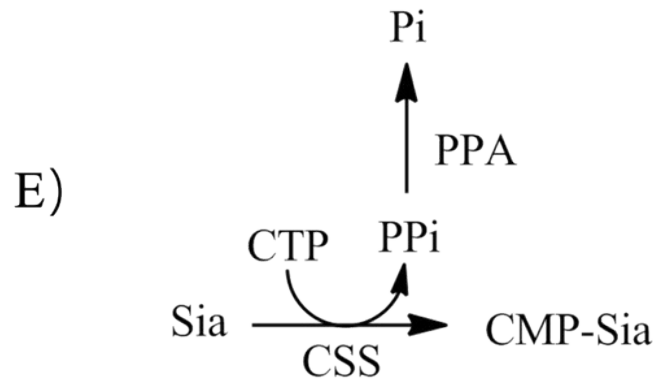


图4 UDP-Glc (A)、UDP-Xyl (B)、GDP-Man (C)、GDP-Fuc (D)、CMP-Sia (E) 的 ivBT 合成

HXK: 己糖激酶; PGM: 磷酸葡萄糖变位酶; UGP1: 葡萄糖-1 磷酸尿苷酰转移酶或 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶; UGHD: UDP-葡萄糖 6-脱氢酶; UGD: UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶; ScGalK: 来源于沼泽红假单胞菌的半乳糖激酶; ScGPUT: 来源于沼泽红假单胞菌的葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶或 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶; Glk: 葡萄糖激酶; ManB: 磷酸甘露糖变位酶; ManC: 甘露糖-1-磷酸鸟嘌呤转移酶或 GDP-甘露糖焦磷酸化酶; FKP: 岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶或岩藻糖-1-(双功能酶); CSS: CMP-唾液酸合成酶

Fig. 4 ivBT synthesis of UDP-Glc(A)、UDP-Xyl(B)、GDP-Man(C)、GDP-Fuc(D)、CMP-Sia(E)

HXK: hexokinase; PGM: phosphoglucomutase; UGP1: glucose-1-phosphateuridylyltransferase or UDP-glucose pyrophosphorylase; UGHD: UDP-glucose-6-dehydrogenase; UGD: UDP-glucuronate decarboxylase; ScGalK: galactokinase from *Solitalea canadensis*; ScGPUT: glucose-1-phosphate uridylyltransferase or UDP-Glc pyrophosphorylase from *Solitalea canadensis*; Glk: glucokinase; ManB: phosphomannomutase; ManC: mannose-1-phosphate-guanylyltransferase or GDP-Man pyrophosphorylase; FKP: fucokinase/GDP-Fuc pyrophosphorylase or fucose-1-phosphateguanylyltransferase; CSS: CMP-sialic acid synthetase

2.2 糖基转移模块

糖基转移酶 (Glycosyltransferases) 通过糖基供体 (含核苷磷酸或脂质磷酸离去基团) 催化糖苷键形成, 确保糖单元以特定连接方式添加至受体分子, 最终生成二糖、多糖或糖缀合物^[43, 44]。这些酶在构建复杂糖分子及其精准生物学功能整合中不可或缺。

针对 9 种常见的单糖 (GlcNAc、GalNAc、Gal、Glc、GlcA、Xyl、Man、Fuc、Neu5Ac), 通过不同的糖基转移模块把糖核苷活化的单糖转移到适当的受体上, 糖基转移模块主要包括: β 1,3-半乳糖转移酶、 β 1,4-半乳糖转移酶、 β 1,3-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶、 β 1,4-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶、 β 1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶、 β 1,3-葡萄糖醛酸转移酶、 β 1,4-葡萄糖醛酸转移酶、 α 1,2-岩藻糖转移酶、 α 1,3-岩藻糖转移酶、 α 1,4-岩藻糖转移酶、 α 2,3-唾液酸转移酶、 α 2,6-唾液酸转移酶、 α 2,8-唾液酸转移酶、 α 1,3-半乳糖基转移酶、 α 1,4-半乳糖转移酶、 α 1,3-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶、 α 1,4-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶、 β 1,4-N-乙酰氨基半乳糖转移酶、 β 1,4-甘露糖转移酶、 α 1,3-木

糖转移酶、葡萄糖转移酶, 等等^[6, 45, 46]。

2.3 NTP 再生模块

NTP 是 ivBT 合成糖质所必需的一个原料, 但是由于 NTP 的价格比较昂贵, 导致糖质的 ivBT 成本大大升高, 所以实现 NTP 的高效、经济再生是必须要解决的一个问题^[27]。关于 NTP 的再生模块, 已经有很多研究, NTP 再生模块主要包括乙酰磷酸 (acetyl phosphate)/乙酸激酶 (acetate kinase, AK)、聚磷酸盐 (polyphosphate)/聚磷酸盐激酶 (polyphosphate kinase, PPK)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase)/磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate)、磷酸肌酸 (creatine phosphate)/肌酸激酶 (creatine kinase)^[27]。最近有人报道通过电化学再生 ATP^[47-49], 为 ATP 的再生开发了一条新途径。

2.3.1 基于乙酰磷酸盐/乙酸激酶的 NTP 再生系统

虽然乙酰磷酸盐在水溶液中不是很稳定 (25 °C、pH 7.0 条件下的半衰期为 21 小时), 但是由于它可以从简单原料大量进行合成, 该再生系统已经广泛用于 NTP 再生^[27]。乙酰磷酸盐的磷酸盐供体电势 (ΔG^0 , -10.1 kcal/mol) 略低于 PEP 的

(ΔG^0 , -10.1 kcal/mol), 并且不抑制乙酸激酶的活性^[27]。

从半乳糖和尿苷酸 (uridine monophosphate, UMP) 出发, 该再生系统成功应用于 UDP-Gal 的 ivBT 合成, 产量达到 95%。该方法用于 UDP-Glc 的合成^[50]。Fang 等人将该 NTP 再生系统应用于乳糖-N-二糖的合成^[37]。Lee 等人将该再生系统应用于 CMP-Sia 的合成及 3'-唾液酸乳糖胺 (3'-sialyl-N-acetylactose, 3'-SLN) 的合成^[51]。

2.3.2 基于聚磷酸盐/聚磷酸盐激酶的 NTP 再生系统

聚磷酸盐激酶 (PPK) 参与了聚磷酸盐的合成和利用, 根据氨基酸序列和动力学性质的不同, PPK 主要分为两个家族: PPK1 和 PPK2^[52]。PPK1 主要负责胞内由 ATP 合成聚磷酸盐, 但是也催化逆反应: 聚磷酸盐驱动的 ATP 合成。大肠杆菌 PPK1 的底物特异性的顺序为 ATP > GD P > UDP > CTP。因此, 很明显 PPK1 对嘌呤核苷的选择性优于嘧啶核苷。和 PPK1 相比, PPK2 优先催化逆反应: 即聚磷酸盐驱动的 NTP 合成, 并且 PPK2 优选 GDP 为底物。PPK2 进一步分为三个亚家族: 亚家族 1、亚家族 2 和亚家族 3。其中亚家族 1 催化 NDP 转化为 NTP, 亚家族 2 催化 NMP 直接转化为 NTP, 亚家族 3 则能同时催化上述两类反应。由于来源于玫瑰杆菌 (*Silicibacter pomeroyi*) 的一个 PPK2 对嘧啶核苷的选择性优于嘌呤核苷, 有人把这个特殊的 PPK2 家族又称为 PPK3 家族^[52, 53]。

聚磷酸盐 (PolyPn) 是一类由几个到几百个磷酸盐组成的线性高分子化合物。和其它用于 NTP 再生的磷酸盐供体相比, PolyPn 非常便宜, 适合工业化生产, 但给后续的分离纯化带来一定的问题^[16, 54]。从半乳糖和尿苷酸 (uridine monophosphate, UMP) 出发, 该再生系统可以应用于 UDP-Gal 的 ivBT 合成, 转化率在 50% 左右^[55]。该再生体系成功应用于 N-乙酰乳糖胺、6'-SLN、3'-SLN 的高效、低成本制备^[38, 39]。

2.3.3 基于丙酮酸激酶/磷酸烯醇丙酮酸的 NTP 再生系统

该 NTP 再生系统的主要优势在于磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 在水溶液中的稳定性 (pH7.0、25 °C 条件下的半衰期为 10³ 小时) 和作为磷酸盐供体的强度

(pH7.0 时水解的标准自由能为 -12.8 kcal/mol)^[27]。高稳定性使该 NTP 再生系统特别适合较慢的反应。然而生成的丙酮酸对丙酮酸激酶有抑制作用, 所以该再生系统参与的反应需要在稀溶液里进行。该 NTP 再生系统已经应用于多种糖质的 ivBT 合成^[34, 35]。然而, 由于丙酮酸不容易制备, 并且被认为是最贵的磷酸盐供体。因此, 该 NTP 再生系统不适合应用于工业化生产^[27]。

2.3.4 基于磷酸肌酸/肌酸激酶的 NTP 再生系统

磷酸肌酸参与了细胞的能量代谢, 它水解释放磷酸盐后产生的自由能为 -43.1 kJ/mol, 远高于 ATP 水解释放的自由能 (-30.6 kJ/mol)。虽然该 NTP 再生系统被用的比较少, 但是由于它对 ADP 的 K_m 比较小和相对较低的价格, 它被认为是可替代乙酰磷酸盐/乙酸激酶和聚磷酸盐/聚磷酸盐激酶的一个选择^[27]。Zhang 等人把该再生系统应用于 α 2,3-唾液酸化糖质的 ivBT 合成^[56]。

3 糖质 ivBT 合成的关键技术与应用

3.1 基于酶固定化的糖质的 ivBT 合成

酶作为天然的生物催化剂, 具有高选择性, 高活性等优点, 目前已在食品、医药、纺织、污水处理等领域内被广泛应用^[57]。酶的活性很大程度上取决于反应条件, 在实际应用场景中, 高温、强酸、强碱、金属离子和有机溶剂等因素都会影响酶的活性, 甚至引起酶的失活。固定化技术通过以下方式克服这些局限: 在最优条件 (如 pH 值、有机溶剂环境及温度) 下提升酶催化活性^[58], 并实现对底物特异性、对映体选择性及整体反应效能的调控^[59, 60]。此外, 酶固定化还可促进酶的重复利用、通过添加/移除酶实现反应的快速启停、简化下游加工工序、避免产物污染, 并降低整体工艺成本^[61, 62]。

3.1.1 基于次氨基三乙酸镍 (Ni-NTA) 的酶固定化的糖质的 ivBT 合成

金属螯合亲和层析介质, 又称固定金属离子亲和色谱, 其原理是利用蛋白质表面的组氨酸能够与 Ni²⁺、Co²⁺ 等过渡金属离子发生配位作用, 能够吸附富含组氨酸的蛋白质, 从而达到分离纯化

的目的。Ni-NTA亲和层析介质具有螯合镍稳定、能够耐受更高的还原剂、物理和化学稳定性好等优点，广泛用于蛋白质的分离纯化，并且已经有研究把Ni-NTA应用于酶的固定化研究。

2001年，Chen等人通过使用基于Ni-NTA的“超级珠子”（“Superbeads”）共固定化了UDP-Gal再生需要的4个带有组氨酸标签的酶：半乳糖激酶（GalK）、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶（GalT）、葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶或称为UDP-葡萄糖焦磷酸化酶（GalU）、丙酮酸激酶（PK）等，成功用于系列寡糖的半乳糖基化，产量都在70%以上^[63]。

在此基础上，王鹏教授团队进一步通过使用上述“超级珠子”共固定化7个带有组氨酸标签的酶，包括半乳糖激酶（GalK）、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶（GalT）、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶（GalU）或葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶、焦磷酸酶（PPA）、UMP激酶（UMK）、核苷酸二磷酸激酶（NDK）、聚磷酸盐激酶（PPK），构建了固定化酶的柱状反应器，以半乳糖、UMP、聚磷酸等便宜原料用于UDP-Gal的合成^[55]。

3.1.2 基于酿酒酵母孢子的酶固定化的糖质的ivBT合成

酿酒酵母孢子的细胞壁结构从内到外由甘露聚糖、葡聚糖、壳聚糖和双酪氨酸四层组成。作为一种新型的天然载体，酿酒酵母的孢子可以应用于酶的固定化。酿酒酵母孢子将分泌表达的可溶性酶保留在孢子壁周质空间中，该空间位于双酪氨酸和壳聚糖层之间，形成酶胶囊，而小分子很容易通过。并且孢子封装的酶通常可重复使用，耐环境，便于储存和分离，因此被认为是一种有前景的固定化酶技术。Gao等人成功地在酿酒酵母孢子中表达了一些分泌型可溶性酶，以产生酶胶囊，这些酶胶囊进一步应用于生产L-核糖、阿洛酮糖等稀少糖^[64, 65]。

2023年，Chao等人使用酿酒酵母表达半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶，并诱导其产孢子，得到孢子固定化的半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶，并用固定化酶成功催化合成了多种复杂结构的唾液酸化寡糖，包括人乳寡糖、N-糖链生物标志物、O-甘露糖链、O-N-乙酰氨基半乳糖（GalNAc）糖

链等^[66]。

3.1.3 基于金属有机框架(MOF)的酶固定化的糖质的ivBT合成

金属有机框架（metal-organic framework, MOF）是由金属离子与有机配体组成的多孔晶体材料，因其具有高比表面积、高孔体积、可调孔隙率、良好的生物相容性、高热稳定性和高化学稳定性等优异性能而被认为是理想的固定化酶载体，使其能够实现仿生分区室固定化酶，为多酶分子创造类似细胞器中的隔间^[67]。MOF的孔道结构和拓扑结构多种多样，能够以表面吸附、共价键合，孔包封和共沉淀的方式与酶分子结合^[67, 68]。MOF作为近几年新发展起来的一种新型的固定化酶的技术，已广泛用于葡萄糖优化酶、辣根过氧化物酶、脂肪酶和脲酶等酶的固定化。MOFs作为一种新型固定化酶载体引起了科研人员极大的研究兴趣^[69, 70]。MOFs能将酶固定在一个有限空间的微环境中，当多种酶被同时固定在MOFs中时，酶的活性中心之间的距离相较于游离体系大大缩短，从而增加多酶级联反应速率，使MOFs在多酶共固定化领域极具应用潜力^[67]。

基于空间隔离的酶模块组装（Modular-Enzymes Assembly by Spatial Segregation, MASS）策略，2023年Zhang等人开发了一个通用的酶固定化平台，即通过腔室化的MOF颗粒组装多个糖酶（glycoenzymes）（包括单糖激酶、单糖-1-磷酸尿苷酰转移酶、糖基转移酶等）以及基于聚磷酸激/聚磷酸激酶的NTP再生系统，并把该技术平台成功用于糖基供体（糖核苷）、二糖、寡糖及多糖等的合成^[71]。

由于分级多孔MOF（hierarchically porous MOF, HP-MOF）具有较大表面积、较大孔径，使得酶分子被固定在较大的介孔中，小分子底物在微孔中富集并扩散到介孔中，从而提高反应速率，因此HP-MOF越来越受到研究人员的重视。2024年，Peng等人使用MIL53（一种HP-MOF）共固定化了胞苷磷酸-唾液酸合成酶和 α -2,6-唾液酸转移酶，MIL53固定化酶的能力达到了226 mg/g，高效合成了6'-唾液酸乳糖（6'-SL），固定化酶表现出了较高的热稳定性、pH稳定性和储藏稳定性，重复使用13次后产率仍在80%以上^[72]。

3.1.4 基于有机硅网络的全细胞固定化的糖质的 ivBT 合成

在自然界中,生物体制造分子框架,为软组织提供外骨骼保护和结构支持。由此产生的结构相对于其组成表现出优异的机械性能。重要的是,这些结构显著提高了功能性生物大分子在需要增强热稳定性、耐有机溶剂性或延长寿命的工业应用中的潜力。最近的研究表明,用保护壳涂覆细胞,如MOF、矿化氧化物和多酚,在生物医学领域表现出良好的应用前景,但由于生物制造领域合成方法的繁琐和高成本,这些细胞涂覆方法难以在实际应用中使用^[73]。

Han等人通过在表达了一个嗜热酶的枯草芽孢杆菌表面涂覆有机硅网络(OSN, organosilica network)构建了一个半人工细胞工厂(SACF, semiartificial cell factory)。作者将五个分别涂覆OSN的全细胞混合,以组装整个从淀粉合成塔格糖的ivBT途径。优化涂层条件后,SACF表现出99.5%的相对活性,并且寿命延长。在20次重复使用长达480小时后,SACF保持了50%以上初始的活性^[73]。

3.2 基于微流控平台的糖质的 ivBT 合成

微流控(Microfluidics)指的是使用微管道(尺寸为数十到数百微米)处理或操纵微小流体(体积为皮升到纳升)的系统所涉及的科学和技术,是一门涉及化学、流体物理、微电子、新材料、生物学和生物医学工程的新兴交叉学科。因为具有微型化、集成化、易于自动化等特征,微流控装置通常被称为微流控芯片,也被称为芯片实验室(Lab on a Chip)^[74]。微流控的重要特征之一是微尺度环境下具有独特的流体性质,如层流和液滴等。借助这些独特的流体现象,微流控可以实现一系列常规方法所难以完成的微加工和微操作。目前,微流控被认为在生物医学研究中具有巨大的发展潜力和广泛的应用前景^[74]。

2009年, Martin等人首先把硫酸肝素固定在磁性纳米颗粒上,然后在基于液滴的数字微流控(Digital Microfluidics, DMF)平台上通过使用D-葡萄糖胺基3-O-磺基转移酶对肝素进行修饰,但是

转化率只有5%左右^[75]。

2020年, Gong等人首先把生物素标记的N-乙酰氨基葡萄糖固定在链霉亲和素修饰的磁珠上,然后通过按顺序的一锅多酶体系在超高频声微流控平台(ultrahigh-frequency-acoustofluidics, UHFA)上固相条件下合成了生物素标记的6'/3'-唾液酸乳糖胺(6'/3'-sialyl-N-acetylglucosamin),产量>64%^[76]。

通过把数字微流控(DMF)平台、磁珠及酶模块(包括糖核苷合成酶和糖基转移酶)合成糖链等技术整合,在DMF平台上完成了11种人乳寡糖的自动合成,产量大都在90%以上(图5)^[77, 78]。

3.3 基于酶法糖质自动合成仪的糖质的 ivBT 合成

多肽和DNA合成仪的开发,带来了多肽/蛋白质和寡核苷酸/核酸获取途径的革命,极大地推动了生命科学的发展。糖质研究已成为继蛋白质和核酸研究之后探索生命奥秘的第三个里程碑^[2]。由于糖质类化合物结构固有的复杂性,想要获得结构明确、性质均一的糖质类化合物,往往需要具有高度专业技能的人员通过手工合成来完成,耗时费力。糖质的高效获取问题已成为制约糖科学发展的瓶颈,是一项极具挑战性的工作^[3, 79]。

糖科学家也希望糖质的合成能够像多肽和寡核苷酸那样在自动合成仪上实现。近些年来,关于糖质自动合成仪的研究发展十分迅速。糖质自动合成仪主要包括化学法和酶法两大类。Seeberger教授课题组开发了基于多肽合成仪改装的自动糖质固相化学合成仪,该合成仪已用于多种寡糖和多糖等糖质的合成,已经商业化^[3, 80]。但是糖质固相合成仪存在转化率和合成效率比较低等问题,因此2022年叶新山教授课题组开发了基于预激活策略的自动糖质液相化学合成仪,成功实现了1080聚糖的合成^[81]。

由于酶催化合成糖质具有选择性高、反应条件温和、环境友好等优点,所以酶催化自动合成糖质日益受到重视^[79]。

1994年, Wong等人首次报道了基于酶促糖基化和固相合成策略的自动糖质合成。首先通过化学方法把连接第一个单糖的糖肽固定在氨丙基硅

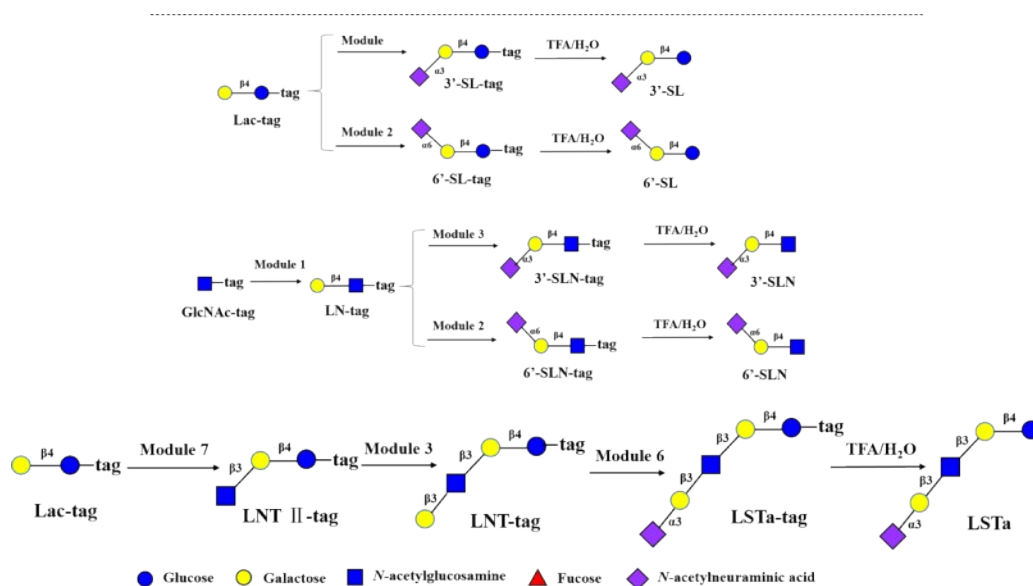


图5 基于数字微流控的HMOs的ivBT合成^[78]

Fig. 5 ivBT synthesis of HMOs on the DMF platform

胶上，然后通过通过使用不同的糖基转移酶合成了唾液酸化路易斯X糖肽等；同年，该团队把N-乙酰乳糖胺（3GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal）固定到具有可控孔径的玻璃上，然后通过按顺序的酶催化合成把半乳糖和唾液酸依次转移到N-乙酰乳糖胺上，成功合成了抑制幽门螺旋杆菌粘附的四糖（NeuAca2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal）^[82, 83]。

2010年，Nishimura等基于高效液相（HPLC）设备开发了一种人工高尔基体糖质合成仪，该仪器利用G7聚酰胺-胺（poly（amidoamine），PAMAM）树枝状聚合物作为载体进行糖质的全自动酶促合成。历时四天，该仪器成功合成了唾液酸Lewis X四糖衍生物，但产率只有16%。低收率主要是由纯化步骤中的产物损失，以及糖基转移酶与聚合物载体的不相容导致的^[84]。

2018年，王鹏教授团队通过改进肽合成仪，是第一台以酶为基础的糖质合成仪，实现了机器驱动的酶促自动化糖质合成。他们引入了一种温敏性高分子材料聚N-异丙基丙烯酰胺（poly（N-isopropylacrylamide），PNIPAM）作为载体。当环境温度低于临界溶液温度时，PNIPAM可以溶解在水溶液中，载体上所带的糖基受体进行酶促糖基化反应。当温度升高时，PNIPAM分子内形成氢键从而发生聚集和沉淀，然后利用超滤实现糖链产物的分离纯化。例如以16%的总收率（三步）制

备四糖唾液酸Lewis X。这种方法可用于制备简单的三糖、四糖和糖肽，转化率低且不能去除酶是阻碍其大范围应用的原因之一^[85]。2020年，该团队通过使用肽合成仪以及基于氨基硅橡胶树脂的固定化载体，合成了带有三糖的糖肽，然后依次通过使用不同的糖基转移酶半自动化合成了复杂结构的糖肽^[86]。

2019年，Boons等人建立了酶介导糖质合成的自动化平台，使用萘二磺酸盐标签（7-(2-(2-(N-methyl-aminooxy)ethoxy)ethoxy)naphthalene-1,3-disulfonic acid），可以自动执行多达15个反应循环，而无需冻干或交换缓冲液步骤，大大简化了产物的纯化过程。在该平台上可以合成不同结构的复杂糖链，包括聚-N-乙酰基乳糖胺衍生物、HMOs和N-糖链等^[87]。

综上所述，虽然糖质的自动化合成取得了一定的进展，但仍然存在一些不足，例如，难以实现糖质的克级合成，产率通常比较低，需要解决高灵敏度在线检测和高效分离的问题，还没有实现真正的糖质的自动化合成，等等。因此，糖质自动合成仪的发展任重道远。

3.4 基于动力学模拟的糖质的ivBT合成

基于数学动力学模型的糖质的ivBT合成的研

究还非常少, Rexer等通过动力学模拟估算 GDP-Man 的浓度^[36], Mahour等根据提供的实验条件, 通过动态动力学模拟预测 UDP-GlcNAc 的合成情况^[88]。

通过基于实验和模拟的综合时间过程研究, Schelch等人最近把 3'-SL 的产率提高到 75% (10.4/g/L), 初始生产能力提高了 1 倍达到 15/g/L/h。通过基于模拟的优化把酶的使用量降到最低 (节省了 43%), 突出了工程分析对多酶催化合成寡糖的重要性^[89]。

3.5 基于离子酶的糖质的 ivBT 合成

离子液体 (ionic liquids, ILs) 是指由阴阳离子对组成的液体, 具有不易挥发、较好的化学稳定性和热稳定性等特点。^[90] 自 1914 年首次被发现以来, 离子液体的发展已历经三代^[91]。

离子液体能够提高底物的溶解度、提高酶活和增强酶的稳定性, 从而显著提高酶的催化效率。^[92, 93] Ji 等人发现在 0.05% (v/v) 胆碱脯氨酸 ([Ch][Pro]) 和四甲基胍苯酚 ([TMGH][PhO]) 存在的情况下, 甲酸脱氢酶固定 CO₂ 的活性提高了 142 倍。^[94] 离子液体与 CO₂ 形成活性中间体, 增加底物的溶解度, 并通过增强溶剂化层提升了酶的稳定性。此外, 离子液体缩短了还原型辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 与 CO₂ 的距离并在酶的活性位点形成新的氢键从而提高了酶活。基于上述结果他们发现离子液体能改变酶周围的微环境并提出了“离子酶” (ionozyme) 的概念, 即在特定离子液体中的酶促反应体系。Li 等人的研究发现 0.01% (w/v) 胆碱丝氨酸 ([Ch][Ser]) 和 1-乙基-3-甲基咪唑氯盐 ([Emim]Cl) 分别使赖氨酸脱羧酶的催化活性提高了 16.2% 和 24.2%。[Ch][Ser] 和 [Emim]Cl 改变了酶的二级结构并促进了酶与底物的结合^[95]。

目前关于离子液体在生物合成寡糖中的应用主要集中在 β -半乳糖苷酶催化的半乳糖基化寡糖的合成。Lang 等人发现在 45% (v/v) 1,3-二甲基咪唑硫酸甲酯盐 ([Mmim][MeSO₄]) 中, 以乳糖作为糖基供体, D-木糖和甘油作为糖基受体时, β -半乳糖苷酶的活性分别增加了 1.3 倍和 3.1 倍。^[96]

Sandoval 等人发现多种咪唑类离子液体均可以增强 β -半乳糖苷酶合成 Gal β -1, 4-GlcNAc 的能力^[97]。Carlos 等人发现 1-正丁基-3-甲基咪唑鎓六氟磷酸盐 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim][PF₆]) 可以增强 β -半乳糖苷酶合成 Gal β -1, 3-GalNAc 和 Gal β -1, 3-GlcNAc 的产率, 分别达到 97% 和 99%^[100]。^[98]

我们团队最近研究发现, 离子液体通过不同的机制影响 Pd26ST 和 NmCSS 的活性及动力学参数, 从而提高了它们催化合成 6'-SL 的能力 (未发表结果)。

4 展 望

ivBT 技术是工业生物制造的新前沿, 不仅具有高产品得率、高制造强度和低制造成本的技术特色, 而且具有技术保密性强和生物安全性高的产业化特性。ivBT 已经成为合成糖质的一个重要技术平台。但是 ivBT 技术体系合成糖质面临许多挑战: 1) 酶的协同性问题。酶是 ivBT 的基础元件, ivBT 工艺要求多种酶在同一 pH、温度及反应介质条件下高效稳定运行。然而, 不同酶的最适反应条件往往存在差异, 导致其对参数波动极为敏感。酶间的不相容性可能引发活性降低、抑制效应、结构降解或稳定性丧失, 迫使系统设计时需进行多方面权衡以保证酶的协同催化^[26]。尤其需要加强 AI 在这方面的应用潜力。2) 降低特殊重组酶的生产成本。工业生产分泌酶的成本大约是 100 元/千克酶 (干重), 工业生产胞内重组高温酶的成本已经低至 250 元/千克酶 (干重)^[16]。但是, 工业生产胞内重组非高温酶的成本仍然比较高, 另外对于一些酶 (如哺乳动物来源的糖酶等), 它们通常难以在大肠杆菌、毕赤酵母等表达系统有效表达, 甚至经常形成包涵体, 很难得到较高活性的酶, 因此它们通常由细胞表达生产, 导致它们的生产成本高、技术难度大以及工业放大难, 限制了 ivBT 用于某些糖质的大规模生产和应用 (如二唾液酸乳-N-四糖 DSLNT 和分支 HMOs 的合成, 等等)。因此, 需要开发普适性超低成本重组酶生产技术, 降低酶元件的生产成本。3) 建立基于仿生辅酶循环再生技术。仿生辅酶具有成本低

与稳定性好等优点^[16]。目前NTP再生主要通过乙酰磷酸盐/乙酸激酶、聚磷酸盐/聚磷酸激酶、丙酮酸激酶/磷酸烯醇丙酮酸、磷酸肌酸/肌酸激酶等再生系统，但都或多或少存在一定的局限性，如成本过高、稳定性差、影响后续的分离纯化问题等^[27, 54]。需要开发能有效替代传统NTP再生的技术。虽然已有通过电化学再生ATP的报道，但仅限于实验室研究，离工业化应用还很遥远^[47-49]。4) 多酶复合体用于ivBT合成糖质的开发。与体外游离酶混合体系不同，体内许多反应通过多酶复合体（又称代谢体）完成。这些复合体通过翻译后自组装形成有序的生物合成级联，并通过蛋白-蛋白相互作用稳定。丙酮酸脱氢酶复合体（PDHc）是最早被发现的多酶系统之一^[99]，其包含多个酶，可依次将丙酮酸转化为乙酰辅酶A。依据这一自然现象，多酶组装策略相较于单酶的显著优势受到工业界高度关注^[100, 101]。多酶复合体通过级联催化实现更高效、协调的反应：邻近酶的聚集不仅提升整体反应速率（底物直接从一个活性位点传递至下一个），还通过代谢通道效应减少中间体损失并加速反应进程^[102, 103]。开发多酶复合体用于糖质的ivBT合成是就来的发展趋势。5) 硫酸化糖质的ivBT合成。由于硫酸化糖质的体外合成需要使用3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸（3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS）作为硫酸基团的供体，而PAPS供体非常昂贵，需要解决其循环再生问题。关于PAPS的再生研究虽然已有报道，但也仅限于实验室的研究^[104]。6) ivBT反应条件优化的问题。目前，所有ivBT反应基本上是通过逐个反应条件优化实现的，重复性工作非常多并且非常耗时，因此需要耗费大量的人力、物力和财力。急需开

发AI辅助湿实验优化反应条件的技术，提高反应条件优化的效率。

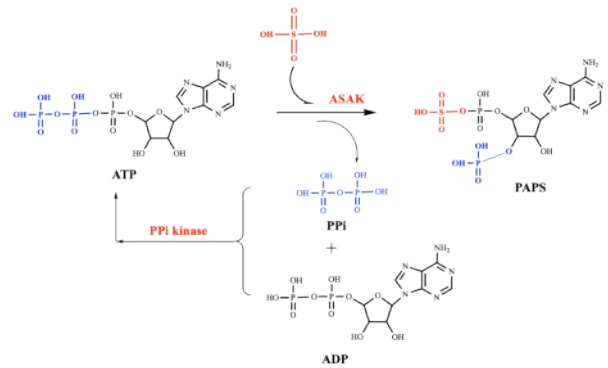


图6 PAPS的再生^[104]

ASAK: 双功能酶, ATP 硫酸化酶 + 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸激酶

Fig. 6 Regeneration of PAPS

ASAK: bifunctional enzyme, ATP sulfurylase + 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate kinase

细胞工厂已成功应用于糖质的商业化生产，如丹麦的 Glycom 公司（已被帝斯曼收购）和德国的 Jennewein（已被科汉森收购）通过细胞工厂生产 2'-FL（2'-岩藻糖乳糖）、LNnT、6'-SL 等系列 HMOs 产品，等等，但是 ivBT 合成糖质的商业化案例还相对较少。2016 年，中国科学院天津工业生物技术研究所张以恒研究员开发的 ivBT 肌醇合成技术转让给相关企业，建成年产万吨肌醇生产线并全面投入生产，是全球第一个体外合成生物学或 ivBT 的工业化成功范例^[16]。另外，韩国的 GeneChem 公司以 GlcNAc 和乳糖作为底物，通过 ivBT 技术合成 3'-SL，并且获得了美国 FDA（Food and Drug Administration，食品药品监督管理局）的 GRAS（Generally Recognized as Safe，一般认为安全）认证（GRN 766）。因此，ivBT 合成糖质的商业化步伐急需加快。

表2 ivBT和细胞工厂的优劣势比较

Table 2 Comparison of pros and cons of ivBT and cell factory

	优势	劣势
ivBT	用几个工程菌株表达酶,每个菌株的负担轻;已知HMOs结构有不到20种糖苷键,只需要构建相应模块就可以合成所有的HMOs;能保证每步酶催化反应的转化率在90%以上;反应的副产物少,分离纯化相对简单;不需要解决产物进出细胞的问题	需要解决能量ATP再生和还原力平衡的问题;酶的成本问题
细胞工厂	生产过程相对简单;不需要解决能量ATP再生和还原力平衡的问题。	所有的基因都在一个菌株里,菌株的负担重;一个产品就要构建一个细胞工厂;不能保证每一步反应的转化率都在90%以上;细胞工厂的代谢产物复杂,给后面的分离纯化带来难度;需要解决产物进出细胞的问题;高效细胞工厂的构建复杂、繁琐。

综合比较 ivBT 和细胞工厂的优劣势 (表 2), ivBT 在反应精准度与转化率上占优, 但规模化受限于酶成本及稳定性; 细胞工厂凭借自协调代谢更适合大规模生产, 却面临代谢调控复杂性挑战。未来的发展趋势是将二者互补融合, 即: 简单分子用细胞工厂合成, 复杂分子依赖 ivBT 合成。

总之, ivBT 合成糖质是一个新型的生物制造平台, 目前还处于技术高速发展阶段与产业化初级阶段, 随着各项支撑技术的不断进步与成熟, 将在糖质的生物制造中发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

- [1] VARKI A, CUMMINGS R D, ESKO J D, et al. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY). 2022.
- [2] *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future*. Washington (DC). 2012.
- [3] SEEBERGER P H. The logic of automated glycan assembly [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2015, 48(5): 1450-1463.
- [4] BOLTJE T J, BUSKAS T, BOONS G J. Opportunities and challenges in synthetic oligosaccharide and glycoconjugate research [J]. *Nature Chemistry*, 2009, 1(8): 611-622.
- [5] HSU C H, HUNG S C, WU C Y, et al. Toward automated oligosaccharide synthesis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(50): 11872-11923.
- [6] YU H, CHRN X. One-pot multienzyme (OPME) systems for chemoenzymatic synthesis of carbohydrates [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016, 14(10): 2809-2818.
- [7] MUTHANA S, CAO H, CHEN X. Recent progress in chemical and chemoenzymatic synthesis of carbohydrates [J]. *Current Opinions in Chemical Biology*, 2009, 13(5-6): 573-581.
- [8] ZHANG Y H P, MYUNG S, YOU C, et al. Toward low-cost biomanufacturing through in vitro synthetic biology: bottom-up design [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(47): 18877-18886.
- [9] LOPEZ-GALLEGO F, SCHMIDT-DANNERT C. Multi-enzymatic synthesis [J]. *Current Opinions in Chemical Biology*, 2010, 14(2): 174-183.
- [10] VASIC-RACKI D, FINDRIK Z, PRESCKI A V. Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(4): 845-856.
- [11] VILKHOVOY M, ADHIKARI A, VADHIN S, et al. The Evolution of Cell Free Biomanufacturing [J]. *Processes*, 2020, 8(6): 675.
- [12] JAROENTOMEENCHAI T, TAW M N, Li M, et al. Cell-Free Synthetic Glycobiology: Designing and Engineering Glycomolecules Outside of Living Cells [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 645.
- [13] LUO S, LIN P P, NIEH L-Y, et al. A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system [J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(2): 154-162.
- [14] 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.
- [15] 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
- [16] 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
- [17] BHOSALE S H, RAO M B, DESHPANDE V V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase [J]. *Microbiological reviews*, 1996, 60(2): 280-300.
- [18] DEMAIN A L. Pickles, pectin, and penicillin [J]. *Annual Review Microbiology*, 2004, 58: 1-42.
- [19] TAHERZADEH M J, KARIMI K J B. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review [J]. *BioResources*, 2007, 2(4): 707-738.
- [20] WICHMANN R, VASIC-RACKI D. Cofactor regeneration at the lab scale [J]. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 2005, 92: 225-260.
- [21] KOELLER K M, WONG C H. Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies [J]. *Chemical Reviews*, 2000, 100(12): 4465-4494.
- [22] THIBODEAUX C J, MELANCON C E, LIU H W. Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification [J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1008-1016.
- [23] THIBODEAUX C J, MELANCON C E, LIU H W. Natural-Product Sugar Biosynthesis and Enzymatic Glycodiversification [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(51): 9814-9859.
- [24] 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.
- [25] DURDA V-R. History of industrial biotransformations-dream and realities [M]. Weinheim: Wiley-VCH, KGaA, 2006.
- [26] FRANCE S P, HEPWORTH L J, TURNER N J, et al. Constructing Biocatalytic Cascades: In Vitro and in Vivo Approaches to de Novo Multi-Enzyme Pathways [J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(1): 710-724.
- [27] DING Q B, OU L. NTP Regeneration and its Application in the Biosynthesis of Nucleotides and their Derivatives [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23(45): 6936 - 6947.

- [28] 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.
- [29] YE J, LIU X, PENG P, et al. Diversity-Oriented Enzymatic Modular Assembly of ABO Histo-blood Group Antigens [J]. *ACS Catalysis*, 2016, 6(12): 8140-8144.
- [30] WANG S, ZHANG Q, CHEN C, et al. Facile Chemoenzymatic Synthesis of O-Mannosyl Glycans [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(30): 9268-9273.
- [31] MENG C, SASMAL A, ZHANG Y, et al. Chemoenzymatic Assembly of Mammalian O-Mannose Glycans [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(29): 9003-9007.
- [32] LI Y, LI Y, GUO Y, et al. Enzymatic modular synthesis of asymmetrically branched human milk oligosaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 333: 121908.
- [33] BAI Y, AGRAHARI A K, ZHANG L, et al. EASyMap-Guided Stepwise One-Pot Multienzyme (StOPMe) Synthesis and Multiplex Assays Identify Functional Tetraose-Core-Human Milk Oligosaccharides [J]. *JACS Au*, 2025, 5(2): 822-837.
- [34] TSAI T I, LEE H Y, CHANG S H, et al. Effective sugar nucleotide regeneration for the large-scale enzymatic synthesis of Globo H and SSEA4 [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(39): 14831-14839.
- [35] TSENG H W, TSENG H K, OOI K E, et al. Controllable Enzymatic Synthesis of Natural Asymmetric Human Milk Oligosaccharides [J]. *JACS Au*, 2024, 4(11): 4496-4506.
- [36] REXER T F T, SCHILDBACH A, KLAPPROTH J, et al. One pot synthesis of GDP-mannose by a multi-enzyme cascade for enzymatic assembly of lipid-linked oligosaccharides [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(1): 192-205.
- [37] DU Z, LIU Z, TAN Y, et al. Lacto-N-biose synthesis via a modular enzymatic cascade with ATP regeneration [J]. *iScience*, 2021, 24(3): 102236.
- [38] JIAO R, ZHANG L, YOU R, et al. Efficient and Cost-Effective Synthesis of N-Acetylglucosamine by Sequential Modular Enzymatic Cascade Reactions Involving NTP Regeneration [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(50): 28060-28071.
- [39] JIAO R, PENG X, WANG B, DU Y, QIAN E W, LI J. Highly Efficient and Economical One-Pot Two-Step Multienzymatic Synthesis of 6/3'-Sialyllactosamine from In Situ-Produced N-Acetylglucosamine [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(23): 14444-14452.
- [40] FENG Y, YAO M, WANG Y, et al. Advances in engineering UDP-sugar supply for recombinant biosynthesis of glycosides in microbes [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 41: 107538.
- [41] ZHUANG J D, SHI J M, HONG C C, et al. Engineering Bifunctional Galactokinase/Uridyltransferase Chimera for Enhanced UDP-d-Xylose Production [J]. *JACS Au*, 2024, 4(7): 2557-2563.
- [42] SHI J, WU T, ZHOU H, et al. Substrate promiscuities of a bacterial galactokinase and a glucose-1-phosphate uridyltransferase enable xylose salvaging [J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(9): 3717-3722.
- [43] WEIJERS C A, FRANSSSEN M C, VISSER G M. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides [J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(5): 436-456.
- [44] LAIRSON L L, HENRISSAT B, DAVIES G J, et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77: 521-555.
- [45] SCHMALTZ R M, HANSON S R, WONG C H. Enzymes in the Synthesis of Glycoconjugates [J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(7): 4259-4307.
- [46] REXER T, LAAF D, GOTTSCHALK J, et al. Enzymatic Synthesis of Glycans and Glycoconjugates [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2021, 175: 231-280.
- [47] CHANG L, CUI H, LIU W, et al. Electrodriven ATP Synthesis via a Reconstructed Thylakoid Membrane [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, 64(6): e202421120.
- [48] LUO S S, ADAM D, GIAVERI S, et al. ATP production from electricity with a new-to-nature electrobiological module [J]. *Joule*, 2023, 7(8): 1745-1758.
- [49] RUCCOLO S, BRITO G, CHRISTENSEN M, et al. Electrochemical Recycling of Adenosine Triphosphate in Biocatalytic Reaction Cascades [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 144(49): 22582-22588.
- [50] LEE J H, CHUNG S W, LEE H J, et al. Optimization of the enzymatic one pot reaction for the synthesis of uridine 5'-diphosphogalactose [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, 33(1): 71-78.
- [51] LEE S G, LEE J O, YI J K, et al. Production of cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid using recombinant as a biocatalyst [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 80(5): 516-524.
- [52] ANDEXER J N, RICHTER M. Emerging enzymes for ATP regeneration in biocatalytic processes [J]. *Chembiochem*, 2015, 16(3): 380-386.
- [53] NAHALKA J, PATOPRSTY V. Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3) [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(9): 1778-1780.
- [54] Cai T, Sun H, Qiao J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide [J]. *Science*, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [55] LIU Z, ZHANG J, CHEN X, et al. Combined biosynthetic pathway for de novo production of UDP-galactose: catalysis with multiple enzymes immobilized on agarose beads [J]. *Chembiochem*, 2002, 3(4): 348-355.
- [56] ZHANG J, WU B, ZHANG Y, et al. Creatine phosphate--

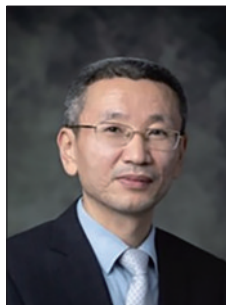
- creatine kinase in enzymatic synthesis of glycoconjugates [J]. *Organic Letters*, 2003, 5(15): 2583-2586.
- [57] WOHLGEMUTH R. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(6): 713-724.
- [58] STEPANKOVA V, BIDMANOVA S, KOUDELAKOVA T, et al. Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents [J]. *ACS Catalysis*, 2013, 3(12): 2823-2836.
- [59] HANEFELD U, GARDOSSI L, MAGNER E. Understanding enzyme immobilisation[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(2): 453-468.
- [60] MATEO C, PALOMO J M, FERNANDEZ-LORENTE G, et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(6): 1451-1463.
- [61] BARBOSA O, ORTIZ C, BERENGUER-MURCIA A, et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(5): 435-456.
- [62] JI Q, WANG B, TAN J, et al. Immobilized multienzymatic systems for catalysis of cascade reactions [J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(9): 1193-1203.
- [63] CHEN X, FANG J, ZHANG J, et al. Sugar nucleotide regeneration beads (superbeads): a versatile tool for the practical synthesis of oligosaccharides [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(9): 2081-2082.
- [64] LI Z, LIU X, NAKANISHI H, et al. Encapsulation of Mannose-6-phosphate Isomerase in Yeast Spores and Its Application in l-Ribose Production [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(25): 6892-6899.
- [65] LI Z, LI Y, DUAN S, et al. Bioconversion of D-glucose to D-psicose with immobilized D-xylose isomerase and D-psicose 3-epimerase on *Saccharomyces cerevisiae* spores [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, 42(8): 1117-1128.
- [66] CHAO Q, LI T L, JIA J X, et al. Spore-Encapsulating Glycosyltransferase Catalysis Tandem Reactions: Facile Chemoenzymatic Synthesis of Complex Human Glycans [J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(5): 3181-3188.
- [67] LIANG W, WIED P, CARRARO F, et al. Metal-Organic Framework-Based Enzyme Biocomposites [J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(3): 1077-1129.
- [68] BAILEY J B, ZHANG L, CHIONG J A, et al. Synthetic Modularity of Protein-Metal-Organic Frameworks [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(24): 8160-8166.
- [69] PATIL P D, GARGATE N, TIWARI M S, et al. Designable metal-organic frameworks for enzyme immobilization: The reality of controlled architecture [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 508, 160994.
- [70] SHA F R, WANG X L, KIRLIKOVALI K O, et al. Enhancing Biocatalysis: Metal-Organic Frameworks as Multifunctional Enzyme Hosts [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2024, 57(24): 3500-3511.
- [71] ZHENG J, XU H, LI B, et al. Spatially Segregated MOF Bioreactor Enables Versatile Modular Glycoenzyme Assembly for Hierarchical Glycan Library Construction [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(16): 19807-19816.
- [72] PENG X, PEI C, QIAN E W, et al. Co-immobilization of a bi-enzymatic cascade into hierarchically porous MIL-53 for efficient 6'-sialyllactose production [J]. *Nanoscale*, 2024, 16(31): 14932-14939.
- [73] 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.
- [74] 林炳承. 微纳流控芯片实验室 [M]. 2013.
- [75] MARTIN J G, GUPTA M, XU Y, et al. Toward an artificial Golgi: redesigning the biological activities of heparan sulfate on a digital microfluidic chip [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(31): 11041-11048.
- [76] GONG M, LI T, WU L, et al. Liquid-Phase and Ultrahigh-Frequency-Acoustofluidics-Based Solid-Phase Synthesis of Biotin-Tagged 6'/3'-Sialyl-N-Acetylglucosamine by Sequential One-Pot Multienzyme System [J]. *Catalysts*, 2020, 10(11): 1347.
- [77] SUN Y, WU Y, MA D, et al. Digital microfluidics-engaged automated enzymatic degradation and synthesis of oligosaccharides [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1201300.
- [78] WU Y, SUN Y, PEI C, et al. Automated chemoenzymatic modular synthesis of human milk oligosaccharides on a digital microfluidic platform [J]. *RSC Advances*, 2024, 14(25): 17397-17405.
- [79] WEN L, EDMUNDS G, GIBBONS C, et al. Toward Automated Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides [J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(17): 8151-8187.
- [80] PLANTE O J, PALMACCI E R, SEEBERGER P H. Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides [J]. *Science*, 2001, 291(5508): 1523-1527.
- [81] YAO W, XIONG D, YANG Y, et al. Automated solution-phase multiplicative synthesis of complex glycans up to a 1,080-mer [J]. *Nature Synthesis*, 2022, 1: 854-863.
- [82] SCHUSTER M, WANG P, PAULSON J C, et al. Solid-Phase Chemical-Enzymatic Synthesis of Glycopeptides and Oligosaccharides [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(3): 1135-1136.
- [83] HALCOMB R L, HUANG H, WONG C-H. Solution- and Solid-Phase Synthesis of Inhibitors of *H. pylori* Attachment and E-Selectin-Mediated Leukocyte Adhesion [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(25): 11315-11322.
- [84] MATSUSHITA T, NAGASHIMA I, FUMOTO M, et al. Artificial Golgi apparatus: globular protein-like dendrimer facilitates fully automated enzymatic glycan synthesis [J].

- Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(46): 16651-16656.
- [85] ZHANG J, CHEN C, GADI M R, et al. Machine-Driven Enzymatic Oligosaccharide Synthesis by Using a Peptide Synthesizer [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(51): 16638-16642.
- [86] ZHANG J, LIU D, SAIKAM V, et al. Machine-Driven Chemoenzymatic Synthesis of Glycopeptide [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(45): 19825-19829.
- [87] LI T, LIU L, WEI N, et al. An automated platform for the enzyme-mediated assembly of complex oligosaccharides [J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(3): 229-236.
- [88] MAHOUR R, KLAPPROTH J, REXER T F T, et al. Establishment of a five-enzyme cell-free cascade for the synthesis of uridine diphosphate N-acetylglucosamine [J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 283: 120-129.
- [89] SCHELCH S, EIBINGER M, GROSS Belduma S, et al. Engineering analysis of multienzyme cascade reactions for 3'-sialyllactose synthesis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(11): 4290-4304.
- [90] DONG K, LIU X, DONG H, et al. Multiscale Studies on Ionic Liquids [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(10): 6636-6695.
- [91] ANGELL C A, ANSARI Y, ZHAO Z. Ionic liquids: past, present and future [J]. *Faraday Discussions*, 2012, 154: 9-27.
- [92] ITOH T. Ionic Liquids as Tool to Improve Enzymatic Organic Synthesis [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(15): 10567-10607.
- [93] LI Z, HAN Q, WANG K, et al. Ionic liquids as a tunable solvent and modifier for biocatalysis [J]. *Catalysis Reviews*, 2024, 66(2): 484-530.
- [94] JI X L, XUE Y J, LI Z, et al. Ionozyme: ionic liquids as solvent and stabilizer for efficient bioactivation of CO₂ [J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(18): 6990-7000.
- [95] LI Z, WANG K, XUE Y J, et al. Ionozymes for Efficient Synthesis of Cadaverine: Offering a Sustainable Way for Bio-nylon 5X Production [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2023, 11(10): 4197-4208.
- [96] LANG M, KAMRAT T, NIDETZKY B. Influence of ionic liquid cosolvent on transgalactosylation reactions catalyzed by thermostable β -glycosylhydrolase celB from [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(6): 1093-1100.
- [97] SANDOVAL M, CORTÉS A, CIVERA C, et al. Efficient and selective enzymatic synthesis of N-acetyl-lactosamine in ionic liquid: a rational explanation [J]. *RSC Advances*, 2012, 2(15): 6306-6314.
- [98] BAYÓN C, CORTÉS A, BERENQUER J, et al. Highly efficient enzymatic synthesis of Gal β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc and Gal β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc in ionic liquids [J]. *Tetrahedron*, 2013, 69(24): 4973-4978.
- [99] PATEL M S, NEMERIA N S, FUREY W, et al. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2014, 289(24): 16615-16623.
- [100] PAPAGEORGIOU A C. Structural Characterization of Multienzyme Assemblies: An Overview [J]. *Methods in molecular biology*, 2022, 2487: 51-72.
- [101] QU J, CAO S, WEI Q, et al. Synthetic Multienzyme Complexes, Catalytic Nanomachineries for Cascade Biosynthesis In Vivo [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(9): 9895-9906.
- [102] OVADI J, SRERE P A. Metabolic consequences of enzyme interactions [J]. *Cell Biochemistry and Function*, 1996, 14(4): 249-258.
- [103] HWANG E T, LEE S. Multienzymatic Cascade Reactions via Enzyme Complex by Immobilization [J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(5): 4402-4425.
- [104] XU R R, WANG Y, HUANG H, et al. Closed-Loop System Driven by ADP Phosphorylation from Pyrophosphate Affords Equimolar Transformation of ATP to 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate [J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(16): 10405-10415.



通讯作者: 杜昱光(1963—),男,硕士,研究员,博士生导师,研究方向为功能寡糖的制备、活性评估与产业化等研究。

E-mail: ygdu@ipe.ac.cn



通讯作者: 李建军(1970—),男,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向为蛋白质工程、功能寡糖的酶催化合成等研究。

E-mail: jjli@ipe.ac.cn



第一作者: 裴彩霞(1994—),女,博士,博士后,研究方向为功能寡糖的酶催化合成等研究。

E-mail: peicaixia@ipe.ac.cn