

双酶级联高效催化对羟基亚苄基丙酮合成覆盆子酮

黄珊珊¹, 靳阿原¹, 宋伟^{1,2}, 吴静^{1,2*}

¹ 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡

² 江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡

黄珊珊, 靳阿原, 宋伟, 吴静. 双酶级联高效催化对羟基亚苄基丙酮合成覆盆子酮[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4119-4134.

HUANG Shanshan, JIN Ayuan, SONG Wei, WU Jing. Highly efficient dual-enzyme cascade catalysis for the synthesis of raspberry ketone from p-hydroxybenzylidene acetone[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 4119-4134.

摘要: 覆盆子酮(raspberry ketone, RK)是高价值天然芳香化合物, 广泛应用于食品、香精香料与日化领域, 传统植物提取法受原料限制、分离成本高, 化学合成法存在环境负荷大、产物难以满足天然来源市场需求等缺陷, 生物催化合成是其绿色制造的核心发展方向, 但现有体系仍受限于关键酶活性与底物耐受性不足、辅因子再生体系稳定性差、产物产量难以适配工业化需求等瓶颈。【目的】构建高效、稳定且可规模化的 RK 生物催化合成体系, 突破现有技术瓶颈。【方法】筛选获得拟南芥来源的非黄素依赖型烯还原酶 *AtQOR*, 耦合乳酸杆菌来源的甲酸脱氢酶 *LbFDH* 构建烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)自循环双酶级联体系; 通过载体拷贝数与基因表达顺序优化, 构建双酶共表达工程菌株并筛选获得最优菌株大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) 02, 系统优化全细胞催化的关键反应条件, 采用分批补料策略完成 1 L 发酵罐规模放大实验, 结合气相色谱与核磁共振波谱进行产物定量分析与结构确证。【结果】筛选获得的 *AtQOR* 催化对羟基亚苄基丙酮合成 RK 的比酶活达 10.35 U/mg; 在最优反应条件下, *Escherichia coli* 02 以 40 g/L 对羟基亚苄基丙酮为底物反应 12 h, RK 产量达 37.88 g/L, 转化率为 93.54%; 采用分批补料策略在 1 L 发酵罐中进行放大实验, 仅反应 10 h RK 产量达 54.32 g/L, 转化率为 89.43%, 产物经检测确证为高纯度目标产物。【结论】本研究构建的双酶级联催化体系大幅突破了现有 RK 生物合成的产量瓶颈, 为其工业化绿色制造提供了高效、稳定且可规模化的技术方案。

关键词: 覆盆子酮; 烯还原酶; 双酶级联催化; 辅因子再生; 全细胞催化

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(22378165); 江苏省高校创新研究团队项目(JUSRP202413001)

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (22378165) and the Jiangsu Province University Innovative Research Team Project (JUSRP202413001).

*Corresponding author. E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

Received: 2026-03-02; Accepted: 2026-03-29; Published online: 2026-04-10

Highly efficient dual-enzyme cascade catalysis for the synthesis of raspberry ketone from p-hydroxybenzylidene acetone

HUANG Shanshan¹, JIN Ayuan¹, SONG Wei^{1,2}, WU Jing^{1,2*}

1 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: Raspberry ketone (RK) is a high-value natural aromatic compound widely used in food, flavors and fragrances, and daily chemical products. Traditional plant extraction methods are constrained by raw material availability and high separation costs, while chemical synthesis suffers from high environmental burden and difficulties in meeting market demand for natural-source products. Biocatalytic synthesis represents the core direction for its green manufacturing. However, existing systems remain limited by bottlenecks such as insufficient enzyme activity and substrate tolerance, poor stability of cofactor regeneration systems, and product titers insufficient for industrial needs. **[Objective]** To construct an efficient, stable, and scalable biocatalytic synthetic system for RK, overcoming existing technical bottlenecks. **[Methods]** A flavin-independent ene-reductase from *Arabidopsis thaliana*, AtQOR, was screened and coupled with formate dehydrogenase from *Lactobacillus buchneri*, LbFDH, to construct an NADPH self-recycling dual-enzyme cascade system. By optimizing vector copy number and gene expression order, an engineered strain co-expressing both enzymes was constructed, and the optimal strain, *Escherichia coli* 02, was selected. Key reaction conditions for whole-cell biocatalysis were systematically optimized, and a scale-up experiment was performed in a 1 L fermenter using a fed-batch strategy. The product was quantitatively analyzed and structurally verified using gas chromatography (GC) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **[Results]** The selected AtQOR exhibited a specific activity of 10.35 U/mg in catalyzing the conversion of p-hydroxybenzylidene acetone to RK. Under optimal reaction conditions, *E. coli* 02 produced 37.88 g/L of raspberry ketone from 40 g/L p-hydroxybenzylidene acetone in 12 h, with a conversion rate of 93.54%. Using a fed-batch strategy in a 1 L fermenter, the RK titer reached 54.32 g/L in only 10 h, with a conversion rate of 89.43%, and the product was confirmed to be a high-purity target compound. **[Conclusion]** The dual-enzyme cascade catalytic system constructed in this study substantially overcomes the existing titer bottleneck in RK biosynthesis, providing an efficient, stable, and scalable technological solution for its industrial green manufacturing.

Keywords: raspberry ketone; ene-reductase; dual-enzyme cascade catalysis; cofactor regeneration; whole-cell biocatalysis

覆盆子酮(raspberry ketone, RK)是覆盆子果实特征香气的关键成分, 广泛应用于食品、香精香料与日化产品, 且因 RK 在健康产品

开发中的潜在价值而受到持续关注^[1-2]。RK 是一种高价值芳香化合物, 天然 RK 价格可达 3 000–20 000 USD/kg。然而 RK 在天然果实中

的含量极低(约 1–5 mg/kg), 导致传统植物提取法面临原料供应受限、分离纯化难度大、生产成本高等问题^[3-5]。与此同时, 化学合成虽可提高产量(如由对羟基苯甲醛与丙酮缩合制备), 但依赖苛刻的反应条件与金属催化剂^[6], 易引发环境问题, 且化学合成的产物通常难以满足消费者对“天然来源”香料的需求, 因此在高端市场中的应用受到限制^[4]。基于此, 生物催化路线被视为更具可持续性的替代方案^[7], 但实现具有工业应用价值的高产量、高转化率与可放大性仍是当前该领域面临的主要挑战^[8]。

围绕 RK 的生物制造, 近年来研究主要沿 2 条路径推进: 一类是以葡萄糖/对羟基肉桂酸等为起点的代谢工程路线, 另一类是以对羟基亚苄基丙酮(4-hydroxybenzylideneacetone, HBA)为底物的短路径生物催化路线^[9]。在发酵路线方面, Zhou 等^[9]以大肠杆菌为宿主, 采用静态联合调控策略: 敲除竞争性代谢通路、过表达抗反馈抑制基因以强化葡萄糖到 L-酪氨酸的转化, 利用对香豆酸响应型传感器平衡丙二酰辅酶 A 代谢, 同时优化培养基与发酵条件, 最终获得 415.56 mg/L RK。Li 等^[10]以解脂耶氏酵母为底盘, 将多拷贝 RK 合成通路整合至 26S rDNA 位点; 重构莽草酸途径与戊糖磷酸途径, 强化前体物质供给; 引入非羧化型丙二酰辅酶 A 途径并优化脂质代谢, 经 5 L 补料分批发酵, 创下 7.24 g/L 的 RK 从头合成最高产量。总体而言, 上述发酵路线需经过较长的代谢链条, 易受代谢通量分配、细胞代谢负担、菌体生长抑制等问题影响, 导致 RK 产量提升仍多停留在较低量级。相比之下, 以 HBA 为底物经短路径生物催化转化生成 RK 的策略, 在工艺简便性、反应可控性与转化效率方面优势显著, 更具工业化应用前景。例如, Yang 等^[11]构建双酶表达体系, 共表达悬钩子来源的覆盆子酮合酶 1 (raspberry ketone synthase 1, *RiRZS1*), 以

及嗜酸热原体来源的葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase, *SyGDH*), 实现烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)再生; 最终转化效率达 97.6%, RK 产量达 9.89 g/L。该基于 GDH 的辅因子再生系统需投入大量葡萄糖, 还会生成葡萄糖酸副产物, 引发体系 pH 波动, 同时增加产物提取分离的过程负担^[11]。为解决该问题, 研究者利用大肠杆菌内源三羧酸循环驱动反应, 结合大肠杆菌异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, *EcIDH*)与 *RiRZS1* 的协同作用, 构建 NADPH 自循环体系, 以 HBA 为底物实现 86.96% 的转化效率, RK 产量达 8.21 g/L^[12]。尽管如此, 面向更高底物浓度与更高生产强度的放大应用, 该类体系仍普遍受限于: 末端还原步骤对 NADPH 供给的刚性依赖、关键还原酶资源相对稀缺, 以及天然酶在高底物条件下的活性与耐受性不足等问题^[13]。因此, 若要进一步将“HBA→RK”的短路径优势转化为工业级产量与高转化率, 关键在于筛选获得更适配高底物负载体系的末端还原酶, 并将其与高效辅因子再生体系进行协同优化。

基于上述现有 RK 生物合成体系存在产量受限、难以规模化应用的瓶颈问题, 本研究构建 AtQOR 与甲酸脱氢酶耦合的双酶级联催化体系, 旨在开发一套绿色、高效且具备放大潜力的 RK 生物合成工艺, 为其工业化生产提供新的技术思路。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

表达质粒 pET-28a、pACYCDuet-1、pCDFDuet-1、pRSFDuet-1 和 pETDuet-1, Novagen 公司; 宿主菌株 *E. coli* BL21(DE3), Invitrogen 公司。本研究使用的重组质粒见表 1、菌株见表 2。

表1 本研究所用质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Description
pET-28a	Single T7 promoters, pBR322 ori, Kan ^R
pRSFDuet-1	Double T7 promoters, RSF ori, Kan ^R
pETDuet-1	Double T7 promoters, pBR322 ori, Amp ^R
pCDFDuet-1	Double T7 promoters, CDF13 ori, Str ^R
pACYCDuet-1	Double T7 promoters, p15A ori, Cm ^R

1.2 主要试剂和仪器

覆盆子酮(RK)、甲酸钠, 上海源叶生物科技有限公司; 对羟基亚苄基丙酮(HBA), 上海乐研试剂有限公司; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸四钠盐、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠盐, 上海麦克林生化科技有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄霉素(Amp)、链霉素(Str)、氯霉素(Cm)、硫酸卡那霉素(Kan), 生工生物工程(上海)股份有限公司; PrimeSTAR Max DNA 聚合酶, TaKaRa Bio (大连)有限公司; 同源重组酶, 武汉爱博泰克生物科技有限公司; 其他试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

PCR 扩增仪、核酸电泳仪、凝胶成像仪、高速离心机, 艾本德股份公司; 高压细胞破碎仪, 上海永联生物科技有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; 单四级杆气相

色谱质谱联用仪、核酸蛋白微量定量仪, 赛默飞世尔科技公司; 气相色谱仪和紫外-可见分光光度计, 岛津(上海)实验器材有限公司; 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; 1 L 发酵罐, 迪必尔生物工程(上海)有限公司。

1.3 活性测定

烯还原酶的比酶活通过测定浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的纯化酶催化反应生成 RK 的产量来确定。反应体系总体积为 1 mL, pH 7.5, 反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 体系包含 10 mmol/L HBA、1 mmol/L 还原型 NADPH 四钠盐、体积分数为 2% 的 DMSO 以及 1 $\mu\text{mol/L}$ 纯化烯还原酶, 孵育时间为 3 min。反应体系中 RK 的产量采用气相色谱(GC)进行定量分析。所有实验均设置 3 次生物学平行以保证结果可靠性。烯还原酶的还原活性定义为: 在上述测定条件下, 每分钟催化生成 1 μmol RK 所需酶量定义为 1 个活性单位(U)。

1.4 蛋白的表达与纯化

所有目标重组蛋白的制备均采用统一操作流程。首先将菌株接种至添加对应抗性的 LB 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培养。待培养液 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导。菌体于 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导表达 18 h 后, 8 500 $\times g$ 离心 10 min 收集菌体

表2 本研究所用菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Description
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB (rB⁻ mB⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>
pET28a-ER	pET28a carrying ene-reductase (ER) from 8 different sources
pET28a-FDH	pET28a carrying formate dehydrogenase (FDH) from 3 different sources
<i>E. coli</i> 01	pCDFDuet-1 carrying <i>AtQOR</i> and <i>LbFDH</i>
<i>E. coli</i> 02	pRSFDuet-1 carrying <i>AtQOR</i> and <i>LbFDH</i>
<i>E. coli</i> 03	pETDuet-1 carrying <i>AtQOR</i> and <i>LbFDH</i>
<i>E. coli</i> 04	pACYCDuet-1 carrying <i>AtQOR</i> and <i>LbFDH</i>
<i>E. coli</i> 05	pCDFDuet-1 carrying <i>LbFDH</i> and <i>AtQOR</i>
<i>E. coli</i> 06	pRSFDuet-1 carrying <i>LbFDH</i> and <i>AtQOR</i>
<i>E. coli</i> 07	pETDuet-1 carrying <i>LbFDH</i> and <i>AtQOR</i>
<i>E. coli</i> 08	pACYCDuet-1 carrying <i>LbFDH</i> and <i>AtQOR</i>

沉淀, 随后将菌体重悬于缓冲液 A (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 20 mmol/L 咪唑; 500 mmol/L NaCl) 中, 采用高压匀浆破碎机进行细胞破碎。所得粗裂解液于 4 °C、8 000×g 离心 0.5 h, 收集上清液并与 Ni-NTA Superflow 树脂孵育 30 min, 捕获带有 His 标签的目标蛋白。随后使用缓冲液 B (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 500 mmol/L NaCl; 500 mmol/L 咪唑) 洗脱结合在树脂上的目标蛋白。蛋白脱盐操作流程如下: 将待脱盐的蛋白样品转移至 10 kDa 超滤管中, 于 3 700 r/min 离心 30 min; 随后向超滤管中加入缓冲液 C (25 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.5) 进行缓冲液置换, 再次于 3 700 r/min 离心 30 min, 该置换操作重复 3 次, 完成蛋白脱盐。

1.5 共表达菌株 *E. coli* 01-08 的构建

采用表 3 所列引物开展两轮 PCR 扩增。第一轮 PCR 中分别使用引物 *AtQOR-EcoR* I-F/*AtQOR-Hind* III-R 和 *LbFDH-EcoR* I-F/*LbFDH-Hind* III-R 扩增 *AtQOR* 和 *LbFDH* 基因。第二轮 PCR 则分别使用引物 *AtQOR-Nde* I-F/*AtQOR-Xho* I-R 和 *LbFDH-Nde* I-F/*LbFDH-Xho* I-R 进行扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后, 使用胶回收试剂盒回收目标基因片段。将第一轮 PCR 回收的 *AtQOR* 和 *LbFDH* 片段分别通过同源重组酶克隆至 pCDFDuet-1、pRSFDuet-1、

pETDuet-1 和 pACYCDuet-1 载体的 *EcoR* I/*Hind* III 酶切位点。连接产物转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞后, 涂布于添加对应抗性的 LB 固体培养基上, 通过菌落 PCR 和 Sanger 测序(擎科生物技术有限公司)验证阳性克隆, 得到单基因重组菌株。将第二轮 PCR 回收的 *AtQOR* 和 *LbFDH* 片段通过同源重组酶分别插入上述构建的单基因载体的 *Nde* I/*Xho* I 酶切位点。连接产物转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞后, 在添加对应抗性的 LB 培养基上筛选转化子, 经菌落 PCR 和测序验证阳性克隆, 最终获得 8 株双基因重组菌株。

1.6 GC 和 GC-MS 分析

采用岛津 GC-2030 气相色谱仪对 RK 浓度进行定量分析, 仪器配备 DB-5 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 以高纯氮气(N₂)作为载气。仪器操作参数设置如下: 进样口温度 250 °C; 火焰离子化检测器温度 270 °C。柱温箱升温程序设置为: 初始温度 100 °C, 以 25 °C/min 的速率升温至 160 °C, 再以 15 °C/min 的速率升温至 250 °C。分流比设置为 10:1。

气相色谱-质谱联用分析采用 Thermo Scientific TSQ8000 系统完成, 仪器配备 Thermo TG-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 以高纯氮气作为载气。载气流速设置为 0.6 mL/min, 进样口温度维持在 250 °C。柱温箱升温程序优

表3 引物序列

Table 3 Primer sequences

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>AtQOR-EcoR</i> I-F	CAGCCAGGATCCGAATTCCATGACTGCTACAAATAAACAAGTAATACTAAAGGACTAC
<i>AtQOR-Hind</i> III-R	ATTATGCGGCCGCAAGCTTTTATTCGCGCGCAACAACG
<i>LbFDH-EcoR</i> I-F	ACAGCCAGGATCCGAATTCCATGACAAAAGTTCTAGCTGTATTATATCCCGATC
<i>LbFDH-Hind</i> III-R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTTTATTTTTCAGCCTCGCCAGAACC
<i>AtQOR-Nde</i> I-F	GTATAAGAAGGAGATATACATATGACTGCTACAAATAAACAAGTAATACTAAAGGACTACG
<i>AtQOR-Xho</i> I-R	TTTCTTTACCAGACTCGAGTTATTCGCGCGCAACAACGAC
<i>LbFDH-Nde</i> I-F	GTATAAGAAGGAGATATACATATGACAAAAGTTCTAGCTGTATTATATCCCGATCC
<i>LbFDH-Xho</i> I-R	TTTCTTTACCAGACTCGAGTTATTTTTCAGCCTCGCCAGAACCC

化为：初始温度 50 °C 保持 1 min，以 8 °C/min 的速率升温至 180 °C，再以 15 °C/min 的速率升温至 280 °C 并保持 5 min，总运行时长约为 40 min。质谱检测采用电子电离 (electron ionization, EI) 全扫描模式，质量扫描范围设置为 35.000–350.000 m/z 。样品的定性鉴定通过将采集的质谱图与 NIST 标准质谱库进行比对完成，目标化合物覆盆子酮的 CAS 号为 5471-51-2。

1.7 覆盆子酮的分离、纯化与鉴定

将底物完全转化的 RK 反应液于 4 °C、12 000×g 离心 10 min 去除菌体。收集上清液，加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次。合并所有有机相，使用饱和 NaCl 溶液洗涤 1 次，经分液漏斗分离后，加入无水 Na₂SO₄ 干燥过夜。在 40 °C 下减压旋转蒸发除去有机溶剂，得到 RK 粗浓缩物。向浓缩物中加入 1/10 体积的蒸馏水，室温下搅拌 4 h，随后于 4 °C 静置结晶过夜。使用 0.45 μm 微孔滤膜减压抽滤收集结晶产物，用预冷的去离子水洗涤晶体，随后置于 40 °C 真空干燥箱中干燥 12 h 至恒重，获得纯化的 RK 晶体。将所得晶体溶解于氘代 DMSO 中，配制为 50 mg/mL 的样品溶液，通过核磁共振波谱 (NMR) 完成进一步结构鉴定。

2 结果与分析

2.1 双酶级联路径的设计、构建与验证

本研究设计了一条双酶级联合成 RK 的催化路线 (图 1)。该路径以对羟基亚苄基丙酮 (HBA) 为底物，经烯还原酶催化 C=C 双键加氢生成 RK；反应所需还原力由 NADPH 提供，NADPH 通过来源于巨大普里斯特氏菌的葡萄糖脱氢酶 (*BmGDH*) 催化实现原位循环再生，以此维持体系持续的还原能力^[14]。

从本实验室 Gao 等^[15]构建的烯还原酶 (ER) 文库中选取 8 个非黄素依赖型候选酶 (表 4)，经镍离子亲和层析纯化后获得电泳纯的目标蛋白 (图 2A)。以 HBA 为模式底物，系统评估各候选酶催化 α,β -不饱和酮 C=C 双键还原生成 RK 的催化活性。比酶活测定结果显示，在完全一致的反应条件下仅 3 种候选酶可检测到目标产物 RK 生成。其中 *AtQOR* 的比酶活最高，达 10.35 U/mg，分别为同体系下 *EcCurA* (3.77 U/mg) 的 2.75 倍、*NsQOR* (0.53 U/mg) 的 19.5 倍；其余 5 种候选酶均未检出 RK 产物，无明显催化活性。上述结果直接证实，*AtQOR* 在该反应体系中展现出远优于其余候选酶的催化效率，可高效催化目标 α,β -不饱和酮的 C=C 双键不对称还

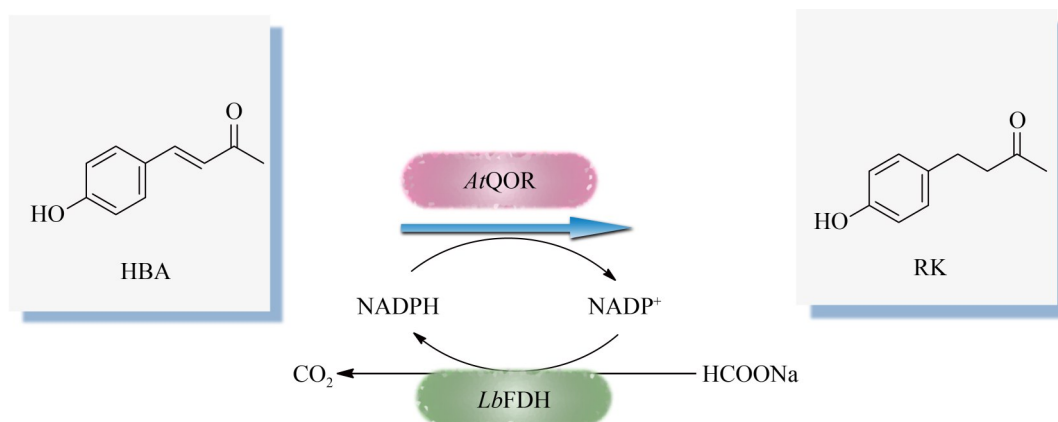


图1 双酶级联催化HBA合成RK路径

Figure 1 Two-enzyme cascade pathway for RK synthesis from HBA.

表4 候选烯还原酶

Table 4 Candidate ene-reductases

No.	Enzymes	Sources	ID	Specific activity/(U/mg protein)
1	<i>AtQOR</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_197199.1	10.35±1.42
2	<i>NsQOR</i>	<i>Nicotine sylvestris</i>	XP_009782873.1	0.53±0.11
3	<i>EcCurA</i>	<i>Escherichia coli</i>	WP_112929233.1	3.77±0.45
4	<i>NtDBR</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	NP_001313179.1	N.D.
5	<i>SaPGR2</i>	<i>Sparus aurata</i>	XP_030299691.1	N.D.
6	<i>MpPulR</i>	<i>Mentha piperita</i>	Q6WAU0.1	N.D.
7	<i>GsQOR</i>	<i>Geomonas silvestris</i>	WP_183355402.1	N.D.
8	<i>EcQOR</i>	<i>Escherichia coli P12b</i>	AFG42968.1	N.D.

N.D. indicates no detectable raspberry ketone (RK).

原反应, 因此选定 *AtQOR* 为该级联路径的核心催化酶。

为了系统评估 *AtQOR* 在全细胞体系中的催化能力, 在 20–40 g/L 范围内设置 5 个底物浓度梯度开展转化实验, 采用气相色谱(GC)对 RK 产量进行定量分析。如图 2B 所示, 当底物浓度 ≤30 g/L 时, RK 产量随着底物浓度升高而增加; 底物浓度达 30 g/L 时, RK 产量达到最高值 22.11 g/L; 当底物浓度 >30 g/L 时, RK 产量随底物浓度升高呈下降趋势。对反应产物进行 GC-MS 分析, 检测到的分子量为 164.05, 与目标产物 RK 完全一致(图 2C)。

2.2 双酶表达菌株的构建与验证

初始体系采用 *BmGDH* 实现 NADPH 再生, 但反应过程中伴随生成的葡萄糖酸不断累积, 导致体系 pH 由中性逐渐下降至强酸性, 进而引发部分酶失活, 同时大幅提升了反应过程中 pH 精准调控的操作难度。为解决上述问题, 本研究进一步筛选了 3 种以甲酸钠为底物的 NADPH 再生酶: *BstFDH*^[16]、*LbFDH*^[17]、*MycFDH*^[18]。该类酶的催化副产物为 CO₂, 可直接从反应体系中逸出, 对体系 pH 的扰动极小。在 30 g/L HBA 底物浓度下开展全细胞转化对比实验, 结果显示 *LbFDH* 与 *AtQOR* 的组合可在 12 h 内将底物完全转化为 RK, 产量达 30.00 g/L, 底物转化率达 98.78%; 相比之下, *BstFDH* 和 *MycFDH*

对应的体系转化率均低于 50% (表 5)。据此确定 *LbFDH* 为最优辅因子再生酶, 用于替代 *BmGDH* 构建新型双酶级联系统。

随后将 *AtQOR* 与 *LbFDH* 分别克隆至 4 种 Duet 系列表达载体 pRSFDuet-1、pETDuet-1、pCDFDuet-1、pACYCDuet-1 中, 上述载体对应的复制子拷贝数分别约为 100、40、20、10。同时通过调整 2 个目的基因在载体上的排列顺序, 共构建获得 8 种双酶共表达重组质粒(图 3A)。将上述质粒分别转化至 *E. coli* BL21(DE3)中, 成功构建得到 8 株工程菌 *Escherichia coli* 01–08。SDS-PAGE 分析结果显示(图 3B), 菌株 *E. coli* 01 和 *E. coli* 02 中 *AtQOR* 与 *LbFDH* 均实现了高水平的可溶性表达。在 30 g/L HBA 底物浓度下对 8 株工程菌开展全细胞转化性能测试(图 3C), 结果显示 *E. coli* 02 的 RK 产量最高, 可达 28 g/L, 显著优于其余 7 株工程菌。进一步对比实验表明, 与 *AtQOR*+*BmGDH* 体系相比, *AtQOR* 与 *LbFDH* 体系具有更高的底物耐受性, 在 40 g/L HBA 浓度下可获得最高 RK 产量, 达 32.87 g/L (图 4)。

2.3 共表达菌株 *Escherichia coli* 02 的两相体系设计与转化条件优化

底物 HBA 与产物 RK 在水相中微溶, 显著限制了催化体系的底物负载能力与酶促反应效率, 为此本研究构建了水-有机两相反应体系以

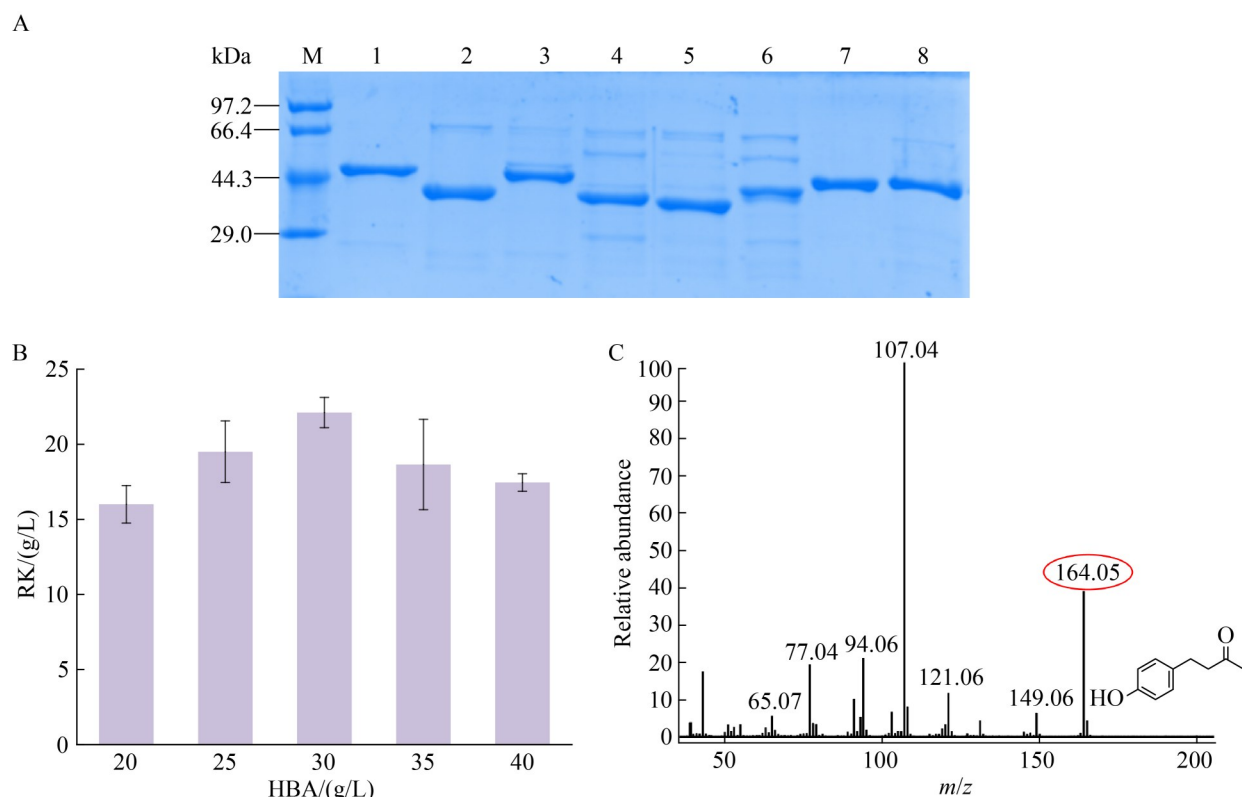


图2 RK合成路径的构建与验证

Figure 2 Construction and validation of the RK biosynthetic pathway. A: SDS-PAGE analysis of purified ene-reductases (Lane M: Marker; Lane 1: *EcCurA*; Lane 2: *EcQOR*; Lane 3: *GsQOR*; Lane 4: *MpPulR*; Lane 5: *AtQOR*; Lane 6: *NsQOR*; Lane 7: *NtDBR*; Lane 8: *SaPGR2*); B: Cascade catalysis of *AtQOR* and *BmGDH* for the synthesis of RK (The cascade catalysis was performed using 20 g/L *AtQOR*-expressing wet cells and 20 g/L *BmGDH*-expressing wet cells at different substrate concentrations); C: GC-MS analysis of the whole-cell reaction mixture.

表5 候选甲酸脱氢酶

Table 5 Candidate formate dehydrogenases

No.	Enzymes	Sources	RK/ (g/L)	Conversion/%
1	<i>LbFDH</i>	<i>Lentilactobacillus</i>	30.00	98.78
2	<i>BstFDH</i>	<i>Burkholderia stabilis</i>	13.27	43.69
3	<i>MycFDH</i>	<i>Mycolicibacterium vaccae</i>	2.18	7.18

提升底物溶解度，进而提高酶对底物的负载容量。初始两相反应体系的组成与转化条件设定如下：水相为 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)，含底物 3 倍摩尔量的甲酸钠；有机相为

DMSO；水相与有机相体积比为 9:1；反应温度 37 °C；NADP⁺浓度为 0.5 mmol/L。两相体系组成与反应条件是调控全细胞催化制备 RK 效率的核心关键因素。为构建高效合成 RK 的全细胞生物催化平台，本研究以重组菌 *E. coli* 02 为催化剂，系统考察并优化了有机相溶剂种类、反应温度、反应体系 pH、有机相体积分数、底物 HBA 与辅底物甲酸钠的物质的量比、NADP⁺浓度、缓冲体系种类及浓度等关键工艺参数。上述所有优化实验均以 RK 的产量为核心评价指标，测定不同条件下的相对催化活性以每组优化中 RK 产量最高的实验组催化活性定义为

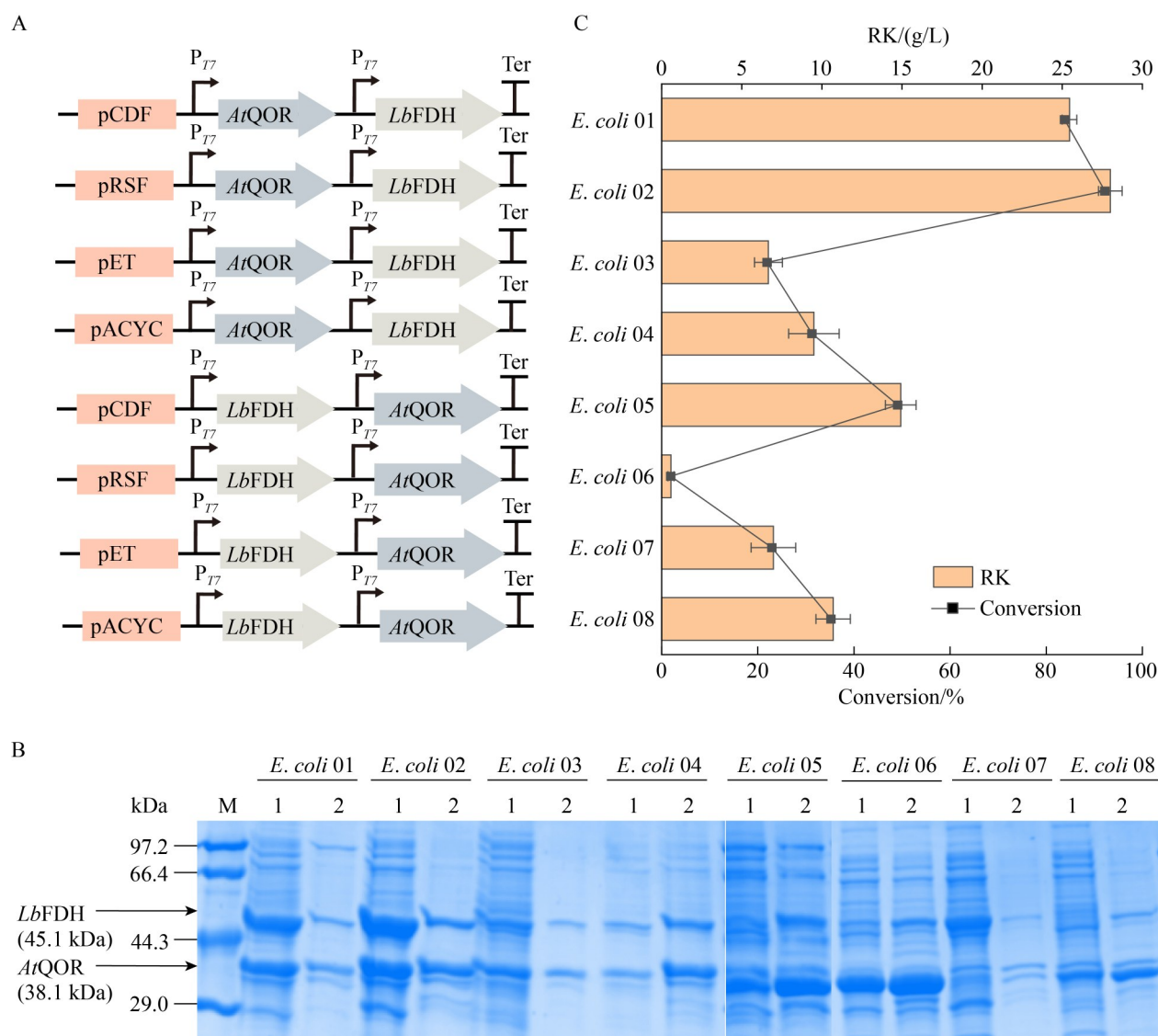


图3 八个双酶表达菌株的构建与验证

Figure 3 Construction and verification of eight dual-enzyme expression strains. A: Schematic representation of the eight engineered dual-enzyme expression plasmids constructed in this study; B: SDS-PAGE analysis of *E. coli* 01–08 (Lane M: Marker; Lane 1: Soluble fraction; Lane 2: Insoluble fraction); C: Whole-cell biotransformation performance of the *Escherichia coli* 01–08 strains at 30 g/L HBA.

100%，其余组按比例换算相对催化活性。

2.3.1 有机相溶剂种类优化

各种有机溶剂对 HBA 表现出不同的溶解度，对 AtQOR 也具有不同程度的抑制。因此需要对有机溶剂的种类进行优化，在反应体系中加入体积分数 10% 的有机溶剂，考察了异辛

烷(isooctane, IO)、异丙醚(isopropyl ether, IPE)、乙酸乙酯(ethyl acetate, EA)、乙酸丁酯(butyl acetate, BA)、氯仿(chloroform, CF)、甲基叔丁基醚(methyl tert-butyl ether, MTBE)、甲醇(methanol, MeOH)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、甲苯(toluene, Tol)和环己烷

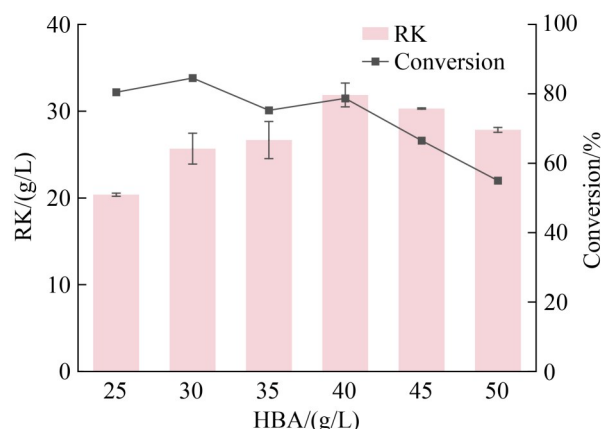


图4 *Escherichia coli* 02菌株催化HBA合成RK

Figure 4 Catalysis of RK synthesis from HBA by *Escherichia coli* 02 strain. Measurements were conducted using 20 g/L wet cells of the strain at varying substrate concentrations.

(cyclohexane, CH)等 10 种有机溶剂对 RK 产量的影响。如图 5 所示, 在纯水相中菌体相对活性较低, 仅有 63%。有机溶剂中异丙醚、乙酸丁酯、甲基叔丁基醚的活性较高, 相比纯水相提升显著, 这可能与 HBA 具有中等极性, 而这 3 种溶剂的极性与其较为匹配(异丙醚弱极性、乙酸丁酯中等极性、甲基叔丁基醚中等极性), 能在一定程度上溶解底物, 又不破坏酶活性环境, 利于底物与酶接触。10 种有机溶剂中乙酸丁酯效果最好, 选择乙酸丁酯为两相体系的最适有机相。

2.3.2 反应温度与 pH 的优化

在含 0.5 mmol/L NADP⁺ 的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中考察了 27–47 °C 温度范围对全细胞催化活性的影响。结果表明(图 6A), 重组菌的相对催化活性随温度升高呈先升后降趋势, 32 °C 时活性达到峰值(100%); 当温度超过 37 °C 后催化活性逐渐下降, 47 °C 时仅保留约 60% 的相对活性, 这可能是由于高温破坏了胞内催化酶的空间构象, 导致酶活丧失。基于此, 确定 32 °C 为后续优化实验的反应温度。

在 32 °C、0.5 mmol/L NADP⁺ 条件下进一步

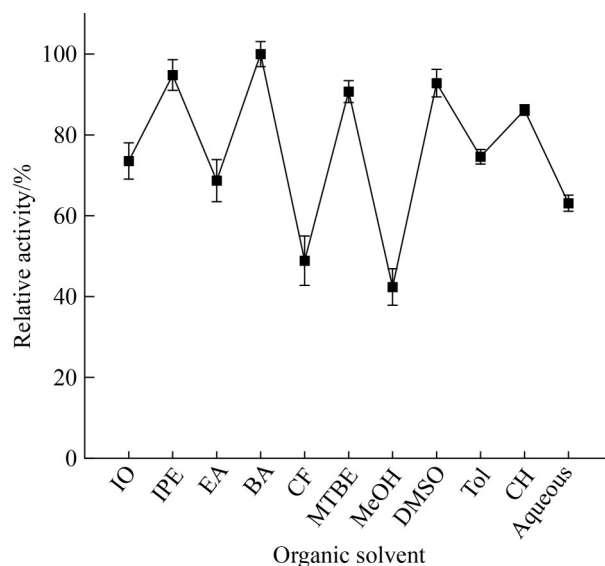


图5 共表达菌株*Escherichia coli* 02的有机溶剂种类优化

Figure 5 Optimization of organic solvent type for the co-expressing strain *Escherichia coli* 02. The optimization was performed in a pure aqueous phase and 10 organic solvents with a volume fraction of 10%.

考察 pH 5.5–8.5 范围对催化反应的影响。结果显示(图 6B), pH 5.5 时菌体相对催化活性较低(约 50%), 随着 pH 升高活性快速提升, 在 6.5–7.5 区间保持最高水平(接近 100%); 当 pH 超过 8.0 后催化活性持续下降, 推测偏碱性环境会改变胞内酶的带电性质, 降低酶与底物的结合能力。综合催化活性与反应体系稳定性, 选择 pH 7.0 为最适反应 pH。

2.3.3 乙酸丁酯体积分数的优化

在 32 °C、pH 7.0、0.5 mmol/L NADP⁺ 的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中评估 10%–80% 体积分数的乙酸丁酯对全细胞催化的影响。结果表明(图 6C), 当乙酸丁酯体积分数为 0–30% 时菌体相对催化活性维持在 90% 以上, 且 30% 时达到活性峰值; 当体积分数超过 40% 后, 催化活性急剧下降, 80% 时仅检测到约 10% 的相对活性。这是由于高浓度有机溶剂会破坏菌体细

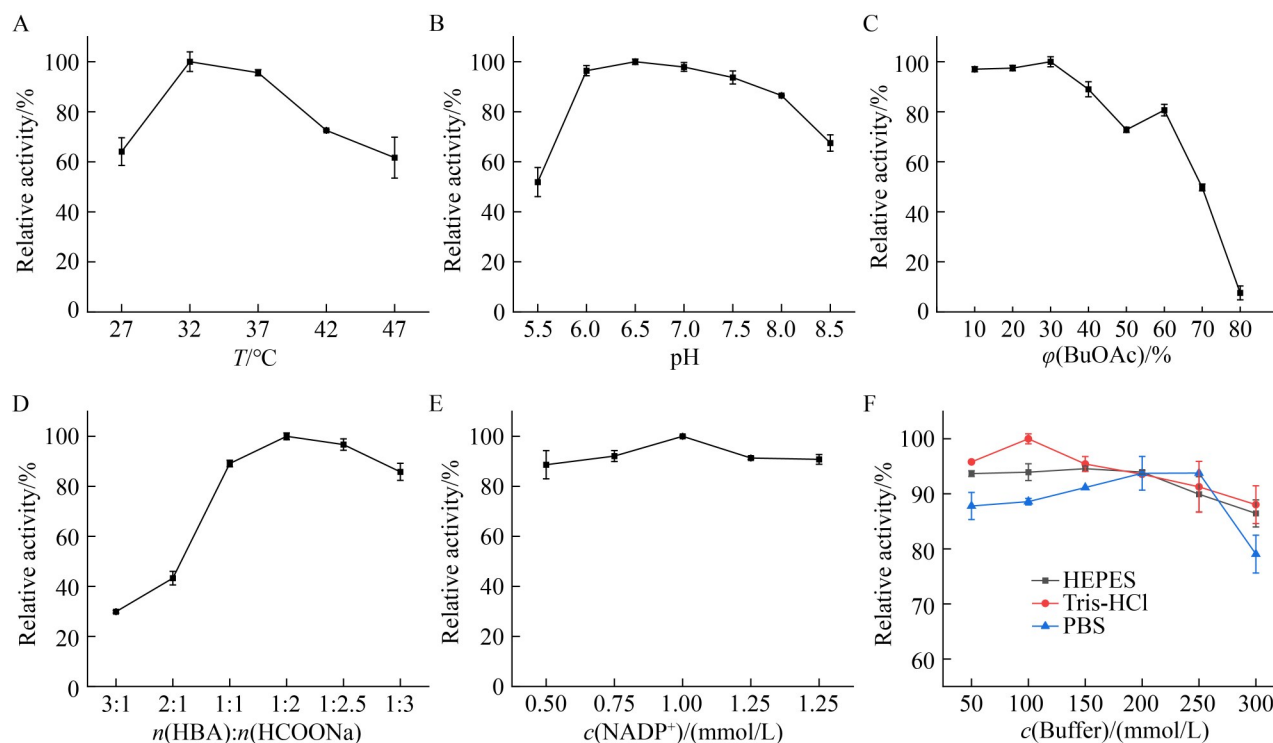


图6 共表达菌株*Escherichia coli* 02的转化条件优化

Figure 6 Optimization of reaction conditions for the co-expressing strain *Escherichia coli* 02. A: Effect of temperature in 100 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.5) with 0.5 mmol/L NADP^+ ; B: Effect of pH at 32 $^{\circ}\text{C}$ with 0.5 mmol/L NADP^+ ; C: Effect of n -butyl acetate content at 32 $^{\circ}\text{C}$ in 100 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.0) with 0.5 mmol/L NADP^+ ; D: Effect of the substrate-to-sodium formate molar ratio at 32 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, with 30% n -butyl acetate and 0.5 mmol/L NADP^+ ; E: Effect of NADP^+ concentration at 32 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, with 30% n -butyl acetate and an HBA:sodium formate molar ratio of 1:2; F: Effect of buffer type and concentration under the same conditions with 1 mmol/L NADP^+ . Data are mean $\pm$ SD from three independent experiments.

胞膜的磷脂双分子层结构, 增加细胞膜通透性甚至导致细胞裂解, 进而丧失催化能力。因此, 确定 30% 乙酸丁酯为最适体积分数。

2.3.4 HBA 与甲酸钠的物质的量比的优化

在 32 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0、30% 乙酸丁酯、0.5 mmol/L NADP^+ 的最优基础条件下优化底物 HBA 与辅底物甲酸钠的物质的量比(3:1–1:3)。结果显示(图 6D), 菌体相对催化活性随甲酸钠比例的增加显著升高, 当 $n(\text{HBA}):n(\text{甲酸钠})$ 为 1:2 时催化活性达到最大值(100%); 将物质的量比进一步调整为 1:3 时, 催化活性略有下降, 原

因可能是共底物过量会增加反应体系的渗透压, 改变菌体的生理代谢状态, 同时造成底物浪费。据此, 确定 1:2 为 HBA 与甲酸钠的最适物质的量比。

2.3.5 NADP^+ 浓度的优化

在 32 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0、30% 乙酸丁酯、 $n(\text{HBA}):n(\text{甲酸钠})=1:2$ 的条件下考察 0.5–1.5 mmol/L NADP^+ 浓度对催化反应的影响。结果表明(图 6E), NADP^+ 浓度从 0.5 mmol/L 升高至 1.0 mmol/L 时, 菌体相对催化活性持续上升并在 1.0 mmol/L 时达到峰值; 1.0–1.5 mmol/L 浓度范围内, 催化

活性保持稳定($\geq 90\%$), 无显著变化。综合考虑胞内辅酶的催化效率与实验经济成本, 后续实验选择 1 mmol/L NADP⁺作为最适浓度。

2.3.6 缓冲体系及浓度的优化

在 32 °C、pH 7.0、30% 乙酸丁酯、*n* (HBA):*n* (甲酸钠)=1:2、1 mmol/L NADP⁺的最优条件下考察 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES]、Tris-HCl、PBS 3 种常用缓冲液在 50–300 mmol/L 浓度范围内对全细胞催化的影响。结果显示(图 6F), 当缓冲液浓度 ≤ 150 mmol/L 时 Tris-HCl 缓冲液支持的菌体相对催化活性显著高于 HEPES 和 PBS 缓冲液, 并且浓度为 100 mmol/L 时 Tris-HCl 缓冲液的相对活性达到峰值; 随着缓冲液浓度升高至 300 mmol/L, 3 种缓冲液的催化活性均显著下降, 其中 PBS 缓冲液降幅最为明显(相对活性降至 78%), 这是由于高浓度缓冲液会改变反应体系的离子强度, 破坏胞内催化酶的空间构象, 同时降低细胞膜对底物与产物的通透性。综合分析, 确定 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液为最适反应缓冲体系。

综上所述, 重组菌 *E. coli* 02 全细胞催化合成 RK 的最优反应条件为: 32 °C、pH 7.0、乙酸丁酯体积分数为 30%、HBA 与甲酸钠的物质的量比为 1:2、1 mmol/L NADP⁺、100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。在该条件下, 采用 20 g/L 湿细胞对 40 g/L HBA 进行全细胞催化反应, 反应 12 h, RK 产量达到 37.88 g/L, 转化率为 93.54%。

2.4 覆盆子酮的 1 L 规模化生物合成

为了进一步评估工程菌株 *E. coli* 02 的催化稳定性, 在 1 L 发酵罐内(总反应体积 400 mL)采用底物分批补料策略开展规模放大实验。该实验以 20 g/L 湿细胞为催化剂, 在前期优化获得的最优反应条件下进行; 反应过程中采用 3 mol/L HCl 进行 pH 动态调控, 分批补料采用两阶段补加模式(40+20 g/L HBA)。该补料模式已在小体

系中完成验证, 此前在 20 mL 体系内开展了 3 种不同投料方式的分批补料对比实验(表 6), 3 种补料方式的 RK 产量接近, 均超过 45 g/L, 最终选取其中反应周期最短的 40+20 g/L 补料方式开展本次分批放大反应。放大反应过程中定期取样监测底物消耗与产物生成动态(图 7), 结果表明该双酶共表达体系在放大条件下仍可维持良好的催化稳定性和连续转化能力, 仅需 10 h 即可获得最高 RK 产量 54.32 g/L, 底物转化率达 89.43%。

为验证放大反应合成 RK 的产物品质与结构准确性, 本研究对 1 L 发酵罐中获得的目标产物开展系统的定量分析与结构表征。采用 GC 完成 RK 的定量检测, 结合 NMR 完成产物结构确认。首先通过 GC 建立 RK 的标准线性校准曲线(图 8A), 实现 RK 的精准定量测定, 反应样品的特征峰保留时间与 RK 标准品完全重合(图 8B)。随后对纯化后的产物进行 NMR 波谱解析, 产物的 ¹H NMR (图 9A)与 ¹³C NMR (图 9B)特征化学位移信号均与 RK 的理论分子结构高度匹配, 且无明显杂峰检出, 表明产物具有高化学纯度与完整分子结构。综上所述, GC 与 NMR 的综合表征结果证实, 1 L 规模放大生物催化体系中合成的产物为高纯度 RK, 该结果为该生物催化平台后续的工业化放大与实际应用提供了可靠的分析数据与结构验证依据。

3 讨论与结论

本研究成功构建了烯还原酶 *AtQOR* 与辅因子再生酶 *LbFDH* 的双酶级联催化体系, 实现了对羟基亚苄基丙酮向 RK 的高效转化。通过从

表6 三种不同的分批补料方式

Table 6 Three different fed-batch feeding schemes

Schemes	Titer/(g/L)	t/h
20+20+20	46.65	25
30+30	46.60	22
40+20	46.55	20

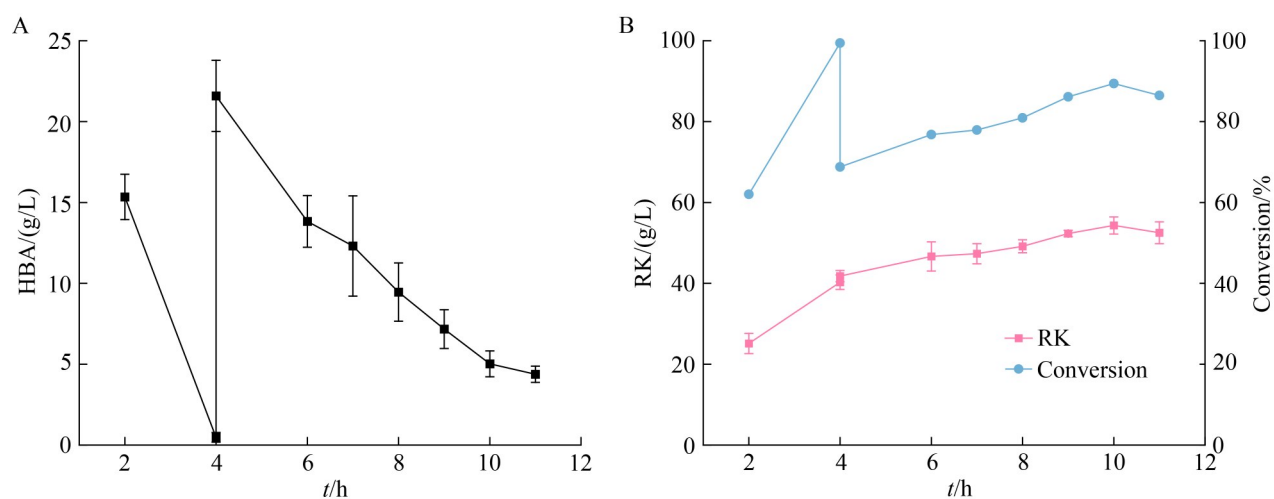


图7 覆盆子酮的1 L规模化生物合成

Figure 7 1 L-scale synthesis of raspberry ketone (RK). A: Residual concentration of 4-hydroxybenzylideneacetone (HBA) during enzymatic biosynthesis of raspberry ketone; B: Time course of raspberry ketone (RK) titer and substrate conversion efficiency.

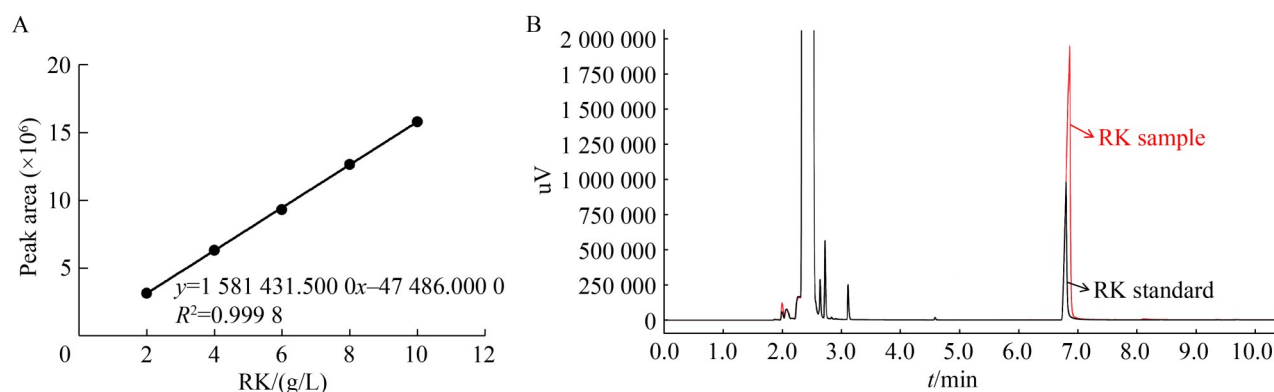


图8 生物催化产物的GC定量分析

Figure 8 GC-based determination of product concentration. A: Calibration curve of RK for quantitative analysis; B: GC chromatograms of the RK standard and the RK test sample.

8种非黄素依赖型烯还原酶中筛选出比酶活最高的 *AtQOR* (10.35 U/mg), 并以 *LbFDH* 替代传统 *BmGDH* 以解决 pH 失衡问题, 结合 Duet 系列载体优化构建获得最优工程菌株 *E. coli* 02。在 32 °C、pH 7.0、乙酸丁酯体积分数为 30%、 n (HBA): n (甲酸钠)=1:2、1 mmol/L NADP⁺ 及 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液的最优反应条件下, 20 g/L *E. coli* 02 湿细胞催化 40 g/L HBA 反应 12 h, RK 产量可达 37.88 g/L, 转化率为 93.54%。

再通过分批补料策略(40+20 g/L HBA), 在 1 L 发酵罐中仅 10 h 实现 54.32 g/L 的 RK 产量与 89.43% 的转化率, 并经 GC 与 NMR 验证, 产物纯度高、结构正确, 建立了高效稳定的 RK 生物合成平台。

本研究的首要创新在于突破了 RK 生物合成的产量瓶颈, 且核心酶 *AtQOR* 相较于传统使用的 *RiRZS1* 具有显著性能优势。从产量对比来看, 现有研究中发酵路线的最高产量为 Li 等^[10]

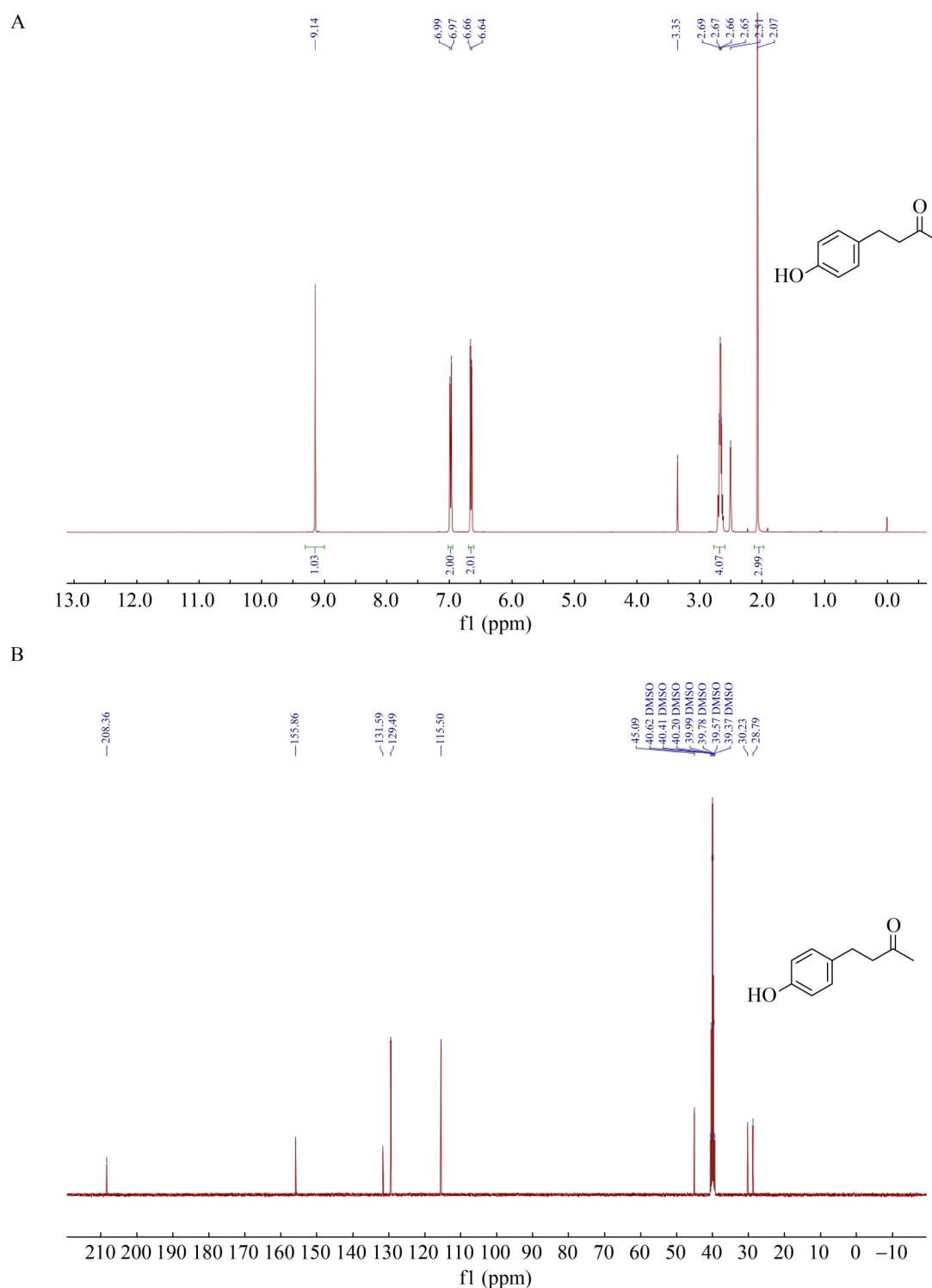


图9 产物的核磁共振波谱分析

Figure 9 NMR spectra of RK. A: ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.14 (s, 1H), 6.98 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.67 (dd, $J=9.1, 5.1$ Hz, 4H), 2.07 (s, 3H); B: ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 208.36, 155.86, 131.59, 129.49, 115.50, 45.09, 40.62, 40.41, 40.20, 39.99, 39.78, 39.57, 39.37, 30.23, 28.79.

报道的 7.24 g/L (以葡萄糖从头合成), 短路径生物催化的最高产量为 Yang 等^[11]报道的 9.89 g/L (*RiRZS1-SyGDH* 体系), 而本研究产量达到 54.32 g/L, 显著高于现有生物合成路径, 且反应时间仅 10 h, 时空产率显著优于现有体系。从酶学性能来看, *AtQOR* 相较于传统使用的 *RiRZS1* 具有更优的初始底物耐受性: *AtQOR* 在 40 g/L HBA 浓度下仍能实现较高转化率, 而 *RiRZS1* 在底物浓度 >10 g/L 时会因底物抑制或细胞毒性出现活性降低, 转化效率显著下降^[19]。此外, 本研究采用的 *LbFDH* 辅酶再生体系避免了 *RiRZS1* 常用的 *SyGDH* 体系中葡萄糖酸累积导致的 pH 波动, 进一步提升了工业应用的稳定性, 使得高底物负载下的高效转化成为可能^[11]。

作为非黄素依赖型烯还原酶, *AtQOR* 的催化核心依赖活性口袋中特异性氢键供体残基(如 Arg/Tyr/Glu/Ser 等)对底物 C=C 双键的极化作用, 通过 NAD(P)H 介导的氢化物转移与水相质子转移完成不对称氢化反应^[20]。然而, 当 HBA 浓度超过 40 g/L 时, 高浓度底物可能通过 2 种机制抑制 *AtQOR* 活性: (1) 底物分子在活性口袋外形成聚集态, 竞争性结合酶活性位点并阻碍底物极化过程, 降低氢化物转移效率; (2) 高浓度疏水底物可能破坏酶活性中心的微环境, 干扰氢键网络的稳定构象, 导致催化构象发生偏移^[21]。同时, 高底物浓度下的细胞毒性也可能通过抑制菌体代谢、破坏细胞膜完整性等方式间接降低酶催化效率^[22]。后续分子改造可靶向优化 *AtQOR* 的底物结合口袋与催化核心: 通过定向进化改造活性口袋关键残基, 增强底物的分散性与结合特异性, 降低底物聚集对催化的抑制; 同时优化酶的表面亲疏水性, 减少高浓度底物对酶微环境的破坏, 提升酶的长期稳定性^[23]。此外, 也可探索双酶共固定化技术, 将 *AtQOR* 与 *LbFDH* 锚定于海藻酸钠、壳聚糖或介孔硅等载体, 通过共价结合或包埋实现酶的循环利用, 维持双酶空间邻近效应以保障辅酶原位再生效率, 提升酶操作稳定性并降低生产成

本^[24]。在此基础上, 可进一步开发连续流催化体系, 将固定化双酶填充于填充床或酶膜反应器, 实现底物连续进料与产物在线分离, 强化传质效率、规避底物抑制, 提升时空产率并适配工业化自动化控制需求^[25]。为了拓展底物来源的经济性, 也可结合脱氧核糖磷酸醛缩酶 (deoxyribose-phosphate aldolase, DERA) 突变体^[26] (如 DERA^{S238D}) 构建“HBD→HBA→RK”的一体化催化体系, 利用更廉价原料对羟基苯甲醛 (4-hydroxybenzaldehyde, HBD) 替代 HBA, 进一步降低生产成本。

本研究通过非黄素依赖型烯还原酶介导的绿色生物催化策略实现 RK 高效合成, 契合绿色制造趋势。未来通过酶固定化与连续流技术的集成, 可进一步提升工艺稳定性与可放大性, 为食品、香精香料等领域提供天然、安全的高纯度产品, 推动天然功能成分生产模式升级, 兼具重要学术价值与广阔工业应用前景。

作者贡献声明

黄珊珊: 研究构思和设计、实验操作、论文撰写; 靳阿原: 协助实验操作; 宋伟: 研究设计、论文指导与修改; 吴静: 提供技术支持、实验指导、参与论文讨论。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Masuo S, Saga CS, Usui K, Sasakura Y, Kawasaki Y, Takaya N. Glucose-derived raspberry ketone produced via engineered *Escherichia coli* metabolism[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 843843.
- [2] Park K. Raspberry ketone increases both lipolysis and fatty acid oxidation in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Planta Medica*, 2010, 76(15): 1654-1658.
- [3] Koeduka T, Yoshida K, Nomura T. Bioproduction of raspberry ketone using *Phyllostachys bamboo* cells expressing raspberry ketone biosynthetic genes[J]. *Plant Biotechnology*, 2025, 42(4): 497-501.
- [4] Milke L, Mutz M, Marienhagen J. Synthesis of the character impact compound raspberry ketone and

- additional flavoring phenylbutanoids of biotechnological interest with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19: 92.
- [5] 郝家金, 王璧, 杨广远, 赵萍萍, 王建莉. 覆盆子酮研究进展[J]. *精细石油化工进展*, 2015, 16(5): 48-50.
Hao JJ, Wang B, Yang GY, Zhao PP, Wang JL. Progress of research on raspberry ketone[J]. *Advances in Fine Petrochemicals*, 2015, 16(5): 48-50 (in Chinese).
- [6] Guo H, Chang S, Jia LL, Wang ZY, Zhang Q, Zhang GB. Advances in the synthesis and applications of raspberry ketone: a review[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2021, 36(6): 615-625.
- [7] 张亨. 覆盆子酮的生物合成研究进展[J]. *香料香精化妆品*, 2015(1): 63-65.
Zhang H. Research progress in biosynthesis of raspberry ketone[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2015(1): 63-65 (in Chinese).
- [8] Alcántara AR, Domínguez de María P, Littlechild JA, Schürmann M, Sheldon RA, Wohlgemuth R. Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry[J]. *ChemSusChem*, 2022, 15(9): e202102709.
- [9] Zhou SH, Zhang QY, Yuan MW, Yang HN, Deng Y. Static and dynamic regulation of precursor supply pathways to enhance raspberry ketone synthesis from glucose in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(42): 23411-23421.
- [10] Li YY, Niu SH, Wang ZX, Wang YC, Zhang XJ, Deng Y, Zhou SH. High-titer *de novo* raspberry ketone production in *Yarrowia lipolytica* via precursor supply engineering and fed-batch fermentation optimization[J]. *Bioresource Technology*, 2026, 447: 134232.
- [11] Yang B, Zheng P, Wu D, Chen PC. Efficient biosynthesis of raspberry ketone by engineered *Escherichia coli* coexpressing zingerone synthase and glucose dehydrogenase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(8): 2549-2556.
- [12] Yang Y, Shang KK, Gao XR, Zhu XM, Ling MY, Zheng P, Xu SC, Chen PC. Rational designing and stepwise cascade for efficient biosynthesis of raspberry ketone[J]. *Catalysts*, 2025, 15(12): 1148.
- [13] Gao PZ, Sun HZ, Ledesma-Amaro R, Marcellin E, Peng HD. Advancements and challenges in the bioproduction of raspberry ketone by precision fermentation[J]. *Future Foods*, 2025, 11: 100606.
- [14] Toogood HS, Scrutton NS. New developments in 'ene'-reductase catalysed biological hydrogenations[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 107-115.
- [15] Gao DK, Song W, Wu J, Guo L, Gao C, Liu J, Chen XL, Liu LM. Efficient production of L-homophenylalanine by enzymatic-chemical cascade catalysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(36): e202207077.
- [16] Hatrongjit R, Packdibamrung K. A novel NADP⁺-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: screening, purification and characterization[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(7): 557-561.
- [17] Alpdağtaş S, Yücel S, Kapkaç HA, Liu SQ, Binay B. Discovery of an acidic, thermostable and highly NADP⁺ dependent formate dehydrogenase from *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929[J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(7): 1135-1147.
- [18] Hoelsch K, Sührer I, Heusel M, Weuster-Botz D. Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2473-2481.
- [19] 杨波. 重组大肠杆菌全细胞合成覆盆子酮的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
Yang B. Biosynthesis of raspberry ketone by recombinant *Escherichia coli* whole cells[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [20] 高登科. 烟酰胺依赖型烯还原酶的挖掘、解析和应用[D]. 无锡: 江南大学, 2025.
Gao DK. Mining, characterization, and application of nicotinamide-dependent ene reductases[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2025 (in Chinese).
- [21] Kokkonen P, Beier A, Mazurenko S, Damborsky J, Bednar D, Prokop Z. Substrate inhibition by the blockage of product release and its control by tunnel engineering[J]. *RSC Chemical Biology*, 2021, 2(2): 645-655.
- [22] Gharasoo M, Centler F, Van Cappellen P, Wick LY, Thullner M. Kinetics of substrate biodegradation under the cumulative effects of bioavailability and self-inhibition[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(9): 5529-5537.
- [23] 祁延萍, 朱晋, 张凯, 刘彤, 王雅婕. 定向进化在蛋白质工程中的应用研究进展[J]. *合成生物学*, 2022, 3(6): 1081-1108.
Qi YP, Zhu J, Zhang K, Liu T, Wang YJ. Recent development of directed evolution in protein engineering[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(6): 1081-1108 (in Chinese).
- [24] Fernández Regueiro CL, Roura Padrosa D. Unlocking the potential of flow biocatalysis with enzyme immobilization[J]. *Chimia*, 2025, 79(6): 411-416.
- [25] Yuan PY, Wang Q, Deng XL, Zhang XY, Fan DD, Bai YP. Coimmobilized dual enzymes in a continuous flow reactor for the efficient synthesis of optically pure γ/δ -lactones[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2025, 17(1): 867-879.
- [26] 朱兴森. 对羟基苯甲醛级联反应合成覆盆子酮的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
Zhu XM. Synthesis of raspberry ketone by 4-hydroxybenzaldehyde cascade reaction[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).