

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-060

二肽的酶催化合成研究进展

娄龙威¹, 王淑弘¹, 陈冬宇¹, 张毅², 苏海霞², 杨柳², 李宗霖¹, 李志敏¹

(¹ 华东理工大学, 生物工程学院, 生物反应器工程全国重点实验室, 上海 200237; ² 中国石化催化剂有限公司, 工程技术研究院, 北京 101111)

摘要: 功能性二肽凭借优异的溶解性、结构稳定性与生物吸收利用率, 在功能食品、生物医药、精细化工等领域具备极高的应用价值与广阔产业化前景。传统二肽制备依赖化学合成, 存在工艺繁琐、环境污染严重、产物可控性差等缺陷, 而酶催化绿色合成技术凭借反应条件温和、立体选择性高、副产物少等优势, 已成为当下二肽高效生物制造的主流发展方向。本文系统梳理了二肽合成技术的发展历程, 聚焦四大核心酶催化体系, 包括非核糖体肽合成酶 (NRPS)、ATP 依赖型 L-氨基酸连接酶 (Lal)、蛋白酶/肽酶及 α -氨基酸酯酰转移酶 (AET), 详细阐释了各类酶系差异化的肽键形成催化机制、研究进展与应用场景, 总结了不同酶系的底物谱特征、催化优势与固有缺陷, 归纳了结构域重构、定点突变、半理性设计、宿主代谢改造及固定化催化等主流酶工程与工艺优化策略, 梳理了各类体系合成功能性二肽的典型研究案例。同时, 深度剖析了当前酶法合成存在的核心瓶颈, 包括工具酶固有催化缺陷、底物特异性限制、新型酶资源匮乏等问题。本文旨在为功能性二肽的绿色高效、规模化、定制化生物制造提供系统的理论参考与技术思路, 推动酶催化二肽合成技术的持续发展。

关键词: 功能性二肽; 酶催化; 生物合成; 蛋白质改造; 绿色制造

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Recent advances in enzymatic synthesis of dipeptides

LOU Longwei¹, WANG Shuhong¹, CHEN Dongyu¹, ZHANG Yi², SU Haixia², YANG Liu²,
CLI Zonglin¹, LI Zhimin¹

(¹ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; ² Engineering Technology Research Institute, Sinopec Catalyst Co., Ltd., Beijing 101111, China)

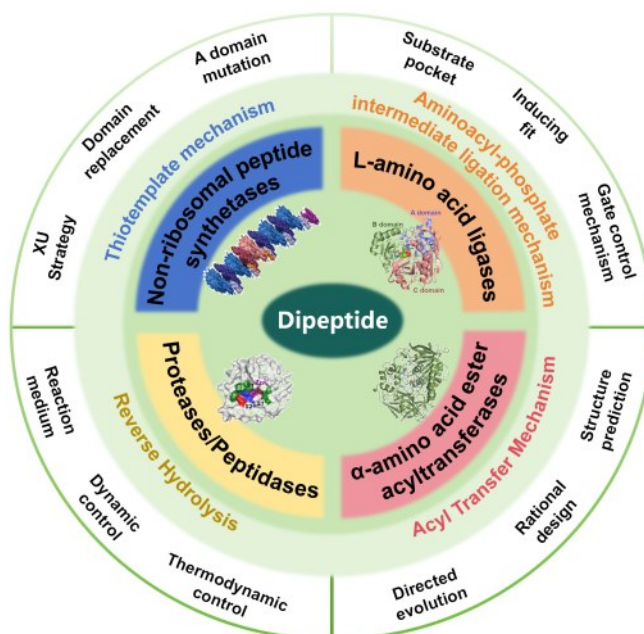
Abstract: Functional dipeptides are small molecular bioactive compounds with superior solubility, structural stability and bioavailability, which endow them with broad application prospects in functional food, biomedicine, cosmetics and nutritional health industries. Compared with free amino acids and long-chain polypeptides, dipeptides can be efficiently absorbed and utilized by organisms with low metabolic loss, and exhibit diverse physiological functions such as

收稿日期: 2026-07-02 修回日期: 2026-08-14

基金项目: 国家自然科学基金 (32501126)

引用本文: 娄龙威, 王淑弘, 陈冬宇, 张毅, 苏海霞, 杨柳, 李宗霖, 李志敏. 二肽的酶催化合成研究进展[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-060
Citation: LOU Longwei, WANG Shuhong, CHEN Dongyu, ZHANG Yi, SU Haixia, YANG Liu, CLI Zonglin, LI Zhimin. Recent advances in enzymatic synthesis of dipeptides[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-060

antioxidant, anti-fatigue, antihypertensive and immunomodulatory activities. With the rapid development of precision nutrition and biomedical industries, the market demand for high-value functional dipeptides continues to expand, driving the rapid innovation of green and efficient dipeptide manufacturing technologies. Traditional dipeptide production method was chemical synthesis, which restricted by inherent technical defects. Chemical synthesis suffers from cumbersome protection-deprotection procedures, massive organic solvent consumption and severe environmental pollution, while microbial fermentation is also limited by complex intracellular metabolic networks, resulting in insufficient product diversity and unstable yield. Enzymatic catalysis has emerged as a prominent alternative for dipeptide biosynthesis due to its mild reaction conditions, excellent stereoselectivity, minimal by-products formation and high atom economy. This review systematically summarizes the century-long development history of dipeptide synthetic technologies and comprehensively elaborates four core enzymatic catalytic systems, namely non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), ATP-dependent *L*-amino acid ligases (Lals), proteases/peptidases, and α -amino acid ester acyltransferases (AETs). The distinct peptide bond formation mechanisms, substrate recognition patterns, catalytic characteristics and application scopes of different enzyme families are analyzed in detail. We further conclude recent research advances in novel enzyme mining, structural modification, directed evolution, metabolic engineering optimization and immobilization strategies, and summarize typical cases of natural and unnatural functional dipeptides synthesized by different enzymatic platforms. Meanwhile, the current technical bottlenecks restricting the industrialization of enzymatic dipeptide synthesis are thoroughly discussed, including inherent substrate specificity limitations, unavoidable hydrolysis side reactions, insufficient energy utilization efficiency, poor heterologous expression performance, and immature supporting industrial processes. In the end, future development trends are prospected based on the integration of structural biology, artificial intelligence-assisted enzyme design and synthetic biology, covering precise enzyme directional transformation, multi-enzyme cascade system construction, industrial continuous process optimization, and innovative functional dipeptide exploitation. This review aims to provide systematic theoretical guidance and technical references for the further development and large-scale industrial application of green enzymatic dipeptide manufacturing technology.



Keywords: functional dipeptide; enzymatic catalysis; biosynthesis; protein engineering; green manufacturing

二肽 (dipeptides) 是由两个氨基酸通过肽键连接形成的最简单肽类化合物, 兼具氨基酸和多肽的结构特征, 在生物体内广泛参与营养代谢、信号传导和生理调控等过程^[1]。与游离氨基酸相比, 二肽通常具有更高的稳定性^[2]、更优的溶解性^[3]以及更高效的吸收利用率^[4], 因此在食品、医药、保健品、化妆品等领域展现出广阔的应用前景。例如, 阿斯巴甜前体 *L*-Asp-*L*-Phe^[5]、抗疲劳二肽 *L*-Ala-*L*-Gln^[6]、抗氧化二肽 *L*-Carnosine^[7]以及多种具有降血压、免疫调节和抗炎活性的功能性二肽^[8-11], 且大部分已实现产业化应用。随着功能食品、生物医药和精准营养产业的快速发展, 市场对于高附加值功能性二肽的需求持续增长, 推动了二肽绿色高效制造技术的快速进步^[12]。

目前, 二肽的制备方法主要包括化学合成法^[13]、生物酶催化法^[14]和微生物发酵法^[15]。其中, 化学合成具有工艺成熟、适用范围广等优点, 但存在保护基使用量大、反应步骤繁琐以及环境负担较重等问题^[16]; 微生物发酵法具有可持续性优势, 但产物种类和产量无法避免细胞代谢网络的影响^[15]。相比之下, 酶催化合成二肽具有反应条件温和、选择性高、副产物少及绿色环保等优势^[17]。近年来, 随着新酶挖掘^[18]、蛋白质工程^[19]以及人工智能辅助酶设计技术^[20]飞速发展, 以蛋白结构预测模型 AlphaFold2/3^[21, 22]、蛋白语言模型 ESM-2/3^[23, 24]以及生成式人工智能模型 ProGen^[25]和 RFdiffusion^[26]为代表的新一代人工智能工具, 显著提升了酶结构解析、底物识别、突变设计和新酶创制的效率, 为二肽合成酶的理性设计与性能优化提供了新的技术路径。

因此, 系统梳理二肽的生物合成策略及酶催化工艺的发展现状, 对于推动功能性二肽的产业化应用以及新型生物制造技术的创新具有重要意义。本文将重点综述二肽的酶法合成工艺, 涵盖催化体系构建、关键工具酶的应用与选择、以及酶法工艺的优化与改造策略, 系统分析当前技术瓶颈, 并展望未来发展趋势, 为酶催化二肽生产提供理论与方法参考。

1 二肽合成的发展历程

二肽研究始于19世纪末。1882年, Theodor

Curtius 以苯甲酰基保护氨基, 成功合成苯甲酰甘氨酸 (benzoylglycylglycine) (图1), 首次证明氨基酸可通过肽键实现人工连接, 为肽化学发展奠定了基础^[27]。1900年, Gulewitsch 和 Amiradzibi 首次从肌肉组织中分离获得天然二肽肌肽 (carnosine) (图1), 揭示了二肽在生物体内的存在及潜在功能^[7]。1901年, Fischer 和 Fournneau 成功合成并表征甘氨酸-甘氨酸 (glycylglycine) (图1), 进一步推动了液相肽合成技术的发展; 随后 Fischer 建立了基于保护基策略的液相肽合成方法, 实现了多肽的逐步构建^[28, 29]。20世纪中叶, 肽合成技术进入快速发展阶段, 1953年 Vincent du Vigneaud 团队完成具有生物活性的催产素 (oxytocin) 全合成 (图1), 推动肽化学由结构研究迈向功能分子构建^[30]。1963年, Merrifield 提出固相肽合成 (solid-phase peptide synthesis, SPPS) 技术, 通过树脂载体实现肽链循环偶联与脱保护, 大幅提高了合成效率, 推动了肽合成自动化发展。随后, 随着保护基、缩合试剂及自动化技术的不断优化, 化学肽合成逐步实现了复杂多肽和蛋白质的高效制备^[31-33]。

二肽生物合成的研究可追溯至20世纪60年代 (图1)。随着研究的不断深入, 逐渐建立了多种酶催化体系, 包括核糖体翻译系统^[34]、肽酶催化体系^[35-37]、非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal Peptide Synthetase, NRPS)^[38]、ATP 依赖型氨基酸连接酶 (amino acid ligases, Lal)^[39], 以及近年来发现的 α -氨基酸酯酰转移酶 (α -amino acid ester acyltransferases, AETs)^[40]等其他能够形成肽键的酶类。这些酶通过各自独特的催化机制, 实现氨基酸之间的定向连接, 从而构建了多样化的二肽生物合成途径。

得益于不同酶系在底物识别范围和催化特性上的差异, 目前已实现几乎所有天然蛋白质氨基酸参与的二肽合成, 种类已达数百种^[39, 41]。与此同时, 随着酶工程改造和非天然氨基酸生物制造技术的发展, 越来越多非天然氨基酸被成功引入二肽分子中^[42], 进一步突破了天然氨基酸组合的限制, 显著拓展了二肽的结构多样性和功能空间, 为新型功能食品、药物先导化合物及高附加值精细化学品的开发提供了新的机遇。

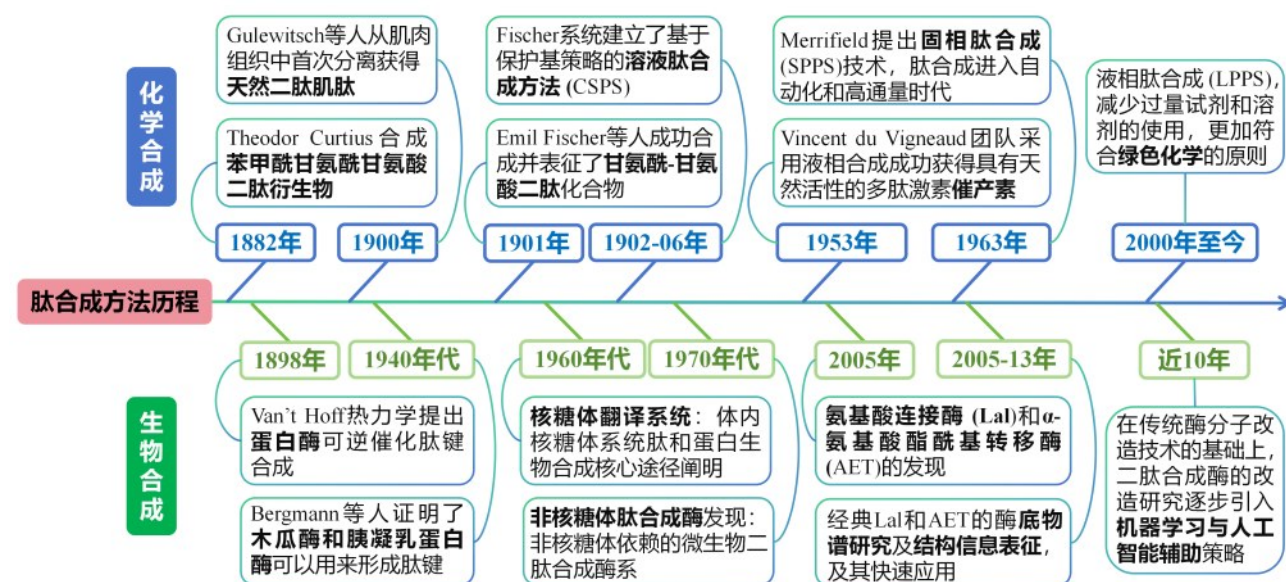


图1 二肽合成工艺发展历程

Fig. 1 Evolution of synthetic technologies for dipeptides

2 肽键形成机理

由前文可知, 目前已报道至少存在5类能够催化二肽合成的酶系。其中, 核糖体翻译系统属于高度复杂的多组分酶促体系, 并不对应于单一酶家族。其核心催化单元为核糖体大亚基中的肽酰转移酶中心 (Peptidyl Transferase Center, PTC), 以 mRNA 为模板, 通过连续催化氨酰-tRNA 所携带氨基酸之间的肽键形成, 实现肽链的定向延伸^[43]。在翻译过程中, 肽酰-tRNA 和氨酰-tRNA (aa-tRNA) 分别结合于核糖体的P位点和A位点, 随后A位点氨基酸的 α -氨基对P位点肽酰-tRNA羰基碳发起亲核攻击, 完成肽键形成。对于未催化条件下的氨基解反应, 其反应机理已得到较为系统的研究。现有研究认为该过程经历二维特离子四面体中间体 ($T^\pm$) 的形成, 随后经去质子化生成T-中间体, 最终坍塌形成肽键产物 (图2a)。

非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal Peptide Synthetase, NRPS) 和氨基酸连接酶 (Amino Acid Ligases, AALs) 均属于ATP依赖型连接酶, 在EC分类中归属于EC 6.3.2.-类^[39, 41, 44]。两者均通过ATP活化羧基底物以促进肽键形成, 但其ATP利用方式和催化机制存在显著差异。NRPS进一步归属于ANL (Acyl-CoA synthetase-Nonribosomal

peptide synthetase-Luciferase) 超家族^[45], 典型NRPS模块通常由腺苷化结构域 (Adenylation domain, A)、硫酯化结构域 (Thiolation domain, T; 又称Peptidyl Carrier Protein, PCP) 以及缩合结构域 (Condensation domain, C) 组成, 其中T结构域的磷酸泛酰化修饰是NRPS正常工作的必要前提。首先, A结构域特异性识别氨基酸底物, 并利用ATP生成氨酰-AMP活化中间体; 随后活化氨基酸转移至T结构域4'-磷酸泛酰巯基乙胺 (4'-phosphopantetheine, Ppant) 辅基的巯基上形成氨酰硫酯; 最后, C结构域催化供体肽酰-T与受体氨酰-T之间发生缩合反应形成肽键, 其是NRPS体系中直接负责肽链延伸的核心催化单元 (图2b)。由于每个模块通常负责引入一个氨基酸单元, 因此NRPS产物的肽链长度通常与其模块数量呈对应关系, 此外多模块系统结尾未为Te (Thioesterase) 结构域, 其与肽产物的释放相关。相比之下, 氨基酸连接酶主要归属于ATP-grasp超家族^[46], 其催化机制与NRPS显著不同 (图2c)。在反应过程中, 酶通过与氨基和羧基形成氢键稳定氨基酸1底物, Mg^{2+} 通过离子键稳定ATP, 然后羧基进攻ATP的 γ -磷酸基团, 生成高能酰基磷酸 (acyl-phosphate) 中间体并释放ADP。随后, 氨基酸2的氨基经去质子化后作为亲核试剂进攻酰基磷酸的羰基碳, 形

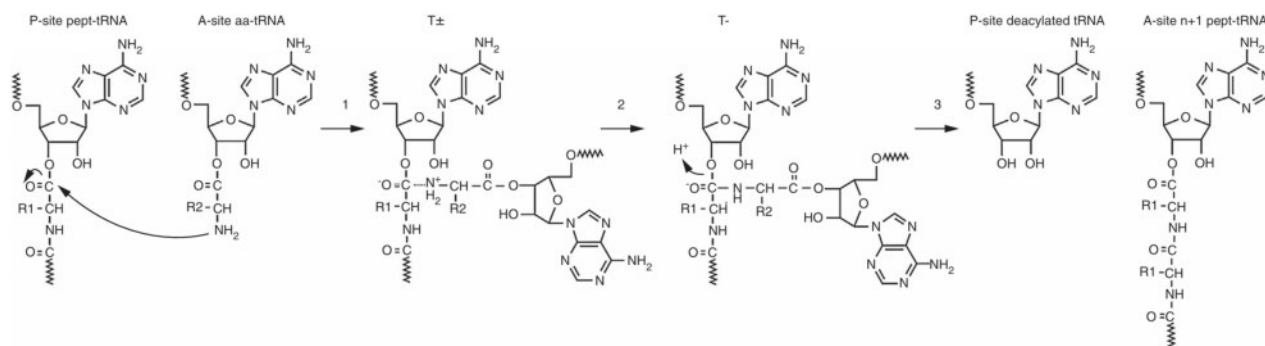
成四面体中间态；该过渡态进一步坍塌并释放无机磷酸（Pi），最终生成目标二肽。与NRPS形成的氨酰-AMP中间体不同，ATP-grasp家族通过酰基磷酸中间体实现羧基活化，因此代表了另一类典型的ATP依赖型肽键形成策略。

肽酶为作用于肽键的水解酶类（EC：3.4.-.-），其催化肽键形成通常被认为是水解反应的逆过程，通过逆反应合成肽键面临受限于底物自发的电离倾向以及整体反应的正自由能，导致热力学平衡极度偏向于底物电离与产物水解，难以高效合成多肽；其次是通过转肽反应（transpeptidation）实现^[47, 48]，转肽反应普遍遵循“酰基转移”机制，即利用酯化底物首先在酶活性中心形成共价酰基酶中间体（acyl-enzyme intermediate），或在部分体

系中形成活化酰基中间体，随后由氨基受体对该酰基中间体发起亲核攻击，从而完成肽键重建。但酰基中间体也极易被水分子攻击，从而发生水解反应，生成相应的天然氨基酸，与形成肽键的氨解反应竞争。 α -氨基酸酯酰基转移酶（ α -amino acid ester acyltransferase, AET）在结构上通常归属于 α/β -水解酶折叠（ α/β -hydrolase fold）超家族，在功能分类上则隶属于酰基转移酶类（EC：2.3.2.-），在氨解反应中其遵循肽酶的“酰基转移”机制，用于肽键的形成（图2d）。

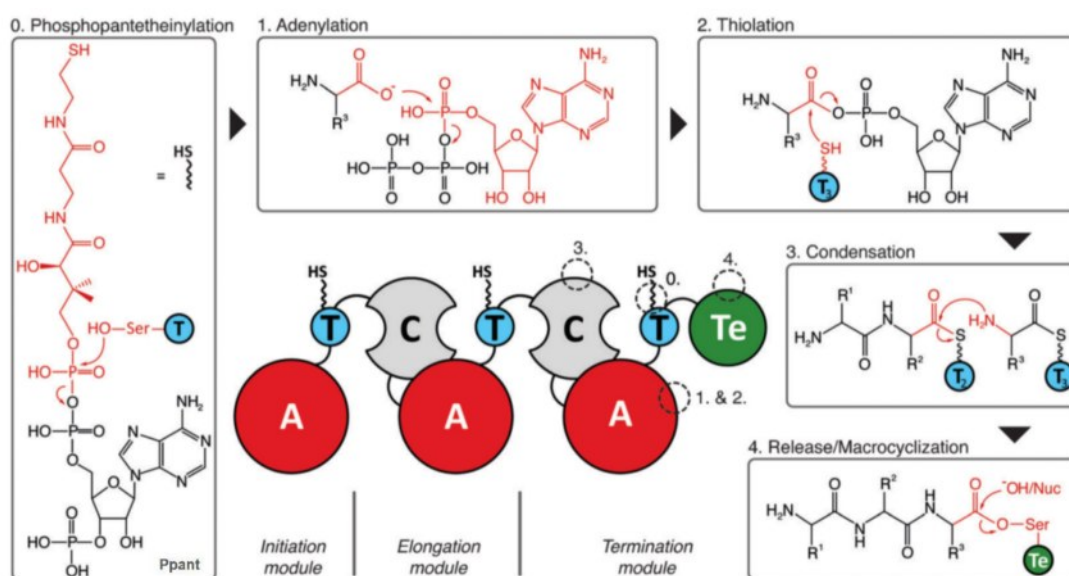
3 非核糖体肽合成酶

在前文所述的二肽生物合成体系中，核糖体



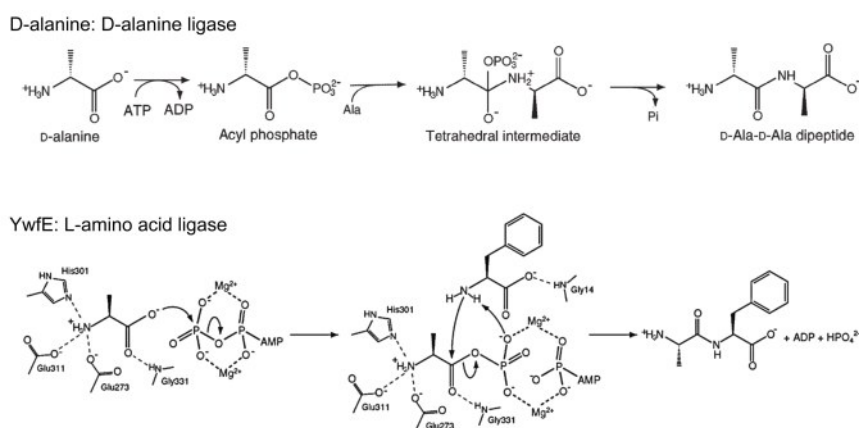
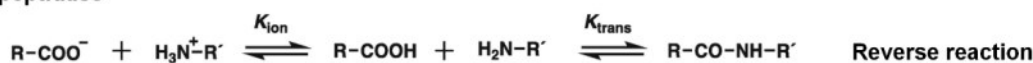
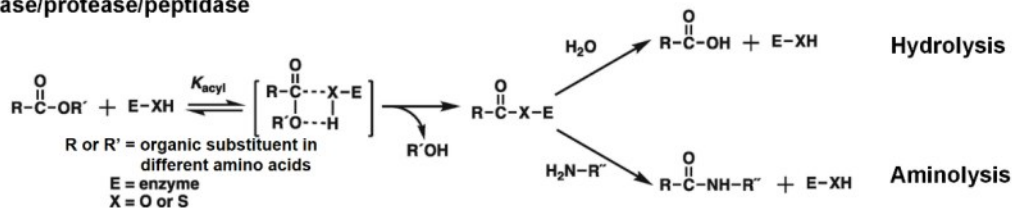
(a) 核糖体大亚基的肽酰转移酶中心催化肽键形成机理^[43]

(a) Mechanism of peptide bond formation catalyzed by the peptidyl transferase center of the ribosomal large subunit^[43]



(b) NRPS 催化肽键形成机理^[44]

(b) NRPS catalyzed peptide bond formation mechanism^[44]

(c) 氨基酸连接酶催化肽键形成机理^[49, 50](c) Amino acid ligase-catalyzed peptide bond formation mechanism^[49, 50]**Protease/peptidase** **α/β -Hydrolase/protease/peptidase**(d) 肽酶和 α -脂酰转移酶催化肽键形成机理^[47, 48, 51](d) Mechanisms of peptide bond formation catalyzed by peptidases and α -amino acid acyltransferases^[47, 48, 51]**图2** 酶催化肽键形成机理**Fig. 2** Mechanism of enzyme-catalyzed peptide bond formation

翻译系统由于组成复杂、对细胞内翻译环境依赖程度较高，其优势主要体现在长链蛋白质和多肽的高效生物合成方面。相比之下，在体外短肽尤其是二肽的生物合成研究中，核糖体系统的应用相对有限。因此，本文不再对其催化机制及工程化应用进行详细讨论，相关内容可参考已有的综述文献^[52-54]。除核糖体系统外，NRPS同样属于结构高度复杂的肽合成体系。NRPS单模块至少由3个结构域组成，以及末尾的Te（Thioesterase，硫酯酶）结构域，每个模块负责特异性识别并活化一种氨基酸底物^[44]。因此，对于二肽合成而言，理论需要两个NRPS模块协同作用，构成NRPS介导肽键形成的最小功能单元。在此基础上，通过增加模块数量，可进一步实现三肽及更长链多肽的生物合成。鉴于本文聚焦于二肽的酶催化合成

研究，以下内容将重点介绍NRPS体系在二肽生物合成中的应用进展。

3.1 NRPS在二肽合成应用中的发展历程与研究进展

早在20世纪60-70年代，Lipmann等通过对Gramicidin S合成酶的研究，首次从整体水平揭示了NRPS催化过程中ATP依赖的两步活化机制：首先释放焦磷酸（PPi）形成氨酰腺苷酸（aminoacyl-AMP）中间体，随后释放AMP，使活化氨基酸共价连接至肽酰载体蛋白（T结构域）上的4'-磷酸泛酰巯基（4'-phosphopantetheine）辅基^[55]。结合放射性同位素示踪实验，研究者进一步证实了肽链以硫酯键形式逐步延伸的过程，建立了经典的

“硫模板机制 (thiotemplate mechanism)”，为 NRPS 催化机制及模块化组装模式的研究奠定了理论基础。

随着对 NRPS 催化机制认识的不断深入，研究重点逐渐由机制解析转向结构域功能及人工催化体系的构建。2001 年，Dieckmann 等从 10 模块组成的 Tyrocidine synthetase 1 (TycA) NRPS 基因中分离获得腺苷化结构域 (A domain)，利用其催化氨基酸活化生成氨酰腺苷酸中间体，并以另一种氨基酸作为亲核试剂，通过非酶促氨解反应实现多种二肽的合成^[56]。尽管该策略未依赖完整 NRPS 完成肽键形成，且易受氨酰腺苷酸水解等副反应影响、成肽效率较低，但首次验证了利用 NRPS 催化中间体构建二肽的可行性^[47]。随后，Marahiel 课题组构建了由 TycA 模块 1 和 2 组成的体外最小 NRPS 体系，成功实现多种二肽的酶促合成，并进一步证实了 A 结构域负责底物识别与活化、C 结构域催化肽键形成以及 T 结构域负责中间体递送的协同作用^[57, 58] (图 3)。两年后，该双模块体系进一步在大肠杆菌中实现功能重构，D-Phe-L-Pro 产量达到 9 mg/L^[59] (图 3)，标志着 NRPS 与代谢工程结合的尝试。

随着结构与功能研究的深入，NRPS 各结构域在肽链延伸过程中的作用逐渐得到完善。^[58, 60] (图 2b)。研究表明，除了 A 和 C 决定底物偏好性之外，T 结构域需要与特定的 A 和 C 结构域形成有效的蛋白-蛋白相互作用，其表面构象和动态特性可能赋予其一定程度的底物偏好^[44]，从而影响肽链延伸效率和模块兼容性。此外，Te 结构域除了

负责催化肽链的释放之外，还参与肽产物的水解或环化，其催化方式决定最终产物的结构形式。(图 4a)，在人工体外条件下 TycA 和 ProCAT，非催化水解生成环二肽 (D-Phe-Pro-DKP)，而经 Te 结构域可进一步水解生成线性二肽 (D-Phe-Pro)^[61]；而在复杂天然产物的合成中，Te 结构域则能够控制大环化反应的时序和选择性，以及催化生成结构复杂、化学合成难以获得的环状肽类产品，如在 10 肽天然产物 Tyrocidine A 的合成中，位于 TycC 基因簇最后的 T 结构域携带合成的线性肽 (Peptide-S-T)，传递至 Te 结构域 (Peptide-O-Te)，Te 结构域负责最后 10 肽产物的环化。此外，Te 结构域的活性还与 T 结构域的有效呈递密切相关，其相互作用对肽链释放和环化效率起决定性作用 (图 4b)^[62]。

上述机制研究和结构域功能解析奠定了 NRPS 模块化工程的理论基础，也推动了其在二肽合成中的应用。近年来，随着基因组挖掘、蛋白质工程等领域的发展，越来越多能够催化功能性二肽合成的新型 NRPS 被发现，并通过结构域重编程、宿主细胞工程及体外重构等策略不断拓展底物范围和催化性能。表 1 总结了近年来 NRPS 在二肽合成领域的代表性研究，包括新酶鉴定、新型二肽产物发现以及工程化改造等方面的最新进展。

3.2 NRPS 的工程化改造

基于对非核糖体肽合成酶 (NRPS) 各结构域催化特性及模块间相互作用机制的深入解析，研

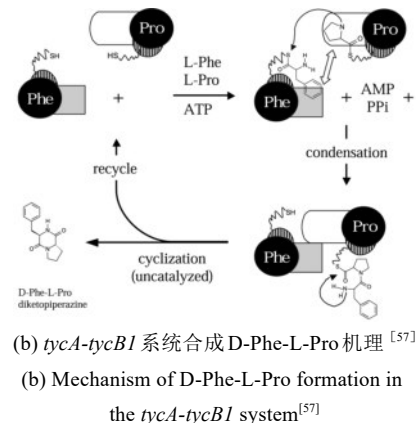
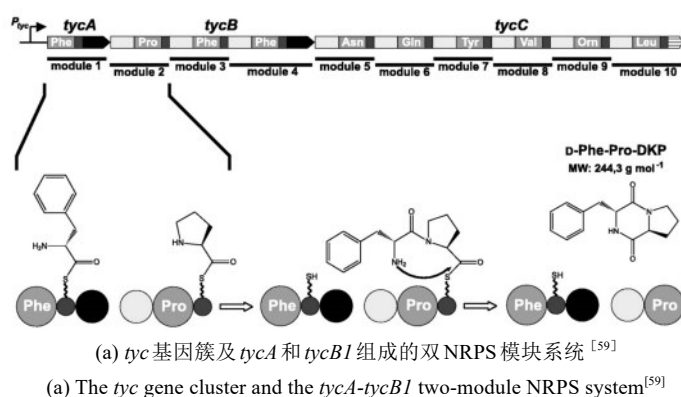


图3 *tycA* 和 *tycB1* 组成的两模块 NRPS 系统

Fig. 3 A two-module NRPS system composed of *tycA* and *tycB1*

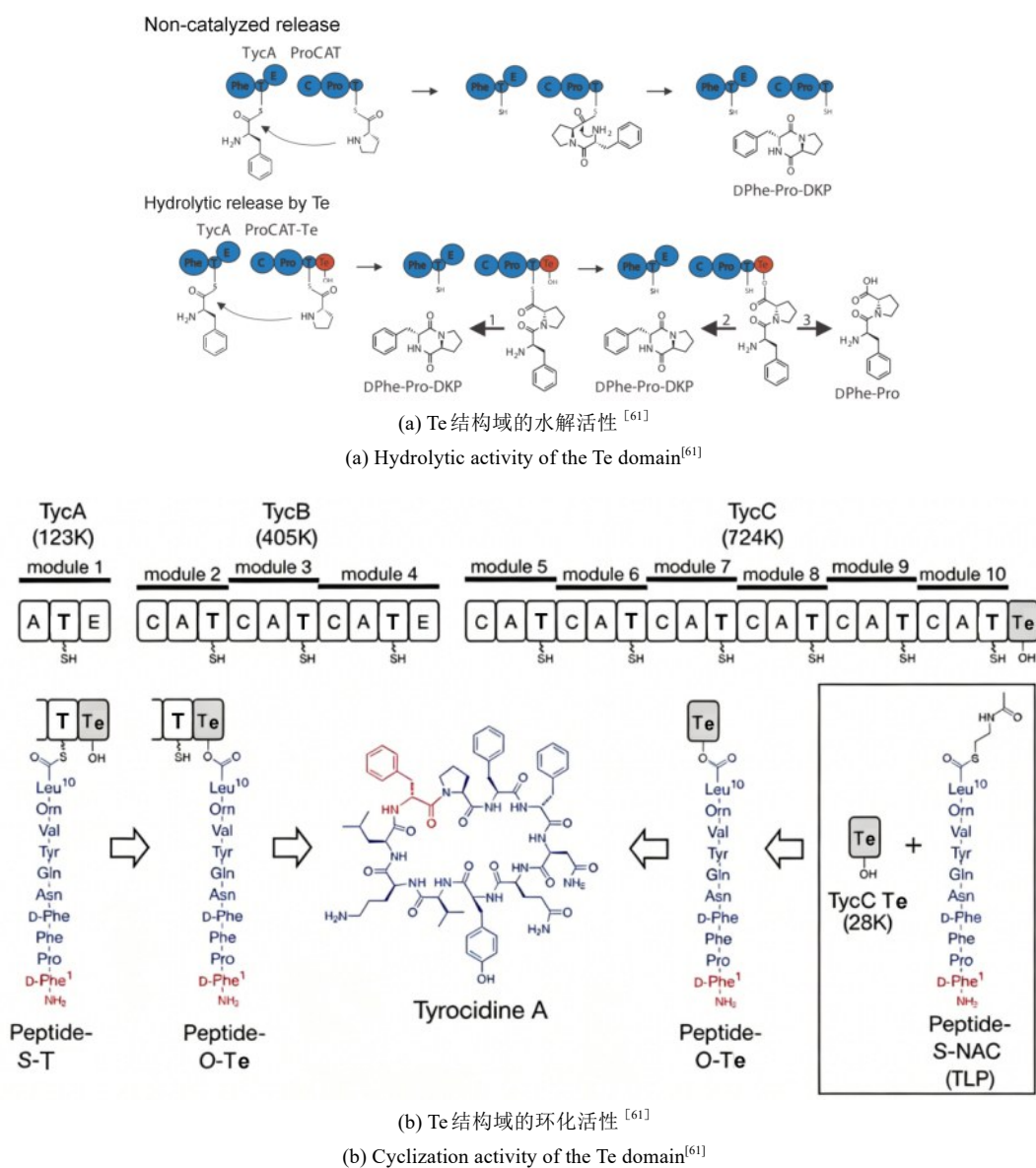


图4 Te结构域的水解和环化活性

Fig. 4 Hydrolytic and cyclization activity of the Te domain

研究者长期致力于通过理性工程化改造实现NRPS体系对天然产物及非天然肽类的可编程合成,从而拓展其化学空间与应用潜力^[44, 81],近年来,NRPS工程已由早期的单一结构域改造逐渐发展为结构域工程、模块重组、宿主工程及人工智能辅助设计等多层次策略(图5)。鉴于目前已有多篇综述系统总结NRPS工程化改造的发展历程,本文仅围绕二肽及短肽合成相关的代表性策略进行简要介绍。

目前,结构域工程仍是NRPS改造最常用的策

略,其中腺苷化结构域(A domain)由于决定氨基酸底物的识别和活化,是工程改造的核心对象。研究者主要通过随机突变或基于底物特异性密码(substrate specificity code, 10个氨基酸组成的指纹序列)的理性设计,从而改变其对氨基酸底物的识别特异性^[82],然而由于A和C结构域存在的界面互作,A结构域的改造通常需要与C结构域的兼容性优化协同进行,以确保活化后的酰基-AMP能够高效经T转移至C结构域完成肽键形成,因此仅对A结构域的改造往往仅能实现结构相似高的氨

表1 NRPS 合成二肽实例

Table 1 NRPS-derived dipeptide synthesis

二肽	年份	NRPS 来源	注释	Ref.
SDP1	2025	<i>Valsamali</i>	发现了对植物毒性肽 SDP1 的编码基因,可合成毒性肽或提供植物疾病防治提供靶点	[63]
Phevalin Tyrvalin Leuvalin	2025	<i>Staphylococcus aureus</i>	证明了典型极简 NRPS 系统 AusAB 在环二肽合成中对芳香族氨基酸具有偏好性	[64]
HG-7 HG-9	2024	<i>Streptomyces purpureus</i> NBRC	从自然界放线菌产物中挖掘出两种新型抗菌性环二肽的合成酶	[65]
Cyclo (Phe-Pro)	2024	mutants of <i>Burkholderia seminalis</i> strain R456	该研究证明 C4- 二羧酸对细菌抗菌环 (Phe-Pro) 合成基因具有负向调控	[66]
BATT	2024	<i>planarian</i>	该研究发现来源于特定生态位的非核糖体肽作为关键生态位信号参与生殖细胞发育	[67]
Cyclo-(Phe-Phe)	2024	<i>Penicillium janthinellum</i> HDN13-309	通过黑曲霉异源表达 NRPS 基因生产环二苯丙氨酸,推动环二苯丙氨酸的发酵生产	[68]
Ala-Glu Aspartame	2022	<i>Bacillus licheniformis</i> CICIM B1391	探究了 A 结构域的广底物谱特性,并证明通过 A 结构域和带电氨基酸作为亲和试剂也可实现部分二肽的合成	[69]
Cyclo-TA	2022	<i>Eurotium cristatum</i> NWAUFU-1	鉴定了首个真菌来源可合成环 L-色氨酸-L-丙氨酸二肽的 NRPS 酶	[70]
Pyoverdine Phe-X X-Pro	2020	<i>Pseudomonas</i>	该研究证明了普遍认为的 C 结构域在底物校对中的作用可能是非常态,仅通过 A 结构域取代也可实现底物的拓展	[71]
Peramine	2019	<i>Grass endophytic fungi</i>	证明通过 NRPS 结构域重组,可产生新型 NRPS 基因簇,合成不同类型产物	[72]
L-Pro-L-Trp	2019	<i>Malbrancheamide</i>	该研究阐明了 NRPS 为复杂吡嗪生物碱的环化合成分子机制基础	[73]
Gly-Cys Thr-Cys	2019	<i>Bacillus subtilis</i>	该研究证明枯草芽孢杆菌 NRPS DhbF 的内部腺苷酸化结构域在体外可独立催化氨基酸缩合生成二肽及寡肽	[74]
Ala-Cys	2019	<i>Bacillus atrophaeus</i> C89	该研究证明了利用 NRPS 合成多肽作为杂环前体的潜力	[75]
Barnesin A	2018	<i>Sulfurospirillum barnesii</i>	该研究证明了复杂天然混合酯肽中,NRPS 合成的二肽是其关键组成模块	[76]
Phevalin	2016	<i>Staphylococcus aureus</i>	该研究发现了 <i>Staphylococcus aureus</i> 中具有关键细胞毒性的环二肽产物及其 NRPS 基因	[77]
β-alanyl-histamine	2014	<i>Drosophila melanogaster</i>	挖掘获得新型 NRPS 酶用于合成肌肽	[78]
Tyr-Azido amino acid	2014	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	本研究证明对 RNRPS 底物识别结构域关键关键位点突变可拓展结构类似的非天然氨基酸的引入	[79]
Holomycin	2010	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	该研究鉴定了 <i>Streptomyces clavuligerus</i> 中 holomycin 的生物合成基因簇,通过该基因簇揭示了 dithiolopyrrolone 类抗生素的合成机制	[80]

基酸底物替换，否则将对整体合成效率产生严重影响，目前仍缺乏可适用于广泛氨基酸底物的通用策略^[83, 84]。此外，底物特异性密码还可用于 A 结构域的鉴定与功能预测，但其对底物特异性的预测准确率仍难以保证。值得注意的是，近期研究发现，C 结构域在底物选择中的限制作用并非普遍规律，部分 NRPS 体系仅通过替换 A 结构域即可获得新的非核糖体肽，并保持较高产率，为 A 结构域工程化策略的发展提供了新的认识^[71]。

针对 A、C 结构域相容性问题，研究者进一步

开展了 C 结构域的系统研究。发现 C 结构域在非核糖体肽合成过程中不仅负责肽键形成，还通过对供体与受体底物的严格识别决定模块间的传递效率与整体催化流程。早期研究已揭示有关 NRPS 的 C 结构域具有显著的底物选择性，并对 A 结构域工程化改造产生关键限制作用^[85, 86]。结构与机制解析进一步表明，其供体/受体界面（donor/acceptor interface）决定了模块兼容性，是 NRPS 工程中的核心约束因素^[87]。然而，与 A 结构域不同，C 结构域尚缺乏类似底物特异性密码的通用预测规律，

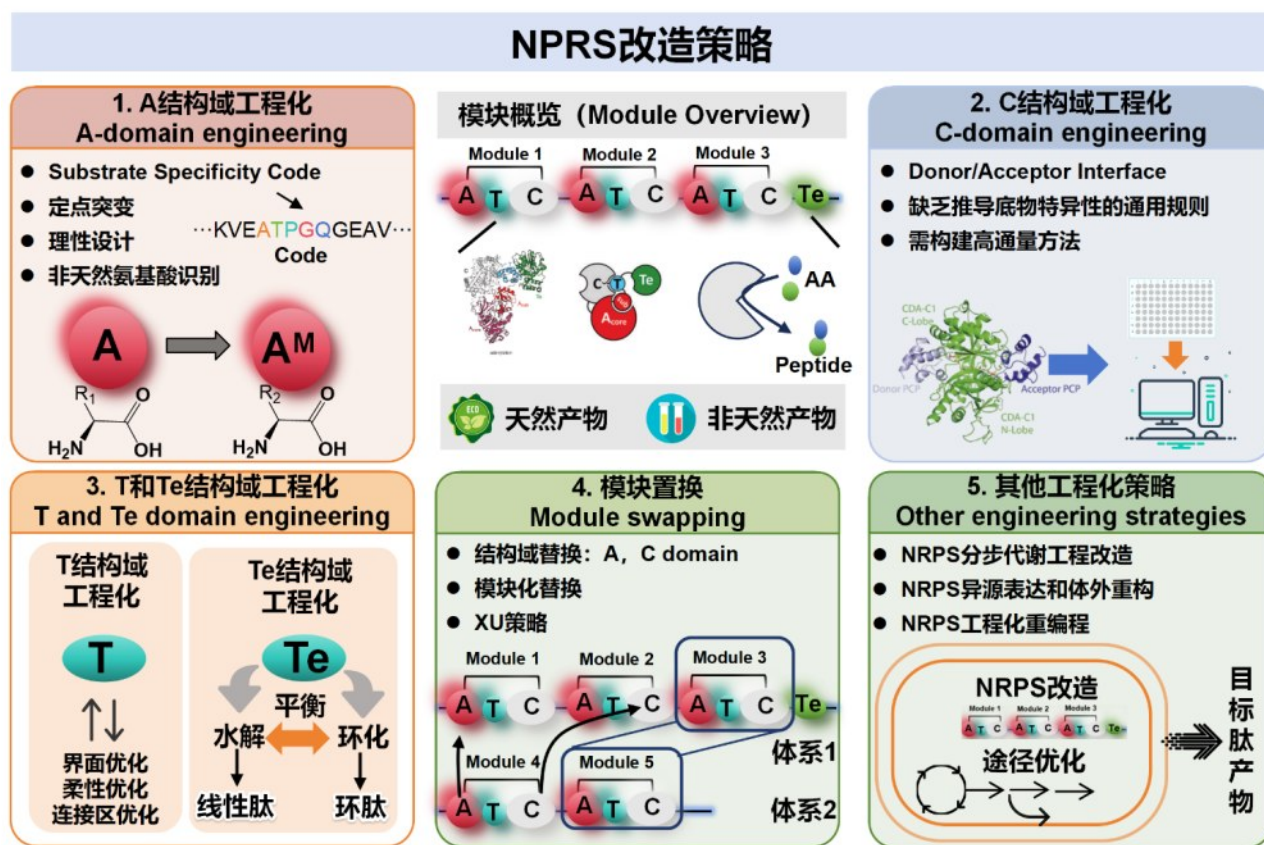


图5 NRPS改造策略

Fig. 5 Strategies for NRPS modification

其底物特异性同时受到上下游T结构域递送方式、界面结合模式及催化构象变化等多重因素影响，因此其工程化改造难度更高，更依赖高通量筛选和定向进化策略^[88]。上述研究表明，对于存在明显A和C相容性限制的NRPS体系，工程策略需要由单一结构域改造转向界面优化和多结构域协同设计。

为进一步突破单一结构域改造的局限，模块与结构域置换 (module/domain swapping) 逐渐成为NRPS工程的重要发展方向。该策略通过交换A、C、T等结构域或完整催化模块，在同一或不同NRPS体系之间重新组合催化功能，以改变底物选择性或调控肽链长度^[44]。例如，通过对来源于土壤宏基因组的A结构域进行扩增并替换，可在保持部分模块催化功能的同时一定程度上拓展NRPS的底物范围，实现多样化非核糖体肽的合成^[89]；但针对C结构域建立的高通量工程化改造与筛选体系，又进一步验证了其在模块兼容性和底物转移效率中的关键作用^[88]。这是由于NRPS

各模块间存在高度特异的蛋白-蛋白相互作用，其往往存在催化效率与结构兼容性问题，这与A和C结构域的单独工程化改造所遇问题类似，因此研究者提出将多个结构域作为整体进行置换，目前发现C-A结构域之间的共柔性连接区域更适合作为结构域置换的融合位点，此外由于A和C之间的相容性，以及T结构域作为氨基酸和肽链中间体的载体，需要与A、C结构域保持高效协同，其构象动态也直接影响中间体传递效率^[90]，因此以A₁-T₁-C₂或C₁-A₁-T₁-C₂组成的整体模块替换方式 (Exchange unit, XU策略) 被提出^[81, 91]，以保证底物传递通路的连续性。但其中A₁-T₁-C₂涉及不同NRPS模块的A和C结构域，需考虑上下游A和C之间的相容性，在以下游模块替换为例，实现20种氨基酸底物替换理论上需构建约800种组合，而采用C₁-A₁-T₁-C₂整体交换单元仅需约80种组合即可覆盖相同底物范围，可显著降低构建工作量并提高了模块重编程效率^[91]。近年来，模块重组进一步结合基因编辑、宏基因组挖掘和高通量筛选

等技术，实现了复杂 NRPS 装配线的快速重构，推动 NRPS 工程由经验驱动逐步向模块化、标准化和系统化设计发展^[92]。

除酶分子本身的工程化改造外，合成生物学的发展进一步推动了 NRPS 向系统工程方向演进。通过将优化后的 NRPS 导入可调控的异源宿主，并结合代谢网络重构、前体供给优化及整合式生物合成平台，可在细胞工厂水平实现复杂天然产物及非天然肽类的高效生物制造^[68, 75, 79]，以推动 NRPS 在工业化上的应用。

4 氨基酸连接酶

4.1 氨基酸连接酶的在二肽合成应用中的发展历程与研究进展

ATP 依赖型氨基酸连接酶的研究最早可追溯至细菌肽聚糖生物合成中的 MurC、MurD、MurE 和 MurF 等 Mur 连接酶（表 2）。该类酶通过 ATP 活化羧基形成酰基磷酸（acyl phosphate）中间体，催化氨基酸逐步连接，是最早被系统研究的生物催化肽键形成酶^[93]。随后，MurC、MurD 等酶的晶体结构相继被解析，揭示了其典型的三结构域折叠方式以及 ATP 依赖催化过程中开放/闭合构象转换机制^[94, 95]，底物和产物复合物结构进一步证实了酰基磷酸中间体参与肽键形成的催化过程^[96]，为 ATP 依赖型氨基酸连接酶的催化机制研究奠定了理论基础。

在 Mur 连接酶研究基础上，研究者陆续发现

了多种具有 ATP 依赖肽键形成能力的连接酶。例如，叶酸多聚谷氨酸合成酶（Folylpolyglutamate synthetase, FolC）以叶酸和谷氨酸为底物，能够逐步延长 γ -谷氨酸链，具有多轮加成能力，但底物专一且产物类型单一^[97]；RimK 属于核糖体蛋白修饰连接酶，以核糖体蛋白 C 端谷氨酸残基为受体催化翻译后修饰，同样具有聚合能力，但底物局限于特定蛋白底物^[98]。此外，D-Ala-D-Ala ligase (Ddl) 利用 ATP 依赖的羧基活化机制直接催化两分子游离 D-丙氨酸生成 D-Ala-D-Ala 二肽，是细胞壁合成末端的关键酶，也是最早发现能够直接利用游离氨基酸合成二肽的 ATP 依赖型连接酶^[99]。然而，上述酶类均具有明显的天然生物学功能限制：Mur 连接酶和 FolC 依赖非游离氨基酸底物，RimK 仅作用于特定蛋白底物，而 Ddl 则严格识别 D 型氨基酸，因此均难以满足功能性 L-二肽绿色制造对底物广谱性和产物多样性的需求。

真正推动 ATP 依赖型氨基酸连接酶向生物制造平台发展的里程碑出现在 2005 年。Kazuhiko 团队首次从 *Bacillus subtilis* 中鉴定获得典型 L-氨基酸连接酶 YwfE，该酶属于 ATP-grasp 超家族，可直接利用游离 L-氨基酸合成二肽，并且不会进一步生成长链寡肽副产物^[39]，与此前报道的 ATP 依赖连接酶相比，YwfE 具有较宽的底物适应性，可识别 15 种天然 L-氨基酸并催化合成至少 44 种不同类型的二肽（表 2），标志着 ATP 依赖型连接酶开始真正应用于功能性二肽的生物合成。随后，Toshinobu 团队于 2013 年从 *Pseudomonas syringae* 中进一步挖掘获得底物谱更广的 TabS（表 2），其

表2 ATP 依赖型氨基酸连接酶
Table 2 ATP-dependent amino acid ligases

酶/家族	代表酶	反应方程式(简化)	底物类型	催化机制特点	Ref.
Mur ligase family	MurC/MurD /	UDP-MurNAc-peptide + AA + ATP →	UDP-MurNAc 衍生物 + L/D 氨基酸	ATP 活化羧基 → 酰基磷酸 中间体 → 胺亲核进攻	[94, 95]
	MurE/MurF	UDP-MurNAc-peptide-AA + ADP + Pi			
Folylpolyglutamate synthetase (FolC)	FolC	Folate + (Glu) _n + ATP → Folate-(Glu) _n +1 + ADP + Pi	叶酸 + 谷氨酸	ATP 依赖逐步 γ -谷氨酰化	[97]
RimK ligase	RimK	Ribosomal protein S6 + Glu + ATP → S6-(Glu) _n + ADP + Pi	核糖体蛋白质 (S6)+ 谷氨酸	ATP 依赖蛋白 C 端 谷氨酸加成	[98]
D-Ala-D-Ala ligase (Ddl)	DdlA/DdlB	D-Ala + D-Ala + ATP → D-Ala-D-Ala + ADP + Pi	游离 D-氨基酸	酰基磷酸中间体机制， 与 Mur 类似	[99]
ATP-grasp/L-amino acid ligase (Lal)	YwfE/TabS/ RizA/RizB	AA1 + AA2 + ATP → AA1-AA2 + ADP + Pi	游离 L-氨基酸	ATP 活化羧基 → 酰基磷酸 → 胺进攻	[100]

可覆盖全部 20 种天然 *L*-氨基酸及部分非天然氨基酸, 实现 136 种二肽的定向合成^[41]。进一步拓展了 *L*-氨基酸连接酶在定制化二肽绿色制造中的应用潜力。与此同时, RizA、RizB、RSp1486a、BL00235、PSPPH_4299、Plu1440 等一系列 *L*-氨基酸连接酶相继被挖掘鉴定, 逐步完善了该酶家族的资源库, 为功能性二肽的酶法合成提供了丰富的工具酶 (表 2)。

随着酶资源的不断丰富, *L*-氨基酸连接酶的催化机制也逐渐得到阐明。多种 Lal 家族酶的晶体结构解析表明, 其均具有典型的三结构域单体架构, 包括 N 端 A 结构域、中心 B 结构域和 C 端 C 结构域 (图 6a)^[101-103]。其中, A 结构域和 B 结构域共同形成 ATP-grasp 超家族保守的 ATP 结合裂隙, 负责 ATP 结合及酰基磷酸中间体的形成, 而 A、C 结构域分别决定 N 端和 C 端氨基酸底物的识别特异性, B 结构域则参与催化中心的构建, 共同决定

酶的底物谱和催化效率。值得注意的是, Lal 家族普遍存在 N 端和 C 端底物结合位点的底物偏好差异。以经典 YwfE 为例, 其 N 端 A 结构域更偏好结合小体积氨基酸 (如 *L*-Ala), 而 C 端 C 结构域则倾向识别疏水性氨基酸 (如 *L*-Phe 和 *L*-Met)。进一步的晶体结构分析发现, W332 是 YwfE N 端底物结合口袋识别小分子氨基酸的关键保守残基 (图 6b), 这一发现为后续基于结构的理性设计、底物谱拓展及催化性能优化提供了重要的理论依据。

基于上述研究进展, *L*-氨基酸连接酶已逐渐发展成为 ATP 依赖型肽键形成酶中最具工业应用潜力的一类催化平台。本文进一步系统总结了目前已报道的 *L*-氨基酸连接酶资源及其在功能性二肽合成中的应用进展 (表 3), 并重点归纳其底物谱特性、工程化改造策略及工业应用前景, 为后续新型 Lal 的开发与功能优化提供参考。

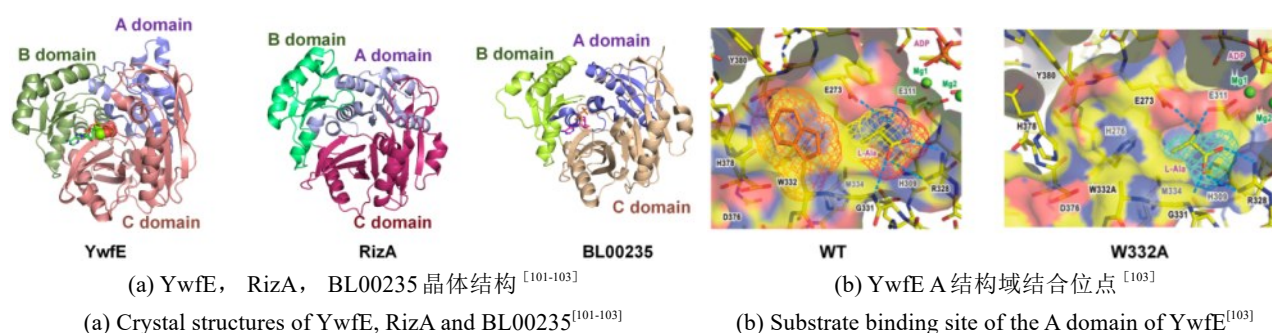


图 6 *L*-氨基酸连接酶结构

Fig. 6 Structure of *L*-amino acid ligases

表 3 *L*-氨基酸连接酶应用实例

Table 3 Applications of *L*-amino acid ligases

酶名称	年份	<i>L</i> -氨基酸连接酶来源	注释	Ref.
Lal-5	2025	<i>Pseudomonas sessilinigenes</i>	该研究通过筛选高活性 <i>L</i> -氨基酸连接酶并构建“肽酶敲除+PPK 介导 ATP 再生”的工程大肠杆菌全细胞体系, 实现了 Leu-Leu 二肽的高效合成	[104]
Lals	2023	<i>Bacillus subtilis</i>	该研究通过 <i>L</i> -氨基酸连接酶催化并耦合 ATP 再生体系, 实现了 Ala-Tyr 二肽的高效、经济生物合成。	[105]
YwfE mutations	2023	<i>Bacillus subtilis</i>	以来源于 <i>Bacillus subtilis</i> 的 YwfE 为研究对象, 探究底物偏好改造关键位点	[106]
YwfE	2022	<i>Bacillus subtilis</i>	本文构建了以泗阳鞘氨醇杆菌 PPK2 为 ATP 再生核心的体系, 并与 <i>L</i> -氨基酸连接酶 YwfE 联用, 实现了依赖 ATP 的催化反应高效合成丙谷二肽 (Ala-Gln)	[107]
LdmS	2022	<i>Staphylococcus aureus</i>	本研究鉴定并解析了 <i>L</i> -天冬氨酸- <i>L</i> -蛋氨酸连接酶 (LdmS), 并揭示其特异催化机制及在硫氨基酸代谢中的潜在调控作用	[108]
RizA	2022	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究通过将 <i>L</i> -氨基酸连接酶 RizA 与 ATP 再生酶乙酸激酶 (AckA) 共固定化, 并结合 RizA 理性突变改造, 显著提高了 Arg-Ser 和 Arg-Phe 等生物活性精氨酸二肽的合成效率与稳定性	[109]

续表

酶名称	年份	L-氨基酸连接酶来源	注释	Ref.
BaLal_16	2021	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	本研究通过对 BaLal_16 活性口袋区域进行定向改造, 获得 L110Y 和 N108F/L110Y 突变体, 显著提高了对 <i>L</i> -Ala 和 <i>L</i> -Gln 的催化效率, 并在 Ala-Gln 二肽生产中实现产率和磷酸释放的明显提升	[110]
YwfE	2020	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究通过代谢工程改造大肠杆菌, 优化了 <i>L</i> -丙谷二肽的全细胞生物催化体系, 实现 71.7 mM 产量及 71.7% 转化率	[15]
TabS	2016	<i>Pseudomonas syringae</i>	本研究基于同源酶序列比对加过, 对 TabS 底物结合区域残基进行定点突变, 成功调控了酶的底物选择性	[111]
RizA	2015	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究实现了 RizA 无底物晶体结构解析	[102]
BL00235	2015	<i>Bacillus licheniformis</i>	本研究发现了 BL00235C 端底物结合口袋影响底物选择性的关键残基 Pro85	[112]
YwfE	2014	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究基于 YwfE 晶体结构解析发现, N 端 Arg328 和 Trp332 分别为催化和底物识别对底物氨基酸识别关键残基	[103]
TabS	2013	<i>Pseudomonas syringae</i>	目前已报到底物谱最广的 <i>L</i> -氨基酸连接酶	[41]
Plu1440	2013	<i>Photorhabdus luminescens</i>	通过利用识别 Asn/Gln 二与 NTA1 的选择性脱酰胺反应结合, 实现了先前无法合成的 N 端酸性氨基酸底物酸性二肽的酶法合成	[113]
RSp1486a		<i>subsp. laumondii TT01</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>		
BL00235	2012	<i>Bacillus licheniformis</i>	本研究解析了 BL00235 晶体结构, 与 YwfE 相比, 整体结构相似, 但催化位点周围存在显著差异, 为 BL00235 底物特异性研究提供了重要信息	[101]
YwfE	2012	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究解析了 YwfE 与 ADP 及中间体类似物的复合物晶体结构, 揭示了 YwfE 的关键结合与催化残基及催化机制	[50]
YwfE	2012	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究提供了 YwfE 与其结合底物的复合物晶体结构	[114]
RizB	2010	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究发现新型 <i>L</i> -氨基酸连接酶 RizB, 是首个被报道具有寡肽合成活性的 <i>L</i> -氨基酸连接酶	[115]
plu1440	2010	<i>Photorhabdus luminescens</i>	本研究挖掘获得新型 <i>L</i> -氨基酸连接酶 plu1440, 该酶具有此前未见的底物特异性, 能够以 <i>L</i> -天冬酰胺作为 N 端底物催化生成二肽	[116]
YwfE	2010	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究表明通过增强二肽的外排, 可降低细胞内二肽积累及其对生长的抑制效应, 从而有效提升 Ala-Gln 等二肽的发酵生产效率	[117]
SMU.1321c	2010	<i>Streptococcus mutans</i>	通过基于隐藏马尔可夫模型(HMM)的体外序列分析筛选, 鉴定出五种新型具有不同底物特异性的 <i>L</i> -氨基酸连接酶	[118]
Plu1218		<i>Photorhabdus luminescence</i>		
TDE2209		<i>subsp. Laumondii</i>		
Aple02000835		<i>Treponema denticola</i>		
SP0885.		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>		
RizA	2009	<i>Bacillus subtilis</i>	本研究鉴定出新型 <i>L</i> -氨基酸连接酶 RizA, 并发现其 N 端底物严格限制为 Arg, 而 C 端底物选择性相对宽松	[119]
PSPPH4299	2008	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	在 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A 的 phaseolotoxin 生物合成基因簇中, 本研究鉴定出一种新型 <i>L</i> -氨基酸连接酶, 该酶可催化含碱性氨基酸的多种杂二肽生成	[120]
BL00235	2008	<i>Bacillus licheniformis</i>	研究鉴定出一种新型 <i>L</i> -氨基酸连接酶, 其底物特异性严格, 仅以甲硫氨酸或亮氨酸作为二肽的 N 端残基	[121]
RSp1486a	2008	<i>Ralstonia solanacearum</i>	本研究新型 Lal 蛋白 RSp1486a, 其倾向于合成 N 端为较大体积氨基酸、C 端为较小氨基酸的异二肽	[122]
YwfE	2007	<i>Bacillus subtilis</i>	通过代谢工程改造 <i>E. coli</i> 并表达 <i>L</i> -氨基酸连接酶(YwfE), 实现了无需外加氨基酸的 Ala-Gln 高效发酵生产(>100 mM)	[6]
YwfE	2005	<i>Bacillus subtilis</i>	YwfE 的首次报道, 可合成多种 α -二肽(44 种), 且不生成三肽或含 <i>D</i> -氨基酸的肽	[39]

4.2 L-氨基酸连接酶的结构解析与工程化改造

根据前述,多种来源Lal的晶体结构相继被解析,研究表明不同来源的该类酶在整体折叠上高度保守。尽管不同来源Lal在整体折叠和催化机制上高度一致,用于两端氨基酸底物识别的A、C结构域,以及参与催化中心构建的B结构域,共同决定酶的催化效率和底物谱,其构建的底物结合口袋、底物进入通道及局部微环境在不同酶之间呈现显著差异,从而赋予其不同的催化特异性和底物识别能力。

目前已解析的典型Lal结构充分体现了这一规律。来源于*Bacillus subtilis*的YwfE是首个完成晶体结构解析的Lal,其N端底物结合口袋由于存在关键大体积芳香族残基,对小分子氨基酸(如L-Ala)表现出较高专一性,而C端口袋则具有较为开放的疏水环境,可容纳L-Phe、L-Met等疏水性氨基酸^[103]。进一步研究表明,位于N端底物结合口袋的W332是限制底物空间的重要保守残基(图6b),其侧链构象直接影响底物结合空间和催化特性。相比之下,同样来源于*Bacillus subtilis*的RizA虽然保持保守的ATP-grasp折叠,但其活性口袋电荷分布及几何构型发生明显变化,更倾向识别带

正电或长侧链氨基酸(如L-Arg)作为N端底物^[102]。近期解析的*Staphylococcus aureus*来源LdmS则进一步体现了活性位点电荷适配性的差异,其底物结合区域富集可与酸性侧链形成盐桥或氢键的关键残基,从而实现对L-Asp的特异性识别,并催化L-Asp与L-Met偶联,参与硫氨基酸代谢调控^[108]。这些研究表明,Lal底物谱的形成并非来源于整体骨架的改变,而主要依赖于底物结合口袋空间、电荷微环境及底物进入通道等局部结构的精细调控。

基于上述结构认识,近年来Lal的工程化改造主要围绕催化效率提升和底物谱拓展展开,目前可归纳为三类典型策略。第一类为活性口袋空间重塑(active-site remodeling),以YwfE为代表(表4),通过对N端底物结合口袋关键位点进行定点突变(如W332A)^[103],去除体积较大的芳香族侧链,扩大底物结合空间,使具有较大侧链的氨基酸能够进入活性中心。然而,该策略在拓宽底物谱的同时,也可能削弱活性中心对ATP和底物的构象约束,导致ATP非生产性水解增加,反映出底物空间扩展与催化耦合稳定性之间存在一定权衡。第二类为柔性环区(loop)构象重塑,以BL00235和TabS为代表(表4),通过调控Pro85

表4 L-氨基酸连接酶的工程化改造

Table 4 Engineering and modification of L-amino acid ligases

酶源	改造方法(突变位点)	结构变化	催化效果及底物特异性	Ref.
<i>B. Subtilis</i> YwfE	Trp332Ala (W332A)	将原本占据N端底物口袋的庞大吡啶环侧链去除,在N端底物结合口袋内创造了一个全新的空腔(Cavity)。	打破了对小氨基酸(L-Ala)的限制,使酶能够接受侧链更大、更复杂的氨基酸进入N端口袋;但也导致了脱钩现象:即使在没有底物L-Ala存在时,该突变体也会非生产性水解ATP。	[103]
<i>B. Licheniformis</i> BL00235	Pro85区域突变 (通过比对引入亲水性/小残基)	改变了活性中心周围局部Loop区的柔性或空间位阻,优化了对C端短链氨基酸的接纳度。	成功改变了底物特异性,实现了咸味增强剂Met-Gly(甲硫氨酰-甘氨酸)的高选择性、高效率合成。	[112]
<i>Pseudomonas syringae</i> TabS	基于BL00235残基位点经验的同源突变	调整了该对应保守区域的空间排布与亲疏水性环境。	大幅提升了利用Pro和Gly作为底物合成高附加值风味二肽Pro-Gly的生产效率。	[111]
<i>B. amyloliquefaciens</i> BaLal_16	L110Y、N108F/ L110Y双突变	针对活性口袋入口处的“门控(Gate)”残基进行工程化,引入体积更大的芳香族侧链,重新调整了底物通道的开关状态和空间形貌。	显著促进了对底物L-Gln的接纳与稳定。双突变体对合成L-Ala-L-Gln(阿拉酰谷氨酰胺)的催化效率(k_{cat}/K_m)相比野生型增加了4.06倍	[110]
<i>B. subtilis</i> RizA	T81F_A158S和K83F_ S156A组合突变	通过重塑RizA的特异性口袋,芳香族残基的引入调整了电荷排布并改变了疏水层。	突变体表现出极高的生物催化活性和产物选择性。T81F_A158S实现了11.3 mM的Arg-Ser合成;K83F_S156A实现了11.8 mM降血压二肽Arg-Phe的合成(相比野生型生产能力提高了5倍)。	[109]

及邻近 loop 区域的柔性, 促进底物结合过程中更加充分的结构域闭合 (domain closure), 从而增强诱导契合 (induced fit) 效应, 稳定过渡态结构, 并有效提高 Gly、Pro 等特殊底物的催化效率和底物适应范围^[112]。第三类为底物通道门控 (gate residue) 调控, 以 BaLal_16 为代表 (表4), 通过改造底物扩散通道瓶颈区域的 Asn108、Leu110 等关键门控残基 (如 N108F、L110Y), 利用 π - π 相互作用及局部电荷重塑改变底物扩散能垒, 提高目标底物 (如 *L*-Gln) 的进入效率和催化通量^[110]。

总体而言, 目前 Lal 工程化改造已由早期单纯依赖活性位点突变逐渐发展为融合活性口袋空间优化、构象动力学调控及底物通道工程的多维设计策略, 从底物结合、诱导契合及底物输运三个层面系统重塑了 Lal 的底物识别机制, 为非天然氨基酸底物拓展、定制化二肽绿色制造及高性能 Lal 的理性设计提供了重要理论依据。

5 蛋白酶/肽酶及 α -氨基酸脂酰转移酶

5.1 蛋白酶/肽酶及 α -氨基酸脂酰转移酶的发展历程与研究进展

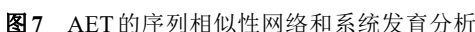
本部分将蛋白酶/肽酶与 α -氨基酸酯酰基转移酶 (α -amino acid ester acyltransferase, AET) 统一进行讨论, 主要基于二者在催化机制上的内在关联性。两类酶均属于丝氨酸酰化-去酰化催化体系, 其催化过程均经历酰酶中间体的形成与去酰化两个关键步骤。不同之处在于, 蛋白酶天然催化方向为肽键水解, 而肽键合成本质上是其水解反应在特定条件下的逆向实现; 相比之下, AET 则以酰基转移为天然催化功能, 其酰基转移活性与水解活性并存, 但更倾向于发生酰基转移反应, 因此能够在水相体系中高效催化肽键形成。基于这一催化特性, AET 可视为蛋白酶催化体系在二肽生物合成方向上的重要拓展。

蛋白酶介导的酶促肽键合成研究起步较早 (图1), 经过数十年的发展已形成较为成熟的理论体系和工艺策略^[123]。目前主要包括两类催化模式: 一类为动力学控制策略 (kinetically controlled synthesis), 采用氨基酸酯或酰胺等活化底物作为

酰基供体, 提高酰基供体的反应活性, 使酶优先催化酰基向亲核氨基转移; 另一类为热力学控制策略 (thermodynamically controlled synthesis), 利用水解与合成之间的平衡关系, 通过提高底物浓度、降低体系水活度、采用有机溶剂、两相体系或限水体系, 以及产物沉淀或相分离萃取等方式持续推动反应平衡向肽键生成方向移动。值得注意的是, 除甘油等部分多元醇可提高酶稳定性外, 大多数有机溶剂 (如丁二醇、二甲基亚砷等) 都会不同程度降低蛋白酶活性。同时, 由于蛋白酶天然具有较强水解活性, 底物竞争、水解副反应及产物二次降解普遍存在, 使其催化效率、转化率和产物选择性仍受到一定限制, 难以完全满足工业化生产需求^[124]。鉴于蛋白酶催化体系已有多篇综述进行了系统总结^[125], 本文不再展开讨论, 而重点介绍近年来快速发展的 AET 体系。

AET 的发现为蛋白酶催化体系提供了新的发展方向。2005 年, 研究者首次从 *Empedobacter brevis* ATCC14234 中鉴定获得 AET, 该酶能够以 *L*-丙氨酸甲酯和 *L*-谷氨酰胺为底物, 在水相体系中高效合成 *L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺 (Ala-Gln), 产率超过 80%, 显著优于传统蛋白酶催化体系, 同时较宽的底物适应性也赋予其合成多种二肽及低聚肽的潜力^[124]。2011 年, Isao 等进一步克隆并表征了来源于 *Empedobacter brevis* 和 *Sphingobacterium siyangensis* AJ2458 的 AET^[40], 并与来源于 *Acetobacter pasteurianus* 和 *Rhodococcus sp.* 的 α -氨基酸酯水解酶 (AEH、CocE) 进行了系统比较分析^[126, 127] (图7a), 研究表明, 三者均遵循典型的丝氨酸酰化-去酰化催化机制, 但 AET 与 AEH、CocE 属于不同的家族分类, AET 具有保守的 GxSYxG 催化基序, 其中丝氨酸残基构成催化中心关键位点, 表明 AET 属于典型的丝氨酸水解酶/酰基转移酶超家族成员。

此后, AET 相关研究主要围绕来源于 *E. brevis* 和 *S. siyangensis* 的 EbAET 和 SsAET 展开, 重点聚焦于 Ala-Gln 等高附加值功能性二肽的绿色制备及工艺优化。目前, 通过反应体系优化、酶固定化及工艺放大等策略, AET 催化 Ala-Gln 的产量已提高至约 78 g/L^[128], 成为目前最具工业化应用前景的二肽酶催化体系之一。然而, 与其应用开发相



比, AET在结构生物学和催化机制方面的研究仍相对滞后, 目前尚缺乏高分辨率晶体结构, 其催化过程中底物识别、酰基转移偏好及底物谱形成机制仍有待进一步阐明, 这可能与其异源表达过程中易形成包涵体、可溶性表达水平较低等因素有关^[129]。此外, 新型AET资源的挖掘仍相对有限, 也是目前大多数研究仍集中于Ala-Gln等既有目标体系的原因^[130]。近年来, Chiara等利用祖先序列重建(ancestral sequence reconstruction, ASR)策略获得多个具有催化活性的AET祖先变体, 不仅显著提高了酶的热稳定性, 还拓展了其对部分非天然底物的催化能力, 充分体现了进化工程在AET性能优化中的巨大潜力^[127](图7b)。

总体而言, 蛋白酶体系依托丰富的酶资源和成熟的催化理论, 为酶促肽键合成奠定了重要基础; 而 AET 凭借天然偏向酰基转移、高水相催化效率、高转化率及较宽底物适应性等优势, 逐渐发展成为功能性二肽绿色制造的重要酶催化平台。尽管目前 AET 在酶资源、结构解析及催化机制研究方面仍相对不足, 但随着新酶挖掘、蛋白质工程及人工智能辅助酶设计的发展, 其在定制化二肽及非天然肽生物制造中的应用潜力有望进一步释放。因此, 本文进一步系统总结了目前 AET 在酶资源、结构特征、催化机制及工程应用等方面的研究进展 (表 5)。

目前, α -氨基酸酯酰基转移酶 (AET) 的工程

化改造研究仍处于起步阶段，其发展明显滞后于L-氨基酸连接酶和NRPS等肽合成酶体系。其中，高分辨率晶体结构的缺乏是限制AET理性设计的主要瓶颈。目前，AET的催化机制主要基于同源建模、AlphaFold结构预测及分子动力学模拟进行推测，其底物识别、酰基转移偏好及催化选择性的分子机制仍有待进一步解析。

近年来,随着人工智能辅助蛋白结构预测技术的发展,AET工程化开始由传统随机突变逐步向结构指导的半理性设计转变。Wang等首先基于AlphaFold预测结构对AET进行丙氨酸扫描、虚拟饱和突变及分子模拟分析,识别出I115、D203、F211、A298、D300和R334等潜在关键位点,并构建双酶偶联高通量筛选体系,实现突变体的快速筛选。最终获得优势突变体A298C,其催化活性较野生型提高23.7%。分子动力学分析进一步表明,A298C能够增强催化口袋局部柔性,并促进底物形成额外氢键,从而提高底物结合稳定性和Ala-Gln的合成效率(图8a)^[132]。除单点理性设计外,随机突变与半理性设计相结合也成为提升AET性能的重要策略。Isao等以来源于*Sphingobacterium siyangensis* AJ2458的SsAET为研究对象,在结构预测基础上结合随机突变和高通量筛选,共获得10个活性提高1.2-1.7倍的有利单点突变。进一步通过组合优化构建多位点突变体M35-4,使其催化阿斯巴甜前体 α -L-Asp-L-Phe甲酯的活性提高5.7倍(图8b),表明多位点协同优

化能够有效改善 AET 的整体催化性能^[136]。

表5 α-氨基酸脂酰转移酶应用实例

Table 5 Applications of α-amino acid ester acyl transferase

酶名称	年份	α-氨基酸脂酰转移酶来源	注释	Ref.
N166 N256 N281	2026	祖先序列重建	针对 AET 酶类稳定性较差问题,该研究通过 SSN 筛选与祖先序列重建策略,筛选得到多个耐热型 AET 酶	[127]
SsAET	2026	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	通过酿酒酵母表面展示固定化 SsAET,实现 AET 酶的重复利用	[131]
EAET	2026	<i>Bacillus pumilus</i>	EAET 基于 AlphaFold3 结构预测与半理性设计筛选出关键残基 F330,经过突变后,在 300 mM 底物条件下达到 82.59% 转化率	[130]
EmAET	2025	<i>Elizabethkingia miricola</i>	针对 AET 酶的普遍的蛋白表达问题进行优化,通过多策略优化,体积活力提升 10 倍	[129]
SsAET	2024	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	基于 SsAET 结构预测模型与半理性设计构建突变文库,鉴定出关键突变位点 A298C	[132]
SsAET	2023	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	通过宿主细胞内源性二肽酶基因敲除,减轻 Ala-Gln 发酵生产时的降解问题	[133]
SsAET	2023	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	证明 SsAET 的 Asn442 位点的 N-糖基化修饰抑制酶活	[134]
SsAET	2023	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	构建了以 ZIF-8 金属有机骨架为载体,SsAET 为目标酶的固定化酶系统,实现 AET 酶的重复利用	[135]
SsAET	2023	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	采用随机突变与理性改造,获得 10 突变的 SsAET,活性提升 5.7 倍	[136]
AET	2020	<i>Empedobacter brevis</i>	利用 AET 与化学法结合,构建酶+化学催化的阿斯巴甜合成路线	[137]
SsAET	2020	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	针对 AET 稳定性问题,利用海藻酸钙制备高温度和宽 pH 稳定的全细胞固定化催化剂	[138]
SsAET	2019	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	针对 AET 稳定性问题,通过琼脂固定化酵母细胞制备固定化酶催化剂	[139]
SsAET	2018	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	构建 AET 酶在 <i>Escherichia coli</i> 中异源表达菌株,实现高效合成 Ala-Gln,产量达到 78.2 g/L、转化率 75%	[128]
SsAET	2017	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	在 <i>Escherichia coli</i> Origami 2 中优化表达 SsAET,使 Ala-Gln 合成达到 94.7% 摩尔收率和 1.89 g·L ⁻¹ ·min ⁻¹ 的生产效率	[140]
SsAET	2013	<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	该研究在 <i>Escherichia coli</i> 中高效表达 SsAET,并通过优化高密度发酵与反应条件,全细胞催化 40 min 实现 69.7 g/L 的 Ala-Gln 产量	[141]
EbAET SsAET	2011	<i>Empedobacter brevis</i> <i>Sphingobacterium siyangensis</i>	鉴定获得两个高活性 AET 基因并在 <i>Escherichia coli</i> 中表达,达 1010-1154 U/mg;序列分析显示其含保守 GxSYxG 基序,属于丝氨酸酶家族。	[40]
EbAET	2005	<i>Empedobacter brevis</i>	首次发现新型肽合成酶:AET,在水相中以非保护氨基酸酯为供体、氨基酸为受体高效催化二肽及低聚肽合成	[124]

值得注意的是,近年来 AET 工程化已开始从单纯活性提升逐步拓展至酶稳定性和工业适用性的协同优化。最新研究基于 AlphaFold3 预测结构对来源于 *Bacillus pumilus* 的新型 AET (EAET) 开展半理性设计,获得突变体 F330Y,其酶活提高约 1.5 倍、30 °C 半衰期延长约 1.3 倍^[130]。分子动力学模拟显示,该突变增加了活性中心附近的柔性并形成新的氢键网络,在提高催化效率的同时增强了酶的热稳定性。结合响应面优化及工艺优化后,

Ala-Gln 在 300 mM 底物浓度下实现 82.6% 的转化率,进一步体现了 AI 辅助结构预测与分子模拟在 AET 工程化中的应用潜力。

总体而言,目前 AET 工程化仍主要依赖 AlphaFold 等结构预测模型、分子动力学模拟及高通量筛选相结合的半理性设计策略,其研究重点集中于催化效率、底物适应性和酶稳定性的协同优化。受限于实验结构信息缺乏,关于 AET 底物识别机制、酰基转移选择性及关键催化残基作用

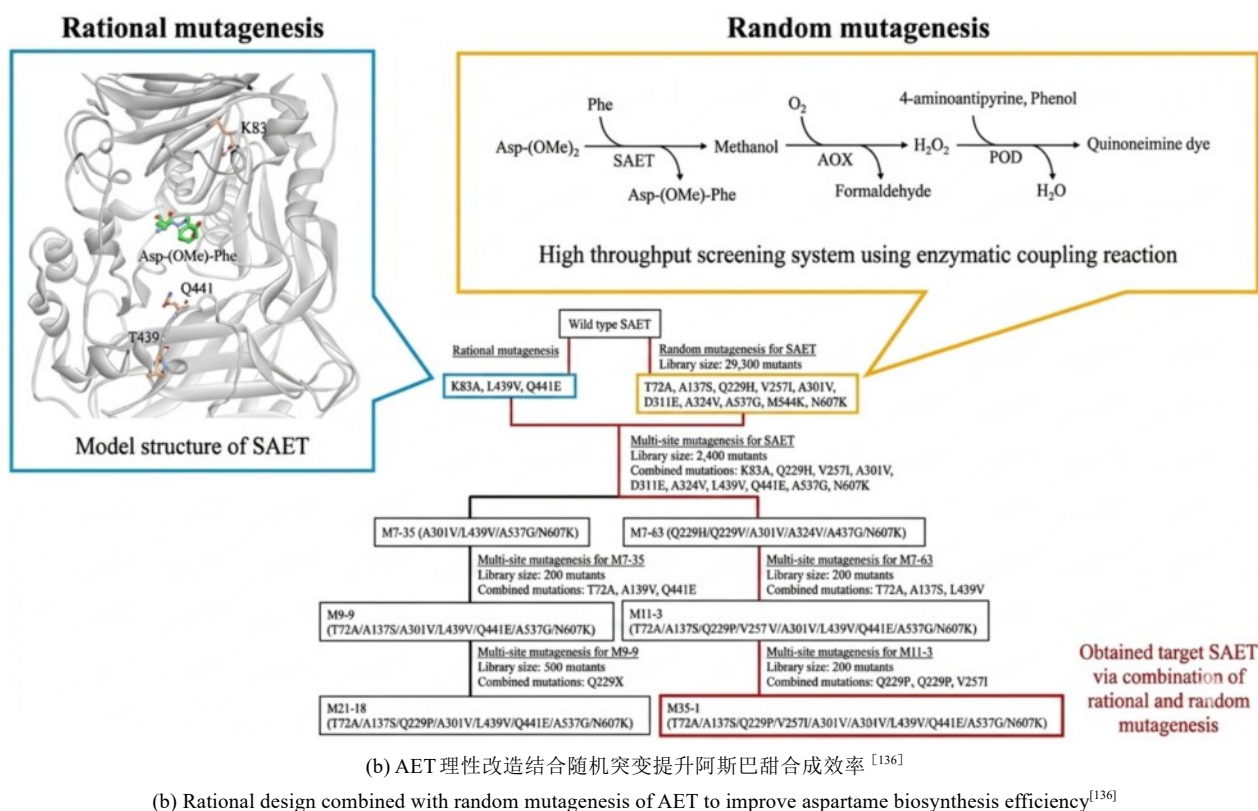
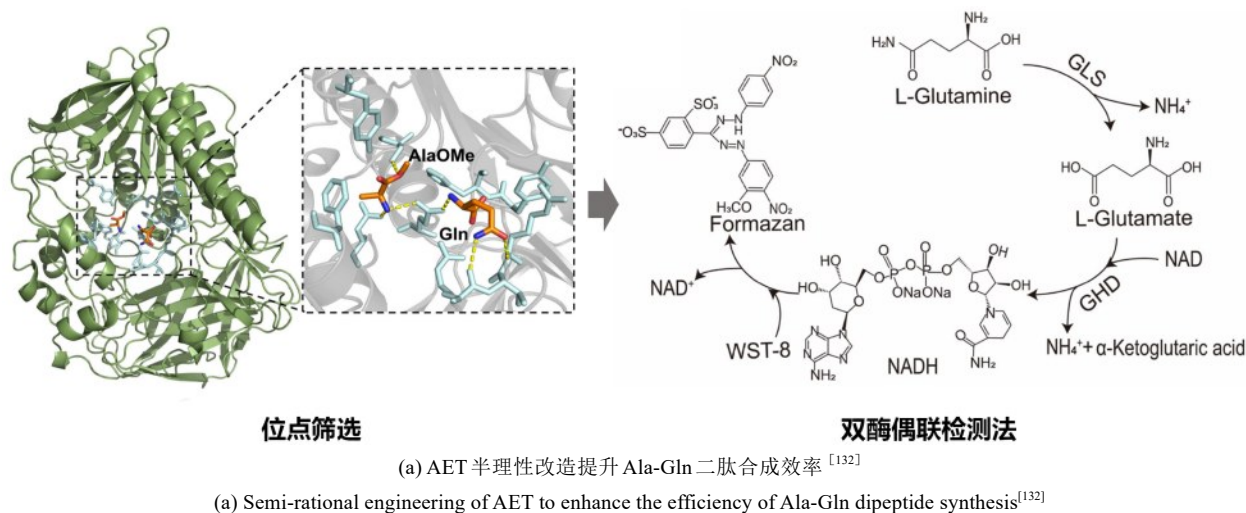


图8 AET的工程化改造

Fig. 8 Engineering and directed evolution of AET

机制的系统研究仍然不足。

6 挑战与展望

相较于传统化学合成与微生物发酵，酶催化

二肽合成凭借反应条件温和、区域与立体选择性高、副产物少及符合绿色制造理念等优势，已成为功能性二肽制备的重要发展方向。近年来，依托蛋白酶/肽酶^[36, 37]、NRPS^[38]、L-氨基酸连接酶^[39]、AET酶等^[40]多种酶促平台，并结合蛋白质工程、代谢工程及合成生物学等技术，多种活性

二肽已实现高效酶法合成,有效弥补了传统化学合成步骤繁琐、选择性差及环境负荷高等不足。然而,从现有研究进展来看,不同酶催化体系仍普遍面临催化机制认识不足、底物适应范围有限、酶工程改造效率较低以及产业化体系尚不完善等共性问题,限制了功能性二肽绿色制造技术的进一步发展。

首先,不同酶体系均存在各自关键技术瓶颈。蛋白酶/肽酶本质属于肽键水解酶,其肽键合成仅为水解反应的逆向过程或转肽副反应,热力学平衡天然偏向水解方向。即使通过调控水活度、采用活化底物或构建非水相体系等策略优化,仍难以从根本上解决合成与水解之间的竞争关系,导致底物转化率及产物选择性普遍较低^[124]。NRPS虽然具有模块化组装和广阔化学空间等优势,但各结构域及模块间存在高度特异性的蛋白-蛋白相互作用,常规结构域置换及模块重组容易破坏催化循环的连续性,导致催化效率显著下降^[83, 84],此外,Te结构域不仅参与肽链释放,还决定天然产物环化反应的时序与选择性,其与T结构域之间的动态协同机制仍有待进一步解析^[61]。Lals能够高效催化天然氨基酸二肽合成,但催化过程中存在ATP非生产性水解等能量损耗问题,同时N端和C端底物结合口袋具有明显的底物偏好性,限制了底物谱进一步拓展^[103]。AET是目前最具工业化应用潜力的二肽合成酶,但其高分辨率晶体结构仍未解析,底物识别、酰基转移偏好及催化机制尚不清晰,加之异源表达过程中易形成包涵体、可溶性表达水平较低,制约了理性设计和工业应用^[129]。

其次,酶催化二肽合成仍面临产业化配套技术不足的问题。目前多数研究仍停留于体外酶促反应或实验室规模验证,全细胞催化及工业放大研究相对有限。宿主细胞内源性肽酶对目标二肽的降解、ATP及辅因子再生效率不足、酶稳定性有限以及多酶体系间催化效率不匹配等问题,均限制了高产率、低成本和连续化生产体系的建立^[133]。此外,多数天然工具酶的底物结合口袋具有固定的空间构型和电荷分布,对非天然氨基酸、 β -氨基酸及其他特殊结构底物的识别能力有限,即使通过传统蛋白质工程能够实现一定程度的底物

谱拓展,仍难以满足新型功能化二肽及高附加值肽类分子的快速开发需求。

针对上述瓶颈,未来酶催化二肽合成的发展应围绕机制解析、智能酶设计、体系工程及过程强化四个层面协同推进。首先,在机制研究方面,应进一步结合高分辨率晶体学、冷冻电镜(Cryo-EM)、分子动力学模拟等技术,系统解析不同酶体系的催化循环、底物识别及结构域间动态协同机制,为酶的理性设计提供理论基础。其次,在酶工程方面,应进一步加强新型酶资源挖掘,拓展Lals和AET等工具酶对非天然氨基酸及特殊结构底物的适应能力,并重点突破ATP利用效率、底物谱及催化稳定性等关键限制因素。近年来,人工智能辅助酶设计技术快速发展,AlphaFold2/3、ESM-2/3、ProGen、Evo及RFdiffusion等蛋白结构预测和生成式人工智能模型,不仅能够实现蛋白质结构预测,还可用于底物结合位点识别、远程协同突变预测及新型酶序列生成,为二肽合成酶底物识别、催化活性及稳定性的协同优化提供了新的技术路径。进一步结合自动化酶工程平台、高通量筛选及机器学习驱动的Design-Build-Test-Learn(DBTL)闭环优化体系,有望实现酶设计、实验验证和数据反馈的快速迭代,加速新型二肽合成酶的开发。

与此同时,工艺与制造体系的发展同样至关重要。未来应进一步融合连续流生物制造、多酶级联催化、酶固定化、在线分离及数字化过程控制等技术,实现酶催化体系由实验室间歇反应向连续化、智能化和规模化制造转变。针对蛋白酶体系,可重点发展绿色低成本的非水或微水相催化体系,以降低水解副反应并提高逆向合成效率;对于NRPS,应进一步解析结构域间界面互作及远程协同调控机制,建立更加稳定、高效的模块化重编程策略;而Lals和AET则应重点突破新酶资源挖掘、底物谱拓展及高效表达等关键问题,进一步提升其工业适用性。

总体而言,本综述涉及的四类酶促平台各具优势(表9),并适用于不同的应用场景。NRPS凭借广阔的化学空间、丰富的模块化特性,在复杂天然产物、多肽药物及非天然肽分子的生物合成中具有不可替代的优势,但体系复杂、开发成本

表9 四类二肽合成酶促平台的比较

Table 9 Comparison of the four major enzymatic platforms for dipeptide synthesis

维度	NRPS	Lals	Protease	AET
反应类型	ATP 依赖模块化缩合	ATP 依赖直接缩合	可逆水解	酰基转移
催化机理	A-T-C 模块依次完成活化、转运和缩合	ATP 活化羧基形成酰磷酸中间体,再亲核攻击	酰酶中间体逆向形成肽键	活化酯直接发生酰基转移
底物形式	游离 AA、D-AA、非天然 AA	游离 L-AA	氨基酸、短肽、酯	氨基酸酯+氨基酸
产物	二肽、寡肽、环肽、复杂天然产物	天然氨基酸二肽	二肽、寡肽	二肽、部分寡肽
能量来源	ATP	ATP	热力学/动力学平衡	高能脂键
底物范围	天然氨基酸、非天然氨基酸	天然氨基酸	天然氨基酸、短肽	天然氨基酸
效率及转化率	低	高	中等	高
成本	高	中等	低	中等
模块化程度	成熟	结构简单,无需模块化	结构简单,无需模块化	结构简单,无需模块化
工程化改造难度	较难	简单	简单	中等
工业应用情况	较少	较多	较多	中等
优势及应用方向	化学空间大,适合合成复杂天然产物、多肽药物	低成本合成天然氨基酸二肽,组成多肽的二肽元件合成	二肽的合成,二肽及多肽片段的连接	无能量依赖的高效合成天然氨基酸二肽
技术难点	结构域改造以及相容性置换原件挖掘构建数量大	局限于天然氨基酸,底物谱有待拓展	反应平衡问题、水解问题	酶资源缺乏,受限酶可溶性表达问题,结构解析困难

较高; Lals 和 AET 具有催化效率高、工艺简单、转化率高等特点,更适用于天然氨基酸组成的二肽及短链寡肽的绿色制造,是目前最具工业化应用潜力的二肽催化平台;蛋白酶虽然在短肽合成方面存在一定局限,但凭借丰富的酶资源、成熟的工业应用基础及优异的肽片段连接能力,在多肽修饰和肽片段偶联等领域仍具有重要价值。未来,随着人工智能辅助酶设计、合成生物学、自动化酶工程及智能生物制造技术的持续发展,不同酶体系有望实现优势互补,构建兼具广底物谱、高催化效率、高稳定性及低生产成本的新一代二肽绿色制造平台,为功能性二肽及新型肽类药物的高效生物制造提供更加广阔的发展空间。

作者贡献声明:娄龙威、王淑弘、陈冬宇:文献调研与整理;娄龙威、王淑弘:绘制图谱;张毅、苏海霞、杨柳:参与撰写论文;娄龙威、李宗霖、杨柳:起草论文、修订论文、审核论文;娄龙威、李宗霖、李志敏:参与论文修订、论文最终版本修订。
所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突:没有利益冲突。

参 考 文 献

[1] Kearly A. Peptides: Powerful, Pervasive, and Full of Potential. *Journal of Experimental Botany*. 2025, 76, 5629-5633.

[2] Stehle, P, Pfaendler, P, Fürst, P. Isotachophoretic Analysis of a Synthetic Dipeptide L-Alanyl-L-Glutamine: Evidence for Stability During Heat Sterilization. *Journal of Chromatography A*. 1984, 294, 507-512.

[3] Fürst P. New Developments in Glutamine Delivery. *The Journal of Nutrition*. 2001, 131, 2562S-2568S.

[4] Webb, K E, Jr. Intestinal Absorption of Protein Hydrolysis Products: A Review. *Journal of Animal Science*. 1990, 68, 3011-3022.

[5] Stoineva, I B, Galunsky, B P, Lozanov, V S et al. Enzymic Synthesis Design and Enzymic Synthesis of Aspartame. *Tetrahedron*. 1992, 48, 1115-1122.

[6] Tabata, K, Hashimoto, S-I. Fermentative Production of L-Alanyl-L-Glutamine by a Metabolically Engineered *Escherichia Coli* Strain Expressing L-Amino Acid A -Ligase. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73, 6378-6385.

[7] Boldyrev, A A, Aldini, G, Derave, W. Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiological Reviews*. 2013,

- 93, 1803-1845.
- [8] Fürst, P, Pogan, K, Stehle, P. Glutamine Dipeptides in Clinical Nutrition. *Nutrition*. 1997, 13, 731-737.
 - [9] Lunow, D, Kaiser, S, Rückriemen, J et al. Tryptophan-Containing Dipeptides Are C-Domain Selective Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *Food Chemistry*. 2015, 166, 596-602.
 - [10] Kaiser, S, Martin, M, Lunow, D et al. Tryptophan-Containing Dipeptides Are Bioavailable and Inhibit Plasma Human Angiotensin-Converting Enzyme *In vivo*. *International Dairy Journal*. 2016, 52, 107-114.
 - [11] Caruso, G, Di Pietro, L, Cardaci, V et al. The Therapeutic Potential of Carnosine: Focus on Cellular and Molecular Mechanisms. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2023, 4, 100153.
 - [12] Tadesse, S A, Emire, S A. Production and Processing of Antioxidant Bioactive Peptides: A Driving Force for the Functional Food Market. *Heliyon*. 2020, 6, e04765.
 - [13] Isidro-Llobet, A, Kenworthy, M N, Mukherjee, S et al. Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification: From R&D to Production. *The Journal of Organic Chemistry*. 2019, 84, 4615-4628.
 - [14] Wang, T, Zhang, Y-R, Liu, X-H et al. Strategy for the Biosynthesis of Short Oligopeptides: Green and Sustainable Chemistry. *Biomolecules*. 2019, 9, 733.
 - [15] Zhu, J, Yang, W, Wang, B et al. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for Efficient Production of L-Alanyl-L-Glutamine. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19, 129.
 - [16] Liu, T, Peng, Z, Lai, M et al. Inverse Peptide Synthesis Using Transient Protected Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society*. 2024, 146, 4270-4280.
 - [17] Lubberink, M, Finnigan, W, Flitsch, S L. Biocatalytic Amide Bond Formation. *Green Chemistry*. 2023, 25, 2958-2970.
 - [18] Kissman, E N, Sosa, M B, Millar, D C et al. Expanding Chemistry through *in Vitro* and *in Vivo* Biocatalysis. *Nature*. 2024, 631, 37-48.
 - [19] Paul, C, Hanefeld, U, Hollmann, F et al. Enzyme Engineering for Biocatalysis. *Molecular Catalysis*. 2024, 555, 113874.
 - [20] Zhou, J, Huang, M. Navigating the Landscape of Enzyme Design: From Molecular Simulations to Machine Learning. *Chemical Society Reviews*. 2024, 53, 8202-8239.
 - [21] Jumper, J, Evans, R, Pritzel, A et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021, 596, 583-589.
 - [22] Abramson, J, Adler, J, Dunger, J et al. Accurate Structure Prediction of Biomolecular Interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024, 630, 493-500.
 - [23] Lin, Z, Akin, H, Rao, R et al. Evolutionary-Scale Prediction of Atomic-Level Protein Structure with a Language Model. *Science*. 2023, 379, 1123-1130.
 - [24] Hayes, T, Rao, R, Akin, H et al. Simulating 500 Million Years of Evolution with a Language Model. *Science*. 2025, 387, 850-858.
 - [25] Madani, A, Krause, B, Greene, E R et al. Large Language Models Generate Functional Protein Sequences across Diverse Families. *Nature Biotechnology*. 2023, 41, 1099-1106.
 - [26] Watson, J L, Juergens, D, Bennett, N R et al. De Novo Design of Protein Structure and Function with Rfdiffusion. *Nature*. 2023, 620, 1089-1100.
 - [27] Curtius T. Ueber Einige Neue Der Hippursäure Analog Constituirte, Synthetisch Dargestellte Amidosäuren. *Journal für Praktische Chemie*. 1882, 26, 145-208.
 - [28] Fischer, E, Fourneau, E. Ueber Einige Derivate Des Glykocolls. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1901, 34, 2868-2877.
 - [29] Suresh Babu, V V. One Hundred Years of Peptide Chemistry. *Resonance*. 2011, 16, 640-647.
 - [30] Du Vigneaud, V, Ressler, C, Swan, J M et al. The Synthesis of Oxytocin1. *Journal of the American Chemical Society*. 1954, 76, 3115-3121.
 - [31] Merrifield, R B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 1963, 85, 2149-2154.
 - [32] Cai, Z, Liu, L, Zou, C et al. Peptide Synthesis: A Review of Classical and Emerging Methods. *Biofabrication*. 2025, 18, 012001.
 - [33] Sharma, A, Kumar, A, De La Torre, B G et al. Liquid-Phase Peptide Synthesis (Lpps): A Third Wave for the Preparation of Peptides. *Chemical Reviews*. 2022, 122, 13516-13546.
 - [34] Monro, R E, Marcker, K A. Ribosome-Catalysed Reaction of Puromycin with a Formylmethionine-Containing Oligonucleotide. *Journal of Molecular Biology*. 1967, 25, 347-350.
 - [35] Ulijn, R V, Baragana, B, Halling, P J et al. Protease-Catalyzed Peptide Synthesis on Solid Support. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, 124, 10988-10989.
 - [36] Ferone, R, Singer, S C, Hunt, D F. *In Vitro* Synthesis of Alpha-Carboxyl-Linked Folylpolylglutamates by an Enzyme Preparation from *Escherichia Coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 1986, 261, 16363-16371.

- [37] Asano, Y, Nakazawa, A, Kato, Y et al. Discovery of a D-Stereospecific Aminopeptidase and Its Use as a Catalyst in Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1989, 28, 450-451.
- [38] Lipmann F. Non-Ribosomal Polypeptide Synthesis. *Acta Endocrinologica*. 1973, 74, S294-S300.
- [39] Tabata, K, Ikeda, H, Hashimoto, S-I. Ywfe in *Bacillus Subtilis* Codes for a Novel Enzyme, L-Amino Acid Ligase. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187, 5195-5202.
- [40] Abe, I, Hara, S, Yokozeki, K. Gene Cloning and Characterization of A-Amino Acid Ester Acyl Transferase in *Empedobacter Brevis* Atcc14234 and *Sphingobacterium Siyangensis* Aj2458. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2011, 75, 2087-2092.
- [41] Arai, T, Arimura, Y, Ishikura, S et al. L-Amino Acid Ligase from *Pseudomonas Syringae* Producing Tabtoxin Can Be Used for Enzymatic Synthesis of Various Functional Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79, 5023-5029.
- [42] Pereira, P C, Arends, I W C E, Sheldon, R A. A Green and Expedient Synthesis of Enantiopure Diketopiperazines Via Enzymatic Resolution of Unnatural Amino Acids. *Tetrahedron Letters*. 2014, 55, 4991-4993.
- [43] Rodnina, M V. The Ribosome as a Versatile Catalyst: Reactions at the Peptidyl Transferase Center. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013, 23, 595-602.
- [44] Süssmuth, R D, Mainz A. Nicht-Ribosomale Peptidsynthese – Prinzipien Und Perspektiven. *Angewandte Chemie*. 2017, 129, 3824-3878.
- [45] Gulick, A M. Conformational Dynamics in the Acyl-CoA Synthetases, Adenylation Domains of Non-Ribosomal Peptide Synthetases, and Firefly Luciferase. *ACS Chemical Biology*. 2009, 4, 811-827.
- [46] Fawaz, M V, Topper, M E, Firestine, S M. The Atp-Grasp Enzymes. *Bioorganic Chemistry*. 2011, 39, 185-191.
- [47] Tsuchiya, K, Miyagi, Y, Miyamoto, T et al. Synthesis of Polypeptides.(in: Shiro Kobayashi, Hiroshi Uyama, & Jun-ichi Kadokawa (eds). *Enzymatic Polymerization Towards Green Polymer Chemistry*. 233-265. Springer Singapore, Singapore (2019).
- [48] Rathod, G K, Misra, R, Jain, R. Advances in Peptide Synthesis. (in: edPrati Pal Singh (eds). *Recent Advances in Pharmaceutical Innovation and Research*. 193-213. Springer Nature Singapore, Singapore (2023).
- [49] Fan, C, Moews, P C, Walsh, C T et al. Vancomycin Resistance: Structure of D-Alanine:D-Alanine Ligase at 2.3 Å Resolution. *Science*. 1994, 266, 439-443.
- [50] Shomura, Y, Hinokuchi, E, Ikeda, H et al. Structural and Enzymatic Characterization of Bacd, an L-Amino Acid Dipeptide Ligase from *Bacillus Subtilis*. *Protein Science*. 2012, 21, 707-716.
- [51] Oinonen, C, Rouvinen, J. Structural Comparison of Ntn-Hydrolases. *Protein Science*. 2000, 9, 2329-2337.
- [52] Cui, Y, Chen, X, Wang, Z et al. Cell-Free Pure System: Evolution and Achievements. *BioDesign Research*. 2022, 2022, 9847014.
- [53] Ishida, S, Ngo, P H T, Gundlach, A et al. Engineering Ribosomal Machinery for Noncanonical Amino Acid Incorporation. *Chemical Reviews*. 2024, 124, 7712-7730.
- [54] Sigal, M, Matsumoto, S, Beattie, A et al. Engineering Trnas for the Ribosomal Translation of Non-Proteinogenic Monomers. *Chemical Reviews*. 2024, 124, 6444-6500.
- [55] Felnagle, E A, Jackson, E E, Chan, Y A et al. Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products. *Molecular Pharmaceutics*. 2008, 5, 191-211.
- [56] Dieckmann, R, Neuhoof, T, Pavela-Vrancic, M et al. Dipeptide Synthesis by an Isolated Adenylate-Forming Domain of Non-Ribosomal Peptide Synthetases (Nrps). *FEBS Letters*. 2001, 498, 42-45.
- [57] Bergendahl, V, Linne, U, Marahiel, M A. Mutational Analysis of the C-Domain in Nonribosomal Peptide Synthesis. *European Journal of Biochemistry*. 2002, 269, 620-629.
- [58] Doekel, S, Marahiel, M A. Dipeptide Formation on Engineered Hybrid Peptide Synthetases. *Chemistry & Biology*. 2000, 7, 373-384.
- [59] Gruenewald, S, Mootz Henning, D, Stehmeier, P et al. *In Vivo* Production of Artificial Nonribosomal Peptide Products in the Heterologous Host *Escherichia Coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70, 3282-3291.
- [60] Izoré, T, Candace Ho, Y T, Kaczmariski, J A et al. Structures of a Non-Ribosomal Peptide Synthetase Condensation Domain Suggest the Basis of Substrate Selectivity. *Nature Communications*. 2021, 12, 2511.
- [61] Schwarzer, D, Mootz, H D, Marahiel, M A. Exploring the Impact of Different Thioesterase Domains for the Design of Hybrid Peptide Synthetases. *Chemistry & Biology*. 2001, 8, 997-1010.
- [62] Trauger, J W, Kohli, R M, Mootz, H D et al. Peptide Cyclization Catalysed by the Thioesterase Domain of

- Tyrocidine Synthetase. *Nature*. 2000, 407, 215-218.
- [63] Zheng, D, Yuan, W, Tian, X et al. A Stem-Specific Cell Death-Inducing Cyclo-Dipeptide from Woody Plant Pathogen *Valsa Mali* Modulates Plant Immune Response. *Plant, Cell & Environment*. 2025, 48, 5819-5831.
- [64] Moldovan, A, Krischke, M, Huber, C et al. The Ausab Non-Ribosomal Peptide Synthetase of *Staphylococcus Aureus* Preferentially Generates Phevalin in Host-Mimicking Media. *mBio*. 2025, 16, e00845-00824.
- [65] Driche, E-H, Badji, B, Bijani, C et al. Antibacterial and Antibiofilm Properties of Two Cyclic Dipeptides Produced by a New Desert *Streptomyces Sp.* Hg-17 Strain against Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria. *International Microbiology*. 2025, 28, 241-255.
- [66] Xu, X, Liu, L, Xu, L et al. Regulatory Mechanism of C4-Dicarboxylates in Cyclo (Phe-Pro) Production. *Microbial Cell Factories*. 2024, 23, 255.
- [67] Issigonis, M, Browder, K L, Chen, R et al. A Niche-Derived Nonribosomal Peptide Triggers Planarian Sexual Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2024, 121, e2321349121.
- [68] Liu, X, Li, K, Yu, J et al. Cyclo-Diphenylalanine Production in *Aspergillus Nidulans* through Stepwise Metabolic Engineering. *Metabolic Engineering*. 2024, 82, 147-156.
- [69] Wu, Z, Li, Y, Fang, Y et al. Adenylation Domains of Nonribosomal Peptide Synthetase: A Potential Biocatalyst for Synthesis of Dipeptides and Their Derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*. 2022, 160, 110089.
- [70] Qi, J, Han, H, Sui, D et al. Efficient Production of a Cyclic Dipeptide (Cyclo-Ta) Using Heterologous Expression System of Filamentous Fungus *Aspergillus Oryzae*. *Microbial Cell Factories*. 2022, 21, 146.
- [71] Calcott, M J, Owen, J G, Ackerley, D F. Efficient Rational Modification of Non-Ribosomal Peptides by Adenylation Domain Substitution. *Nature Communications*. 2020, 11, 4554.
- [72] Berry, D, Mace, W, Grage, K et al. Efficient Nonenzymatic Cyclization and Domain Shuffling Drive Pyrrolopyrazine Diversity from Truncated Variants of a Fungal Nrps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019, 116, 25614-25623.
- [73] Dan, Q, Newmister, S A, Klas, K R et al. Fungal Indole Alkaloid Biogenesis through Evolution of a Bifunctional Reductase/Diels - Alderase. *Nature Chemistry*. 2019, 11, 972-980.
- [74] Abe, T, Kobayashi, K, Kawamura, S et al. Dipeptide Synthesis by Internal Adenylation Domains of a Multidomain Enzyme Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2019, 65, 1-10.
- [75] Zhang, F, Mulati, N, Wang, Y et al. Biosynthesis in Vitro of Bacillamide Intermediate-Heterocyclic Alacysthiazole by Heterologous Expression of Nonribosomal Peptide Synthetase (Nrps). *Journal of Biotechnology*. 2019, 292, 5-11.
- [76] Rischer, M, Raguž, L, Guo, H et al. Biosynthesis, Synthesis, and Activities of Barnesin a, a Nrps-Pks Hybrid Produced by an *Anaerobic Epsilonproteobacterium*. *ACS Chemical Biology*. 2018, 13, 1990-1995.
- [77] Blättner, S, Das, S, Paprotka, K et al. *Staphylococcus Aureus* Exploits a Non-Ribosomal Cyclic Dipeptide to Modulate Survival within Epithelial Cells and Phagocytes. *PLOS Pathogens*. 2016, 12, e1005857.
- [78] Hartwig, S, Dovengerds, C, Herrmann, C et al. *Drosophila* Ebony: A Novel Type of Nonribosomal Peptide Synthetase Related Enzyme with Unusually Fast Peptide Bond Formation Kinetics. *The FEBS Journal*. 2014, 281, 5147-5158.
- [79] Kries, H, Wachtel, R, Pabst, A et al. Reprogramming Nonribosomal Peptide Synthetases for "Clickable" Amino Acids. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014, 53, 10105-10108.
- [80] Li, B, Walsh, C T. Identification of the Gene Cluster for the Dithiolopyrrolone Antibiotic Holomycin in *Streptomyces Clavuligerus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, 107, 19731-19735.
- [81] Bozhüyük, K a J, Präve, L, Kegler, C et al. Evolution-Inspired Engineering of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Science*. 2024, 383, eadg4320.
- [82] Heard, S C, Winter, J M. Structural, Biochemical and Bioinformatic Analyses of Nonribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domains. *Natural Product Reports*. 2024, 41, 1180-1205.
- [83] Niquille, D L, Hansen, D A, Mori, T et al. Nonribosomal Biosynthesis of Backbone-Modified Peptides. *Nature Chemistry*. 2018, 10, 282-287.
- [84] 王辰, 徐玉泉. 非核糖体肽合成酶工程改造研究进展. *生物工程学报*. 2021, 37, 1845-1857.
- Wang C, Xu Y Q. Advances in engineering non-ribosomal peptide synthetase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 1837(1846): 1845-1857.
- [85] Belshaw, P J, Walsh, C T, Stachelhaus, T. Aminoacyl-Coas as Probes of Condensation Domain Selectivity in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Science*. 1999, 284, 486-489.

- [86] Ehmann, D E, Trauger, J W, Stachelhaus, T et al. Aminoacyl-Snacs as Small-Molecule Substrates for the Condensation Domains of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chemistry & Biology*. 2000, 7, 765-772.
- [87] Bloudoff, K, Schmeing, T M. Structural and Functional Aspects of the Nonribosomal Peptide Synthetase Condensation Domain Superfamily: Discovery, Dissection and Diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2017, 1865, 1587-1604.
- [88] Folger, I B, Frota, N F, Pistofidis, A et al. High-Throughput Reprogramming of an Nrps Condensation Domain. *Nature Chemical Biology*. 2024, 20, 761-769.
- [89] Messenger, S R, McGuinnety, E M R, Stevenson, L J et al. Metagenomic Domain Substitution for the High-Throughput Modification of Nonribosomal Peptides. *Nature Chemical Biology*. 2024, 20, 251-260.
- [90] Jaremko, M J, Lee, D J, Patel, A et al. Manipulating Protein - Protein Interactions in Nonribosomal Peptide Synthetase Type Ii Peptidyl Carrier Proteins. *Biochemistry*. 2017, 56, 5269-5273.
- [91] Bozhüyük, K a J, Fleischhacker, F, Linck, A et al. De Novo Design and Engineering of Non-Ribosomal Peptide Synthetases. *Nature Chemistry*. 2018, 10, 275-281.
- [92] Thong, W L, Zhang, Y, Zhuo, Y et al. Gene Editing Enables Rapid Engineering of Complex Antibiotic Assembly Lines. *Nature Communications*. 2021, 12, 6872.
- [93] Barreteau, H, Kovač, A, Boniface, A et al. Cytoplasmic Steps of Peptidoglycan Biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, 32, 168-207.
- [94] Bertrand, J A, Auger, G, Fanchon, E et al. Crystal Structure of Udp-N-Acetylmuramoyl-L-Alanine:D-Glutamate Ligase from *Escherichia Coli*. *The EMBO Journal*. 1997, 16, 3416-3425.
- [95] Smith, C A. Structure, Function and Dynamics in the Mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *Journal of Molecular Biology*. 2006, 362, 640-655.
- [96] Mol Clifford, D, Brooun, A, Dougan Douglas, R et al. Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrate- and Product-Bound Complexes of Udp-N-Acetylmuramic Acid: L-Alanine Ligase (Murc) from *Haemophilus Influenzae*. *Journal of Bacteriology*. 2003, 185, 4152-4162.
- [97] Qi, H, Atkinson, I, Xiao, S et al. Folylpoly- Γ -Glutamate Synthetase: Generation of Isozymes and the Role in One Carbon Metabolism and Antifolate Cytotoxicity. *Advances in Enzyme Regulation*. 1999, 39, 263-273.
- [98] Kang, W-K, Icho, T, Isono, S et al. Characterization of the Gene *Rimk* Responsible for the Addition of Glutamic Acid Residues to the C-Terminus of Ribosomal Protein S6 in *Escherichia Coli* K12. *Molecular and General Genetics MGG*. 1989, 217, 281-288.
- [99] Pederick, J L, Thompson, A P, Bell, S G et al. D-Alanine - D-Alanine Ligase as a Model for the Activation of Atp-Grasp Enzymes by Monovalent Cations. *Journal of Biological Chemistry*. 2020, 295, 7894-7904.
- [100] Wang, T, Zhang, Y-F, Ning, L-X et al. L-Amino Acid Ligase: A Promising Alternative for the Biosynthesis of L-Dipeptides. *Enzyme and Microbial Technology*. 2020, 136, 109537.
- [101] Suzuki, M, Takahashi, Y, Noguchi, A et al. The Structure of L-Amino-Acid Ligase from *Bacillus Licheniformis*. *Acta Crystallographica Section D*. 2012, 68, 1535-1540.
- [102] Kagawa, W, Arai, T, Ishikura, S et al. Structure of Riza, an L-Amino-Acid Ligase from *Bacillus Subtilis*. *Acta Crystallographica Section F*. 2015, 71, 1125-1130.
- [103] Tsuda, T, Asami, M, Koguchi, Y et al. Single Mutation Alters the Substrate Specificity of L-Amino Acid Ligase. *Biochemistry*. 2014, 53, 2650-2660.
- [104] Zhu, Z, Qin, Z, Yuan, B et al. Enhanced Production of Leucine - Leucine Dipeptide by Whole-Cell Catalysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2025, 73, 9807-9816.
- [105] Cui, X, Du, X, Zhao, Q et al. Efficient Synthesis of Ala-Tyr by L-Amino Acid Ligase Coupled with Atp Regeneration System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2023, 195, 4336-4346.
- [106] Kino, K, Komabayashi, T, Hashida, A et al. Improving the Enzymatic Activity of L-Amino Acid A-Ligase for Imidazole Dipeptide Production by Site-Directed Mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2023, 87, 389-394.
- [107] 黄欣, 李益民, 杜聪 et al. 来源于泗阳鞘氨醇杆菌的聚磷酸激酶的克隆表达及在 atp 再生系统中的应用. *生物工程学报*. 2022, 38, 4669-4680.
- Huang X, Li Y M, Du C, et al. Expression of polyphosphate kinase from *Sphingobacterium siyangensis* and its application in ATP regeneration system. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 4638(4612): 4669-4680.
- [108] Pederick, J L, Horsfall, A J, Jovcevski, B et al. Discovery of an L -Amino Acid Ligase Implicated in *Staphylococcal* Sulfur Amino Acid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2022, 298.
- [109] Bordewick, S, Berger, R G, Ersoy, F. Co-Immobilization of Riza Variants with Acetate Kinase for the Production of

- Bioactive Arginyl Dipeptides. *Molecules*. 2022, 27, 4352.
- [110] Liu, X-H, Ning, L-X, Zhang, Y-F et al. Rational Engineering of Balal₁₆ from a Novel *Bacillus Amyloliquefaciens* Strain to Improve Catalytic Performance. *Enzyme and Microbial Technology*. 2021, 146, 109781.
- [111] Kino, H, Nakajima, S, Arai, T et al. Effective Production of Pro-Gly by Mutagenesis of L-Amino Acid Ligase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 122, 155-159.
- [112] Kino, H, Kino, K. Alteration of the Substrate Specificity of L-Amino Acid Ligase and Selective Synthesis of Met-Gly as a Salt Taste Enhancer. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015, 79, 1827-1832.
- [113] Arai, T, Noguchi, A, Takano, E et al. Application of Protein N-Terminal Amidase in Enzymatic Synthesis of Dipeptides Containing Acidic Amino Acids Specifically at the N-Terminus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013, 115, 382-387.
- [114] Tsuda, T, Suzuki, T, Kojima, S. Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of *Bacillus Subtilis* Ywfe, an L-Amino-Acid Ligase. *Acta Crystallographica Section F*. 2012, 68, 203-206.
- [115] Kino K. New L-Amino Acid Ligases Catalyzing Oligopeptide Synthesis from Various Microorganisms. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2010, 130, 1463-1469.
- [116] Kino, K, Noguchi, A, Arai, T et al. Identification and Characterization of a Novel L-Amino Acid Ligase from *Photorhabdus Luminescens* Subsp. *Laumondii* Tt01. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010, 110, 39-41.
- [117] Hayashi, M, Tabata, K, Yagasaki, M et al. Effect of Multidrug-Efflux Transporter Genes on Dipeptide Resistance and Overproduction in *Escherichia Coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 2010, 304, 12-19.
- [118] Senoo, A, Tabata, K, Yonetani, Y et al. Identification of Novel L-Amino Acid A-Ligases through Hidden Markov Model-Based Profile Analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2010, 74, 415-418.
- [119] Kino, K, Kotanaka, Y, Arai, T et al. A Novel L-Amino Acid Ligase from *Bacillus Subtilis* Nbr3134, a Microorganism Producing Peptide-Antibiotic Rhizocticin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2009, 73, 901-907.
- [120] Arai, T, Kino, K. A Novel L-Amino Acid Ligase Is Encoded by a Gene in the Phaseolotoxin Biosynthetic Gene Cluster from *Pseudomonas Syringae* Pv. *Phaseolicola* 1448a. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2008, 72, 3048-3050.
- [121] Kino, K, Noguchi, A, Nakazawa, Y et al. A Novel L-Amino Acid Ligase from *Bacillus Licheniformis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106, 313-315.
- [122] Kino, K, Nakazawa, Y, Yagasaki, M. Dipeptide Synthesis by L-Amino Acid Ligase from *Ralstonia Solanacearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008, 371, 536-540.
- [123] Kumar, D, Bhalla, T C. Microbial Proteases in Peptide Synthesis: Approaches and Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 68, 726-736.
- [124] Yokozeki, K, Hara, S. A Novel and Efficient Enzymatic Method for the Production of Peptides from Unprotected Starting Materials. *Journal of Biotechnology*. 2005, 115, 211-220.
- [125] Goettig P. Reversed Proteolysis—Proteases as Peptide Ligases. *Catalysts*. 2021, 11, 33.
- [126] Polderman-Tijmes Jolanda, J, Jekel Peter, A, De Vries Erik, J et al. Cloning, Sequence Analysis, and Expression in *Escherichia Coli* of the Gene Encoding an A-Amino Acid Ester Hydrolase from *Acetobacter Turbidans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68, 211-218.
- [127] Amoroso, C, Puc, J, Maresch, D et al. Novel and Ancestral A-Amino Acid Ester Acyltransferases with Higher Thermostability for Dipeptide Synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*. 2026, 200, 110917.
- [128] 刘鹏飞, 陆启蒙, 胡雪芹 et al. A-氨基酸酯酰基转移酶表达纯化、酶学性质及其催化应用. *生物工程学报*. 2018, 34, 1169-1177.
- Liu P F, Lu Q M, Hu X Q, et al. Expression, purification, characterization and application of α -amino acid ester acyltransferase from recombinant *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 1134(1167): 1169-1177.
- [129] Sun, H, Gao, F, Guo, Y et al. Enhancing the Expression of Novel A-Amino Acid Ester Acyltransferase Via Multiple Strategies and Its Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025, 318, 145167.
- [130] Wei, J, Liu, X, Gao, Y et al. Enhanced Synthesis of Alanine-Glutamine Dipeptide Via Molecular Modification and Process Optimization of A-Amino Acid Ester Acyltransferase. *Enzyme and Microbial Technology*. 2026, 192, 110754.
- [131] Geum, S, Lee, S, Kim, S et al. Functional Dipeptide Production by Immobilized Enzyme on *Yeast* Cell Surface. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2026, 36, 1-9.
- [132] Wang, J, Pang, C, Tu, Z et al. Double Enzymes Coupled Screening Assisted Molecular Modification of A-Amino Acid Ester Acyltransferase for L-Alanine-L-Glutamine Biosynthesis.

- Food Bioscience. 2024, 58, 103643.
- [133] Jing, Z, Xu, J, Liu, J et al. Multiplex Gene Knockout Raises Ala-Gln Production by *Escherichia Coli* Expressing Amino Acid Ester Acyltransferase. Applied Microbiology and Biotechnology. 2023, 107, 3523-3533.
- [134] Li, Y, Du, C, Jing, Z et al. Clean Production of L-Alanyl-L-Glutamine by an Efficient *Yeast* Biocatalyst Expressing A-Amino Acid Ester Acyltransferase without N-Glycosylation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2023, 71, 6398-6405.
- [135] 张营康, 程婷, 赵飞扬 et al. 基于金属有机沸石咪唑骨架的固定化细胞的制备及其在丙谷二肽制备中的应用. 生物工程学报. 2023, 39, 1131-1141.
- Zhang Y, Cheng T, Zhao F, et al. Immobilizing engineered *Escherichia coli* cells into zeolitic imidazolate framework 1138 for efficient biosynthesis of Ala-Gln [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 1139(1133): 1131-1141.
- [136] Abe, I, Tagami, U, Kashiwagi, T et al. Screening of A-Amino Acid Ester Acyl Transferase Variant with Improved Activity by Combining Rational and Random Mutagenesis. The Journal of Biochemistry. 2023, 173, 43-52.
- [137] Yokozeki, K, Abe, I. A Novel Route for Aspartame Production by Combining Enzymatic and Chemical Reactions for Industrial Use. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2021, 85, 464-466.
- [138] Pei, X, Li, Y, Du, C et al. Production of L-Alanyl-L-Glutamine by Immobilized *Escherichia Coli* Expressing Amino Acid Ester Acyltransferase. Applied Microbiology and Biotechnology. 2020, 104, 6967-6976.
- [139] Li, Y-M, Gao, J-Q, Pei, X-Z et al. Production of L-Alanyl-L-Glutamine by Immobilized *Pichia Pastoris* Gs115 Expressing A-Amino Acid Ester Acyltransferase. Microbial Cell Factories. 2019, 18, 27.
- [140] Li, Y, Yuan, W, Gao, J et al. Production of L-Alanyl-L-

Glutamine by Recycling *E. Coli* Expressing A-Amino Acid Ester Acyltransferase. Bioresource Technology. 2017, 245, 1603-1609.

- [141] Hirao, Y, Mihara, Y, Kira, I et al. Enzymatic Production of L-Alanyl-L-Glutamine by Recombinant *E. Coli* Expressing A-Amino Acid Ester Acyltransferase from *Sphingobacterium Siyangensis*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2013, 77, 618-623.



通讯作者: 李宗霖(1995—),男,特聘副研究员,硕士生导师,研究方向为生物催化磷酸基转移与能量分子工程。

E-mail: lzlinn@ecust.edu.cn



共同通讯作者: 李志敏(1970—),女,教授,博士生导师,研究方向为含硫化合物的生物合成等。

E-mail: lizm@ecust.edu.cn



第一作者: 娄龙威(1998—),男,博士后。体外多酶级联体系构建、酶工程改造与活性多肽合成研究。

E-mail: lwlou@ecust.edu.cn