

# 大肠杆菌分泌表达烟酰胺单核苷酸合成途径酶及催化体系优化

吴旻晖, 梁书利, 林影\*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 烟酰胺单核苷酸 (NMN) 是具有重要医用价值的 NAD<sup>+</sup> 前体, 通过信号肽 PelB 实现大肠杆菌 BL21(DE3) 分泌表达催化 NMN 合成的烟酰胺磷酸核糖转移酶 (Sfnampt)、磷酸核糖焦磷酸激酶 (Tkprs) 和核糖激酶 (Erbks)。对三酶的酶学特性分析显示, Sfnampt、Tkprs 和 Erbks 的最适反应温度分别为 45、50 和 37 °C, 最适 pH 值分别为 7.5、8.5 和 5.5。热稳定性分析发现, Sfnampt 在 35 °C 热稳定性良好而在 40~55 °C 较差; Tkprs 在 40~60 °C 热稳定性良好; Erbks 在 25~40 °C 热稳定性良好而在 45 °C 较差。酶动力学分析可知, Sfnampt、Tkprs 和 Erbks 的  $V_{max}$  分别为 0.65  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 、2.37  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 、12.58  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ,  $K_m$  分别为 2.87  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、25.48  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 74.13  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , Tkprs、Erbks 与已表征的 Prs、Rbks 相比底物亲和力好。将分泌表达的三酶用于催化合成 NMN, 温度 37 °C、pH 值 8.0 为较优催化条件。底物 ATP 以及酶 Sfnampt 在反应体系中为关键因素, 经底物和酶配比优化后, 使用三酶经过 7 h 催化可获得 5.50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 NMN。该研究在大肠杆菌系统成功实现了 NMN 合成途径酶的分泌表达, 为 NMN 合成提供了新思路。

**关键词:** 烟酰胺单核苷酸; 分泌表达; 信号肽; 大肠杆菌

文章编号: 1673-9078(2023)03-75-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0496

## Secretion and Expression of Enzymes in the Nicotinamide Mononucleotide Synthesis Pathway and the Optimization of the Catalytic System in *Escherichia coli*

WU Minhui, LIANG Shuli, LIN Ying\*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Nicotinamide mononucleotide (NMN) is a precursor of NAD<sup>+</sup> with important medical value. *Escherichia coli* BL21(DE3) expresses and secretes the enzymes nicotinamide phosphoribosyltransferase (Sfnampt), phosphoribosyl pyrophosphate kinase (Tkprs), and ribokinase (Erbks), which catalyze the synthesis of NMN through the signal peptide PelB. The enzymatic characteristics of three enzymes were analyzed, and the results showed that the optimum reaction temperatures of Sfnampt, Tkprs, and Erbks were 45 °C, 50 °C, and 37 °C respectively, and the optimum pH values were 7.5, 8.5, and 5.5 respectively. In terms of thermal stability, Sfnampt was found to have good thermal stability at 35 °C and poor stability at 40~55 °C. The thermal stability of Tkprs was optimized at 40~60 °C, whereas that of Erbks was best at 25~40 °C and poor at 45 °C. The results of the enzyme kinetic analysis showed that the  $V_{max}$  values of Sfnampt, Tkprs, and Erbks were 0.65, 2.37, and 12.58  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ , respectively, and  $K_m$  values were 2.87, 25.48, and 74.13  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , respectively. Compared with the characterized Prs and Rbks, Tkprs and Erbks had better substrate affinity. The three enzymes were used for the catalytic synthesis of NMN, and the optimum catalytic conditions were 37 °C and pH 8.0. The substrate ATP and enzyme Sfnampt were the key factors in the reaction system.

引文格式:

吴旻晖, 梁书利, 林影. 大肠杆菌分泌表达烟酰胺单核苷酸合成途径酶及催化体系优化[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 75-86.

WU Minhui, LIANG Shuli, LIN Ying. Secretion and expression of enzymes in the nicotinamide mononucleotide synthesis pathway and the optimization of the catalytic system in *Escherichia coli* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 75-86.

收稿日期: 2022-04-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFA0901700)

作者简介: 吴旻晖 (1996-), 男, 硕士, 研究方向: 药学, E-mail: 522914235@qq.com

通讯作者: 林影 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 酶学与酶工程, E-mail: feylin@scut.edu.cn

After optimizing the ratio of substrate and enzyme, 5.5  $\mu\text{mol/L}$  of NMN could be obtained after 7 h of catalysis by the three enzymes. In this study, the enzymes for the pathway of NMN synthesis were determined to be successfully expressed and secreted in *E. coli*, which indicates a new direction for the synthesis of NMN.

**Key words:** nicotinamide mononucleotide; secretion and expression; signal peptide; *Escherichia coli*

烟酰胺单核苷酸 (Nicotinamide Mononucleotide, NMN) 是一种天然存在的核苷酸, 是合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD) 的前体之一<sup>[1]</sup>。细胞中  $\text{NAD}^+$  的浓度会随着机体衰老而降低, 而  $\text{NAD}^+$  的缺乏与多种疾病如阿尔茨海默氏病、II 型糖尿病等密切相关, 所以维持  $\text{NAD}^+$  的水平对于健康至关重要<sup>[2]</sup>。由于通过外源途径直接高剂量补充  $\text{NAD}^+$  可能会带来各种副作用, 并且  $\text{NAD}^+$  较难通过细胞质膜转运至胞内, 而 NMN 的口服利用度高、副作用较小, 且较易透过质膜, 因此选择前体 NMN 作为  $\text{NAD}^+$  的外源补充是较好的选择<sup>[3]</sup>。

研究已证明 NMN 有多种药理活性。糖尿病可导致认知能力下降而引起痴呆, NMN 治疗可以激活 Sirt1 通路, 防止 CA1 神经元丢失<sup>[4]</sup>。衰老会导致骨髓间充质干细胞 (MSC) 数量或功能的丧失, 而 NMN 通过激活 Sirt1 促进 MSC 的自我更新, 增强成骨并减少脂肪生成<sup>[5]</sup>。衰老会导致血管系统中的  $\text{NAD}^+$  消耗, 施用 NMN 可以挽救内皮血管损伤, 增强其血管再生能力, 改善脑血供应<sup>[6]</sup>。

目前 NMN 的合成主要依靠化学有机合成及生物发酵法或酶法催化合成, 有机合成成本高且对环境污染大, 还会产生难以分离的手性异构体, 而生物合成对环境友好且安全性高。多酶联用的酶法催化合成具有大幅度降低成本的潜力<sup>[7]</sup>, Zhou 等<sup>[8]</sup>从 NRP、APH、

APP 三条级联反应途径筛选出 APH 途径, 并优化关键酶 Nampt (Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase, EC 2.4.2.12) 和催化条件, 最终得到了 3.0 g/L 的 NMN。

大肠杆菌代谢途径相对简单, 能利用廉价碳源快速生长<sup>[9]</sup>, 常用于胞内过表达重组蛋白。但大肠杆菌不具备翻译后修饰能力, 且胞内为还原性环境, 不能表达含复杂二硫键或需要翻译后修饰的蛋白质, 过表达蛋白时容易发生错误折叠形成包涵体, 而包涵体复性会带来高昂成本<sup>[10]</sup>。因此常将蛋白靶向周质空间或培养基, 有助于蛋白折叠和稳定, 并能降低工艺成本<sup>[11]</sup>。

在以往研究中, NMN 的酶法合成多通过制备全细胞催化剂以达到酶的重复使用目的, 或制备酶突变体以提高催化效率, 尚未有关于利用大肠杆菌分泌表达 NMN 合成相关酶的报道。本研究通过在大肠杆菌中引入 PelB 信号肽基因, 该信号肽广泛应用于大肠杆菌分泌表达, 成功分泌催化合成 NMN 的三酶, 分别是 *Sulfurovum* sp. FS06-10 来源的 Nampt、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 来源的 Prs (Phosphoribosyl Phosphate Synthase, EC 2.7.6.1) 及 *Escherichia coli* K12 来源的 Rbks (Ribokinase, EC 2.7.1.15)。通过直接将分泌表达的三酶投入反应体系 (如图 1), 并通过初步优化, 成功实现 NMN 的酶法合成。本研究中 Sfnampt、Tkprs、Erbks 均为首次用于 NMN 合成的报道, 为 NMN 的酶法合成提供了新思路。

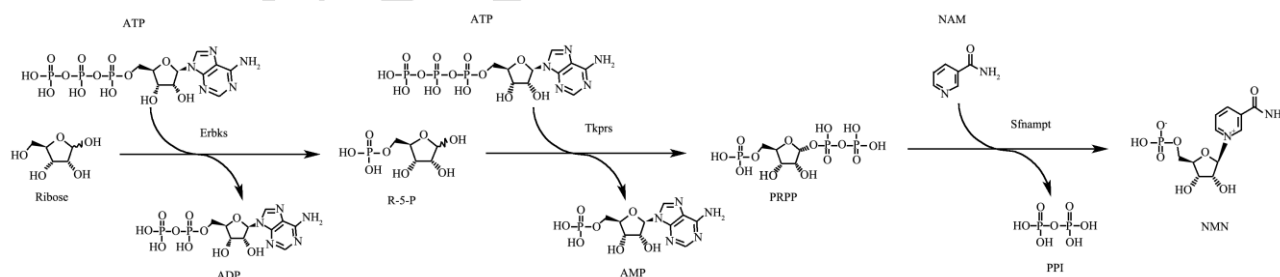


图 1 NMN 的酶法催化合成

Fig.1 Enzymatic synthesis of NMN

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 菌株与质粒

宿主菌 *E. coli* Top10 和 *E. coli* BL21(DE3)、表达载体 pET28a(+) 由华南理工大学生物科学与工程学院

微生物酶学实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂及培养基

限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I, Thermo Scientific 公司; DNA Marker, 广州东盛生物科技有限公司; KOD FX 高保真聚合酶, TOYOBO 公司; 同源重组酶, 上海鼎桑生物科技有限公司; 蛋白标准 Marker, Thermo Scientific 公司; 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 北京庄

盟国际生物基因科技有限公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒, 广州美基生物科技有限公司; 硫酸卡那霉素 (Kan)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 上海麦克林生化科技有限公司; 烟酰胺、D-(-)核糖, Sigma 公司; 腺苷-5'-三磷酸二钠盐合物 (ATP), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Yeast Extract、Tryptone, Oxoid 公司; NaCl, 天津大茂化学试剂厂。

### 1.1.3 主要仪器设备

ETC811 基因扩增仪, 苏州东胜兴业科学仪器有限公司; Infinite 200 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; EPS 300 蛋白电泳仪, 上海天能科技有限公司; MS-100 恒温混匀仪, 杭州奥盛仪器有限公司; GE AKTA PURE 蛋白纯化仪, 美国通用电气公司; NanoDrop 1000 微量分光光度计, Thermo 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组质粒构建及鉴定

分别在 NCBI 上数据库中获得 *Sulfurovum* sp. FS06-10 来源的烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (Nampt) 的氨基酸序列 (GenBank: KIM05844.1)、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 来源的磷酸核糖焦磷酸合成酶 (Prs) 的氨基酸序列 (Uniprot: O52958)、*Escherichia coli* K12 来源的核糖激酶 (Rbks) 的氨基酸序列 (Uniprot: P0A9J6), 对其进行密码子优化后, 在上海捷瑞生物工程有限公司完成优化后的基因合成。并通过两次重叠 PCR, 分别在 Nampt、Prs、Rbks 的 N 端引入信号肽 PelB (氨基酸序列: MKYLLPTAAA GLLLLAAQPAMA), 在 C 端引入 6\*His-Tag 标签。通过同源重组的方式, 将 5' 端带有信号肽序列的 Nampt、Prs、Rbks 基因片段引入 pET28(+)*Nco* I 和 *Xho* I 位点之间。分别获得重组质粒 pET28a-pelB-sfnampt、pET28a-pelB-tkprs、pET28a-pelB-erbks, 并将重组质粒转入 *E. coli* Top10 感受态, 在卡那霉素抗性平板上培养。挑取平板上生长出的单菌落提取重组质粒。通过质粒双酶切和测序鉴定重组质粒是否正确。

### 1.2.2 分泌菌株构建及蛋白表达

将鉴定正确的重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态, 在卡那霉素抗性平板上培养。挑取平板上生长的菌落 PCR 鉴定为阳性的单菌落, 在加有终质量浓度为 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 10 mL 液体 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养约 10~12 h。将过夜培养的种子液转接适量至加有终质量浓度为 50  $\mu$ g/mL 卡那霉

素的 100 mL LB 培养基中, 控制初始 OD 为 0.1, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇瓶培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8, 使菌体处于对数生长期。加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 于 16  $^{\circ}$ C、180 r/min 下培养 21 h, 以诱导蛋白表达。

### 1.2.3 目的蛋白的酶活性及 SDS-PAGE 分析

#### 1.2.3.1 样品预处理与 SDS-PAGE 分析

诱导结束后, 4  $^{\circ}$ C 下, 7 800 r/min 离心 7 min, 分别收集菌体与发酵上清液。收集的菌体经纯水洗涤、重悬后, 用超声波细胞粉碎机进行小样品破碎, 参数为: 模式 01  $\phi$  03, 功率 15%, 破碎 3 s 停止 3 s, 破碎程序总时长为 10 min。分别收集破碎后的悬浊液、上清液, 沉淀经洗涤后重悬; 发酵上清液进行 20 倍超滤浓缩处理。上述样品经过 SDS 变性处理后, 进行 SDS-PAGE 分析。

#### 1.2.3.2 酶活性分析

发酵上清液原液 (未浓缩处理) 作为分泌蛋白样品进行酶活性分析。酶活性分析参照 Zhang 等<sup>[12]</sup> 的荧光检测方法。

##### (1) 酶催化反应:

酶活测定体系总体积为 100  $\mu$ L。Sfnampt 的酶活测定体系包括终浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl、12 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>、0.4 mmol/L 的 PRPP、2 mmol/L 的 ATP、0.4 mmol/L 的 NAM。Tkprs 的酶活测定体系除了包括终浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl、12 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>、1 mmol/L 的 D-核糖-5-磷酸、2 mmol/L 的 ATP、2 mmol/L 的 NAM, 还要添加终浓度 0.05 mg/mL 的胞内表达的 Nampt 纯化酶构成级联测定体系。Erbks 的酶活测定体系除了包括终浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl、12 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>、1 mmol/L 的 D-核糖、2 mmol/L 的 ATP、2 mmol/L 的 NAM, 还要添加终浓度 0.05 mg/mL 的胞内表达的 Nampt 纯化酶和 0.1 mg/mL 的胞内表达的 Prs 纯化酶构成级联测定体系。

测定酶活时, 分别在相应的测定体系中加入 10  $\mu$ L 发酵上清液原液启动催化反应。上述反应体系置于恒温混匀仪中, 37  $^{\circ}$ C 反应 10 min, 并以 95  $^{\circ}$ C 水浴处理 1 min 终止催化反应。

##### (2) 化学反应:

在反应体系中加入 28  $\mu$ L 2 mol/L 的 KOH 和 28  $\mu$ L 20% 的苯乙酮, 涡旋混匀后, 冰浴 2 min。加入 126  $\mu$ L 88% 的甲酸, 37  $^{\circ}$ C 反应 10 min。取 240  $\mu$ L, 在 382 nm 发射光、445 nm 激发光条件下, 检测其荧光值。通过产物 NMN 的标准曲线, 计算其酶活性。所得的酶活性数据均需要通过发酵菌株的 OD 进行归一化处理。

## 1.2.4 酶学性质及动力学

### 1.2.4.1 最适温度

为了确定温度对酶活性的影响,参照 1.2.3.2 酶活性分析方法,在 pH 值 7.5 的条件下,测定在 20、25、30、37、40、45、50、55、60、65、70、80 °C 条件下的酶活性,并绘制温度—相对酶活曲线。

### 1.2.4.2 最适 pH 值

为了确定 pH 值对酶活性的影响,参照 1.2.3.2 酶活性分析方法,在 37 °C 的条件下,测定在 pH 值 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、9、10 条件下的酶活性,并绘制 pH-相对酶活曲线。

### 1.2.4.3 热稳定性

为了确定酶在不同温度下的稳定性,根据酶的最适温度,选取附近的温度点对酶进行孵育 3 h 处理,孵育结束后,参照方法 1.2.3.2,对残余酶活性进行测定,并以未经热孵育处理的酶活性作为 100%,绘制温度-残余酶活性曲线。

### 1.2.4.4 动力学参数

参照 1.2.3.2 酶活性测定体系,测定单一底物在不同浓度下酶的动力学参数。测定 Sfnampt 的动力学参数时,固定底物 PRPP 浓度不变,设置底物 NAM 的浓度梯度;测定 Tkprs 的动力学参数时,固定底物 ATP、NAM 浓度不变,设置底物 D-核糖-5-磷酸的浓度梯度;测定 Erbks 的动力学参数时,固定底物 ATP、NAM 浓度不变,设置底物核糖的浓度梯度;在 Origin 2019 软件进行米氏方程拟合,得到  $K_m$  值及  $V_{max}$  值。

## 1.2.5 三酶催化生产 NMN 及催化优化

### 1.2.5.1 三酶级联催化体系

参照廖一波等<sup>[13]</sup>构建三酶级联催化体系。催化体系总体积为 100  $\mu$ L,体系中含有终浓度 50 mmol/L 的 Tris-HCl、12 mmol/L 的  $MgCl_2$ 、100  $\mu$ mol/L 的 NAM、100  $\mu$ mol/L 的核糖、2 mmol/L 的 ATP,体系中三酶以酶活性  $U_{Sfnampt}:U_{Tkprs}:U_{Erbks}=1:1:1$  加入。反应于 pH 值 7.5、37 °C 条件下进行,每隔一定时间进行取样,并参考 1.2.3.2 中的化学反应方法,对 NMN 的产量进行测定。

### 1.2.5.2 催化体系的优化

参照 1.2.5.1,在 pH 值 7.5 条件下,设置不同的温度条件,反应 3 h 并测定 NMN 的产量;在温度为 37 °C 条件下,设置不同的 pH 值条件,反应 3 h 并测定 NMN 的产量;在 pH 值 7.5,温度 37 °C 条件下,改变三个底物 NAM、核糖、ATP 的加入量,反应 3 h 并测定 NMN 的产量;在 pH 值 7.5,温度 37 °C 条件下,在加入三酶总酶活不变的情况下,改变 Sfnampt、Tkprs、Erbks 的酶活性比例,反应 3 h 并测定 NMN 的产量;在 pH 值 7.5,温度 37 °C 条件下,设置不同的  $Mg^{2+}$  浓

度,反应 3 h 并测定 NMN 的产量;

### 1.2.6 数据分析

所有酶催化反应均设置三个平行,最终数据为三个平行反应的荧光检测值的平均值,以误差线表示标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒构建及鉴定

将信号肽 PelB 及目的基因克隆至 pET28(+)载体上,并对重组质粒进行双酶切鉴定,结果如图 2。双酶切产物出现两条条带,5 000 bp 附近的条带与载体 pET28a(+)的大小相符;另外分别在 1 500 bp、1 000 bp 和 1 000 bp 附近出现条带,与带信号肽基因 *pelB* 的 *sfnampt*、*tkprs*、*erbks* 序列预测大小符合。重组质粒送往上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定,结果表明测序结果与质粒图谱比对成功,可以知道重组质粒 pET28a-*pelB*-*sfnampt*、pET28a-*pelB*-*tkprs*、pET28a-*pelB*-*erbks* 构建成功。

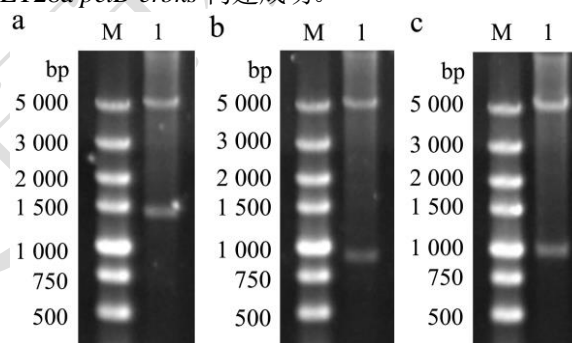


图2 重组质粒的 *Nco*I、*Xho*I 双酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by double-enzyme digestion of *Nco*I and *Xho*I

注: a 为 pET28a-*pelB*-*sfnampt*, b 为 pET28a-*pelB*-*tkprs*, c 为 pET28a-*pelB*-*erbks*。

### 2.2 酶活性及 SDS-PAGE 分析

按照方法 1.2.2,接种并发酵重组菌株 BL21(DE3)/pET28a-*pelB*-*sfnampt*、BL21(DE3)/pET28a-*pelB*-*tkprs* 及 BL21(DE3)/pET28a-*pelB*-*erbks*,并对其分泌蛋白、胞内全蛋白、胞内可溶性蛋白、胞内不可溶蛋白进行 SDS-PAGE 分析,以 BL21(DE3)为阴性对照,结果如图 3。Sfnampt、Tkprs、Erbks 蛋白样品分别在 55、35、35~40 ku 附近有条带,与预测大小 54、35、36 ku 相符,而在相同位置 BL21 的蛋白样品并未出现条带。说明三种蛋白能以可溶性方式表达,并能分泌至胞外培养基中。对 Sfnampt、Tkprs、Erbks 三种分泌蛋白样品分别进行酶活性分析,在培养基中分别检测

到三种分泌蛋白的酶活性为 1.10、21.11、29.47 U/L。

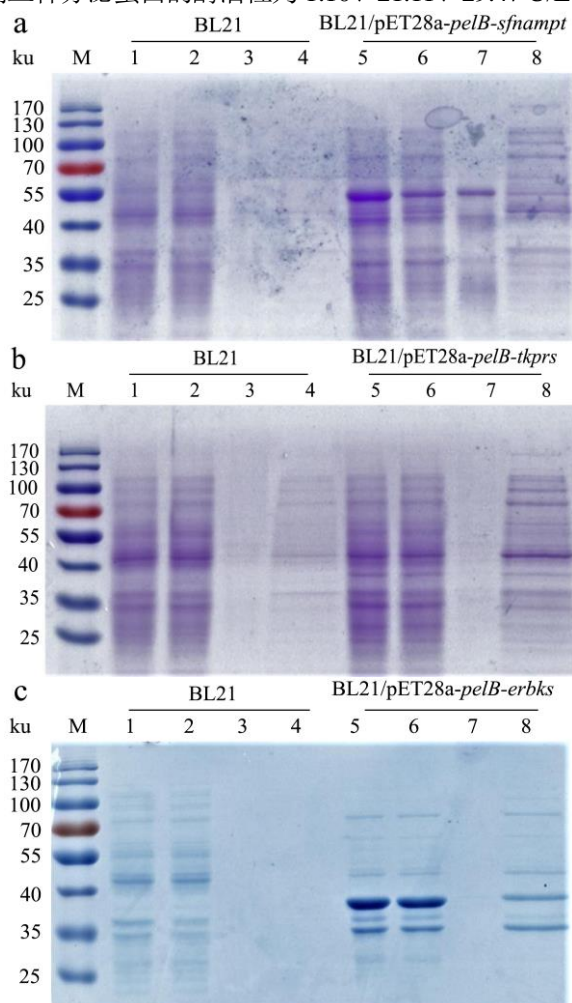


图3 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 Analysis of SDS-PAGE of protein expression

注：a 为 Sfnampt，b 为 Tkprs，c 为 Erbks。在各图中 1~4 为 BL21 蛋白样品，5~8 为重组分泌菌株的蛋白样品。其中 1、5 为胞内全蛋白，2、6 为胞内可溶蛋白，3、7 为胞内不可溶蛋白，4、8 为分泌蛋白（浓缩 20 倍）。

### 2.3 酶学性质及酶动力学

#### 2.3.1 最适温度

按照方法 1.2.4.1，分别以 BL21/pET28a-pelB-sfnampt、BL21/pET28a-pelB-tkprs、BL21/pET28a-pelB-erbks 的发酵上清液为 Sfnampt、Tkprs、Erbks 分泌蛋白的样品，在 pH 值 7.5 条件下，测定其在不同温度条件下的酶活性，以酶活性最高值为 100%，其余相对最高值为相对酶活性，绘制温度-酶活曲线如图 4。对于 Sfnampt，在温度为 30~50 °C 时，其相对酶活性在 60% 以上；在 37、40、45 °C 时，其酶活性在 80% 以上，而 45 °C 时其相对酶活性最高，为最适温度；当温度高于 65 °C 时，酶活性降至 20% 以下。对于 Tkprs，当温度在 37~50 °C 时，Tkprs 的酶活性维持在 60% 以上；

在 45、50 °C 时，其酶活性在 80% 以上，在 50 °C 的条件下，其相对酶活性最高，为最适温度。温度高于 50 °C 时，其酶活性急剧下降；在温度高于 60 °C 时，酶活性降至 20% 以下。对于 Erbks，当温度在 30~50 °C 时，Erbks 的酶活性维持在 60% 以上，在 37、40、45 °C 时，其酶活性在 80% 以上。当温度为 37 °C 时，其酶活性最高，为最适温度。在温度高于 65 °C 时，酶活性降至 20% 以下。Chuvikovsky 等<sup>[14]</sup>发现 *E. coli* 来源的 Rbks 在 30~50 °C 具有最高的酶活性，而当温度从 50 °C 提高至 60 °C 时，其酶活性急剧下降，与本研究结果相近。以上三酶在 35~50 °C 范围内都具有 60% 以上的酶活性；当温度低于 30 °C 时，酶活性没有达到较高水平，而当温度高于 55 °C，酶活性下降严重。表明将三酶运用于催化反应时，35~50 °C 为较为适宜的温度范围。

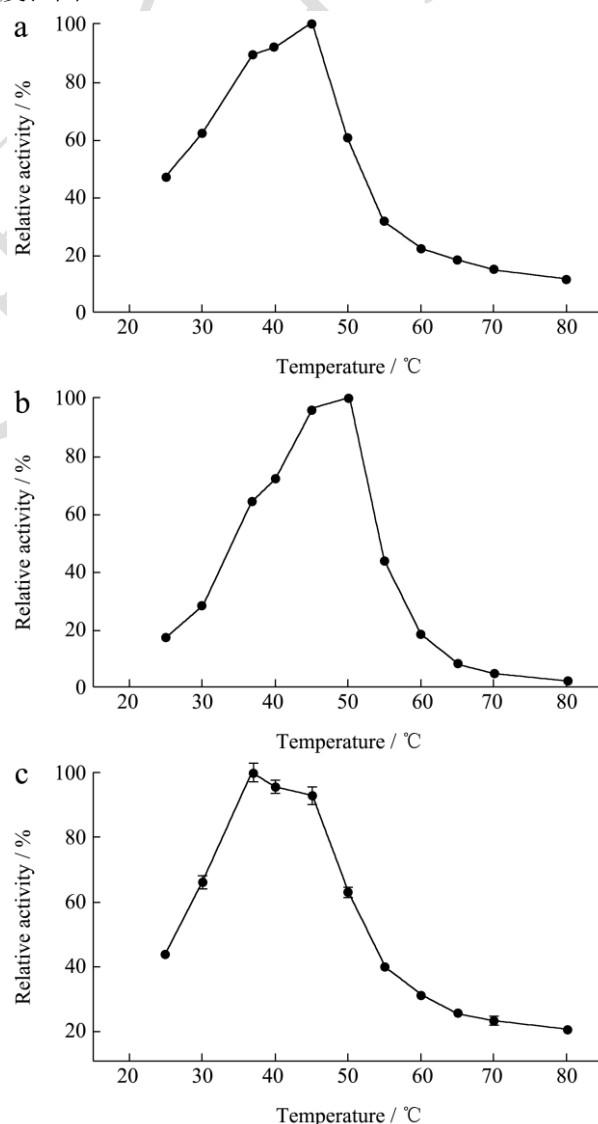


图4 温度对酶活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on enzyme activity

注：a 为 Sfnampt，b 为 Tkprs，c 为 Erbks。图 5~7 同。

### 2.3.2 最适 pH 值

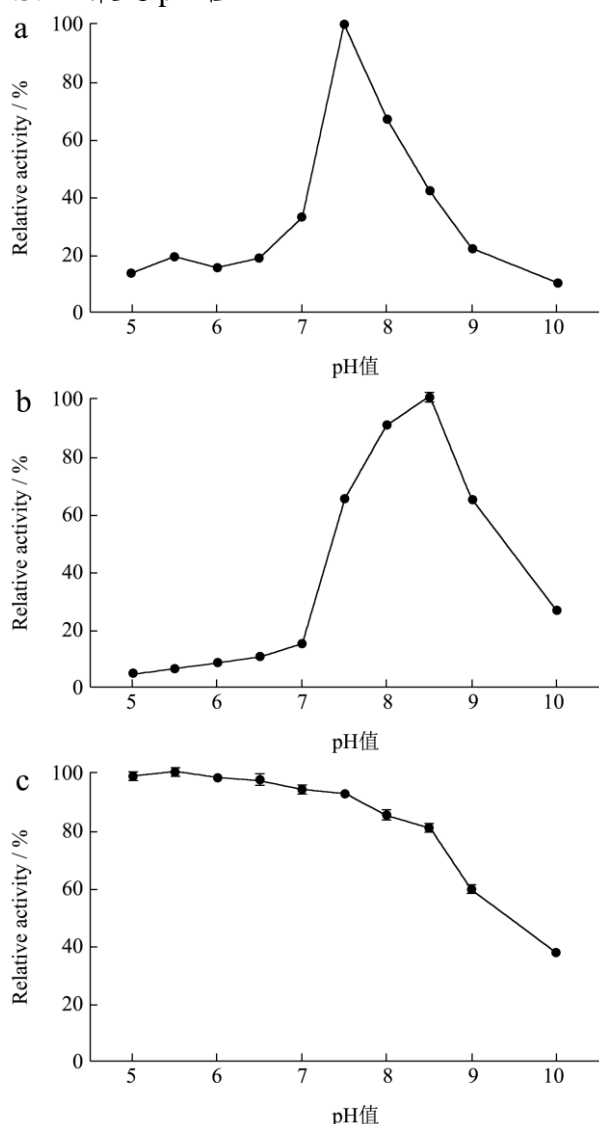


图 5 pH 值对酶活性的影响

Fig.5 Effect of pH value on enzyme activity

按照方法 1.2.4.2, 在 37 °C 下, 测定分泌蛋白样品在不同 pH 值条件下的酶活性, 以酶活性最高值为 100%, 其余相对最高值为相对酶活性, 绘制 pH-酶活曲线如图 5。对于 Sfnampt, pH 值为 7.5 时 Sfnampt 的相对酶活性最高, 为最适 pH 值; 在 pH 值为 8.0 时酶活性在 60% 以上; 而在 pH 值低于 6.5 或 pH 值高于 9.0 的条件下, Sfnampt 的酶活性都低于 20%; 表明该酶在弱碱性条件下有较高的酶活性, 而在中性和酸性条件下酶活性较低。对于 Tkprs, 当 pH 值为 8.5 时酶活性最高, 为最适 pH 值; 当 pH 值为 7.5~9.0 时, 酶活性在 60% 以上; 而当 pH 值低于 7.0 时, 酶活性骤降至低于 20%; 表明在该酶在碱性的条件下有较高的酶活性, 而在中性和酸性条件下酶活性较低。对于 Erbks, 当 pH 值在 5~8.5 范围内变化时, Erbks 的酶活性都在 80% 以上; 在设定的 pH 值梯度下, 当 pH 值

为 5.5 时达到最高, 为最适 pH 值; 而当 pH 值高于 9.0 时, Erbks 的酶活性才降至 60% 以下; 表明在该酶的酶活性受 pH 值变化影响较小, 而酸性条件下酶活性更高。Chuvikovskiy 等<sup>[14]</sup>发现 *E. coli* 来源的 Rbks 在 pH 值 8.0~9.0 时表现出 95%~100% 的高酶活, 而当 pH 值为 7.8 时其酶活性下降了 30%, 当 pH 值进一步降低至 6.0 时, 其酶活性下降为最高酶活的 50%。与本研究相比虽 pH-酶活变化趋势差异较大, 可能的原因是虽都为大肠杆菌来源的 Rbks, 但菌株不同; 且本研究为分泌表达的粗蛋白, 未经纯化, 培养基中的杂质也可能对活性测定有一定的影响。

### 2.3.3 热稳定性

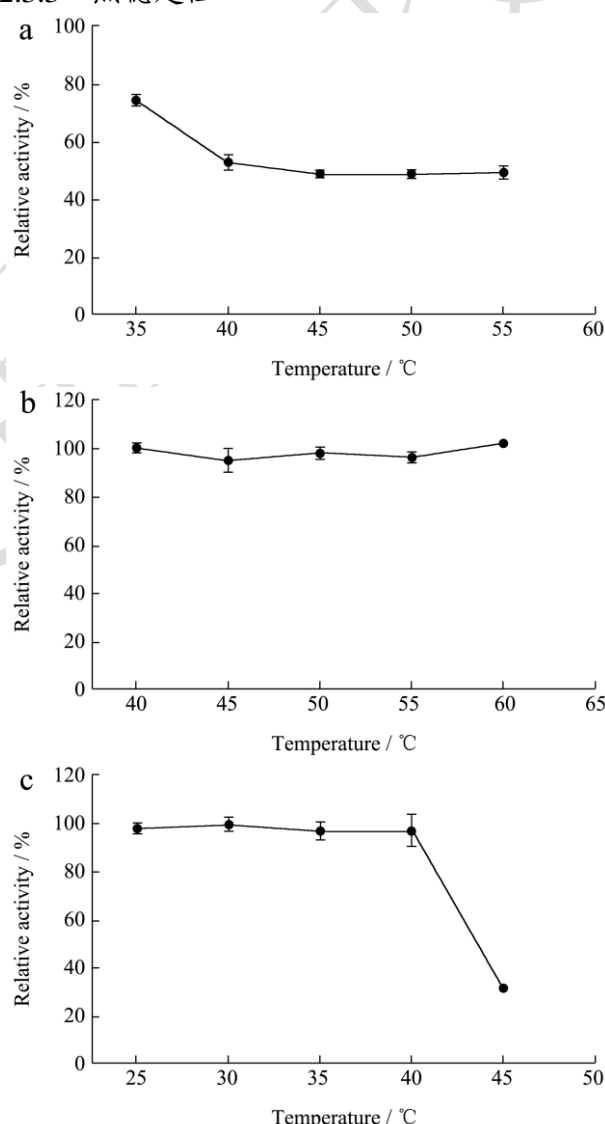


图 6 热处理对酶活性的影响

Fig.6 Effect of heat treatment on enzyme activity

按照方法 1.2.4.3, 分别根据 Sfnampt、Tkprs、Erbks 的最适温度, 选取附近温度点进行 3 h 的恒温孵育处理。孵育结束后, 在最适温度、最适 pH 值条件下, 测定未经孵育处理及经过恒温孵育处理的分泌蛋白样



品的酶活性,以未经处理样品的酶活性为100%,其余为相对酶活性,绘制温度-酶活曲线如图6。对于Sfnampt,虽然45℃为Sfnampt的最适温度,但其在最适温度下的热稳定性不佳,经过3h的孵育后残余酶活性只有约50%,而在35℃下孵育3h后其残余酶活性接近80%。故当该酶投入长时间的催化反应时,较低温度较最适温度更有利于较长时间维持高酶活状态。对于Tkprs,经过3h在40~60℃下的孵育,Tkprs的残余酶活性依旧保持在90%以上,其热稳定性良好。故在长时间催化的温度选择方面,Tkprs的选择范围更加宽泛。对于Erbks,经过3h在25~40℃下的孵育,Erbks的残余酶活性依旧保持在90%以上,可以推断在此温度梯度和时间内,其热稳定性良好;而在45℃下孵育3h后,其残余酶活性只剩余约30%。因此可知在温度不高于40℃时,Erbks的热稳定性良好,而当温度高于45℃后,其热稳定性变差。故当该酶用于长时间催化反应时,在不高于40℃的条件下进行有利于长时间保持较高酶活性。

### 2.3.4 动力学参数

#### 2.3.4.1 Sfnampt的动力学参数测定

按照方法1.2.4.4,在Sfnampt的最适温度和pH值条件下,设置不同的底物NAM浓度,测定其动力学参数,结果如图7a所示。通过Origin 2019软件进行曲线拟合并分析,其 $V_{\max}=0.65 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ , $K_m=2.87 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。近年来,对Nampt在动力学方面的报道相对较少。1972年,Lin等<sup>[15]</sup>从大鼠的红细胞中纯化出Nampt,基于底物NAM的 $K_m$ 值为 $0.07 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。2002年,Rongvaux等<sup>[16]</sup>报道,原核生物*Haemophilus ducreyi*来源的基因*nadV*编码的一种蛋白为Nampt,以NAM为底物,测得其 $K_m$ 值为 $1.24 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。2004年,Revollo等<sup>[17]</sup>证明了Nampt是NAD<sup>+</sup>合成中的限速酶,以NAM为底物测得其 $K_m$ 值为 $0.92 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。Burgos等<sup>[18]</sup>在2008年报道了人源的Nampt与ATP的弱耦合现象,ATP的水解使Nampt的催化效率提高了1100倍,底物亲和力显著提升,基于底物NAM测得的 $K_m$ 值为 $0.01 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。2010年,吕小群等<sup>[19]</sup>建立了Nampt/Visfatin酶活性模型,测得Nampt在NAM为底物下的 $K_m$ 值为 $0.16 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。通过对比,本研究*Sulfurovum* sp. FS06-10来源的Nampt基于NAM的 $K_m$ 值与2002年的报道接近,但仍高于历次报道,说明其对底物NAM的亲和力并不具备优势。

#### 2.3.4.2 Tkprs的动力学参数测定

按照方法1.2.4.4,在Tkprs的最适温度和pH条件下,设置不同的底物核糖-5-磷酸(R-5-P)浓度,测定其动力学参数,结果如图7b所示。通过Origin 2019

软件进行曲线拟合并分析,其 $V_{\max}=2.37 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ , $K_m=25.48 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。

2010年,Lucarelli等<sup>[20]</sup>在对*Mycobacterium tuberculosis*来源的Prs进行结构特征研究发现,该酶能被Mg<sup>2+</sup>变构激活,在不添加Mg<sup>2+</sup>与添加5mmol/L的Mg<sup>2+</sup>条件下,其以R-5-P为底物下的 $K_m$ 值分别为 $71.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $70.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。2012年,Zakataeva等<sup>[21]</sup>在对于*Bacillus amyloliquefaciens*来源的野生型及抗反馈抑制突变型Prs的研究中,测定了包括野生型在内的四种Prs基于底物R-5-P的 $K_m$ ,其中野生型的为 $50.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ ,三种突变型D58H、N120S、L135I的分别为 $86.00$ 、 $60.00$ 和 $94.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。2016年,Esipov等<sup>[22]</sup>报道的*Thermus thermophilus* HB27来源基因TT\_C1184和TT\_C1274编码的两种Prs蛋白TthPRPPS1和TthPRPPS2,基于R-5-P底物的 $K_m$ 分别为 $11.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $34.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。Bibi等<sup>[23]</sup>在2016年发表的对*Pyrobaculum calidifontis*来源的Prs的研究,R-5-P下的 $K_m$ 值为 $60.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。2017年Donini等<sup>[24]</sup>对*Mycobacterium smegmatis*来源的Prs的生化 and 结构分析研究,R-5-P下的 $K_m$ 值为 $59.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。除2016年研究中提及的TthPRPPS1的 $K_m$ 值较本研究中的要低,其余均高于本研究水平,证明本研究中*Thermococcus kodakarensis* KOD1来源的Prs对底物核糖-5-磷酸亲和力相对较好,在催化反应中具备优势。

#### 2.3.4.3 Erbks的动力学参数测定

按照方法1.2.4.4,在Erbks的最适温度和pH值条件下,设置不同的底物D-核糖浓度,测定其动力学参数,结果如图7c所示。通过Origin 2019软件进行曲线拟合并分析,其 $V_{\max}=12.58 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ , $K_m=74.13 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。2006年,Chuvikovsky等<sup>[14]</sup>表达纯化了*E. coli*来源的Rbks,其 $K_m$ 值为 $0.28 \text{mmol}/\text{L}$ 。2007年,Ogbunude等<sup>[25]</sup>克隆了来源*Leishmania major*的Rbks基因,并在大肠杆菌中实现表达,其 $K_m$ 值为 $0.30 \text{mmol}/\text{L}$ 。2012年,Li等<sup>[26]</sup>报告了一种来自*Staphylococcus aureus*的Rbks的晶体结构,揭示了单价阳离子激活Rbks的详细机制,其在不添加K<sup>+</sup>与添加100mmol/L的K<sup>+</sup>时 $K_m$ 分别为 $4.66 \text{mmol}/\text{L}$ 及 $2.19 \text{mmol}/\text{L}$ 。2013年,Sato等<sup>[27]</sup>证明了*Thermococcus kodakarensis*中的蛋白TK2285为Rbks家族成员,其对于D-核糖的 $K_m$ 为 $951.00 \text{mmol}/\text{L}$ 。2016年,Riggs等<sup>[28]</sup>在对模式植物拟南芥与人和大肠杆菌来源的Rbks进行序列比对后,筛选出在拟南芥中扮演Rbks角色的AtRBSK蛋白,并测定其动力学参数,其对于D-核糖的 $K_m$ 值为 $150.00 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。本研究选取的*Escherichia coli* K12来源的核糖激酶,相较上述研究

的  $K_m$  值都小, 证明其对核糖的底物亲和力良好, 适合用于催化反应。

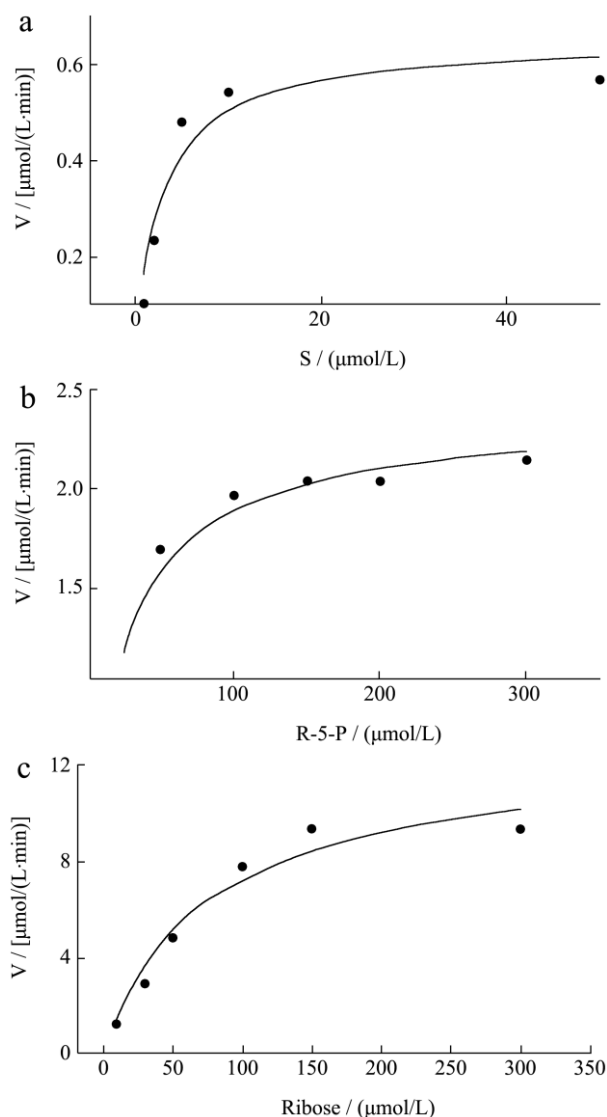


图7 动力学参数分析

Fig.7 The analysis of kinetic parameter

## 2.4 三酶级联催化合成 NMN 体系的优化

### 2.4.1 温度优化

温度会影响催化反应体系中酶的活性。根据前期研究, Sfnampt、Tkprs、Erbks 的最适温度分别为 45 °C、50 °C、37 °C, 根据三酶的最适温度, 设置 35~55 °C 的温度梯度, 通过比较不同温度下 NMN 合成情况的差异, 可确定最佳的催化反应温度。在 pH 值 7.5 条件下反应 2 h 后, 按照方法 1.2.3.2 进行产物 NMN 的荧光检测, 并以 NMN 的最高生成量为 100%, 得到温度和 NMN 相对产量的关系图, 结果如图 8。从结果可以看出, 在温度为 35、37、40 °C 条件下, NMN 的产量均为较高水平, 而 37 °C 条件较 40 °C 条件下产量略高, 可以作为后续催化合成 NMN 的理想温度条件。

当温度升高至 45 °C 时, NMN 的产量已经大幅度下降至 40% 以下, 当温度升高至 50 °C 和 55 °C 时, 其相对产量只有不足 10%。综合之前的热稳定性探究, 推测是体系中的 Sfnampt 在此温度条件下不能保持长时间的活性, 在 2 h 的催化反应中较早出现活性降低的情况, 导致 NMN 的生成较早停止。因此在后续的合成中, 要兼顾长时间合成及酶活性的因素, Sfnampt 的热稳定性不佳是不可忽略的限制因素。

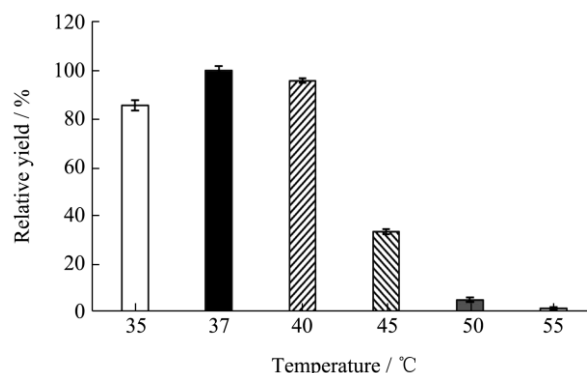


图8 不同温度条件下 NMN 的合成情况

Fig.8 Synthesis of NMN at different temperatures

### 2.4.2 pH 值优化

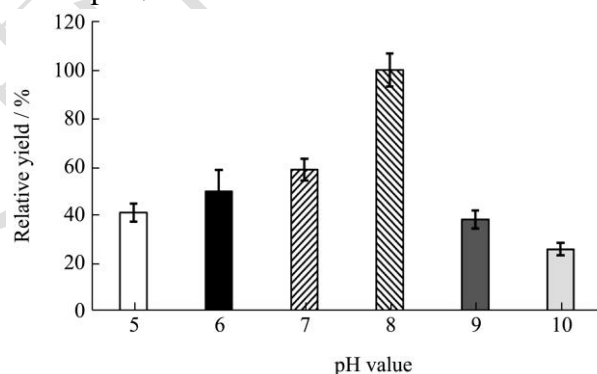


图9 不同 pH 值条件下 NMN 的合成情况

Fig.9 Synthesis of NMN at different pH value

为了探究不同 pH 值条件下 NMN 合成情况的差异, 根据三酶的最适 pH 值分别为 7.5、8.5、5.5, 设置了从 5.0~10.0 的 pH 值梯度, 反应 2 h 后, 按照方法 1.2.3.2 进行产物 NMN 的荧光检测。以 NMN 的最高生成量为 100%, 得到 pH 值和 NMN 相对产量的关系图, 结果如图 9。当 pH 值为 8.0 时, NMN 的相对产量最高; 而当 pH 值为 7.0 时, NMN 的相对产量约为最高值的 60%; 在其余的 pH 值条件下, 其相对产量都低于 60%。因此可知 pH 值 8.0 为较优的 NMN 合成条件。根据三酶的 pH 值与酶活性关系, 在 NMN 的合成中, 当 pH 值为 7.0 时, Erbks 能维持 80% 以上的酶活性, 其限制性因素则更可能是 Sfnampt 与 Tkprs, 因两者在 pH 值 7.0 时酶活性已经降至 40% 以下; 而当 pH 值为 9.0 时, 尽管 Tkprs 与 Erbks 的酶活性能维



持在 60%左右,但 NMN 合成途径的末端酶 Sfnampt 的酶活性却降至 20%左右,成为了 NMN 生成的限制性因素。因此,在弱碱性条件下进行 NMN 的合成能够让三酶都处在较高的酶活性状态,更有利于 NMN 的积累。

### 2.4.3 底物优化

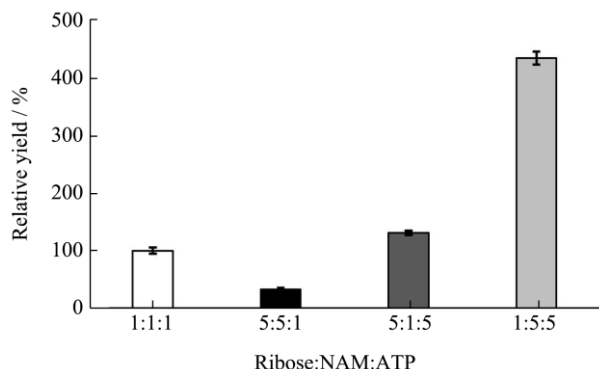


图 10 不同底物配比下 NMN 的合成情况

Fig.10 Synthesis of NMN under different substrate ratios

为了探究不同底物浓度条件下 NMN 合成情况的差异,以便于在合成中提高底物的转化率、减少底物的浪费。NMN 的三酶催化合成中,分别同时提高核糖、NAM、ATP 三种底物中其中两种的浓度为原始浓度的 5 倍,以探究影响反应进行的关键底物。以原始三底物比例 1:1:1 作为对照组,定为 100%,其余为相对对照组的产量,结果如图 10。当同时提高 ATP 和 NAM 的浓度,相对产量提高最明显,为对照组的 4.3 倍;当同时提高 ATP 和核糖的浓度,相对产量则没有明显提升,只达到了对照组的 1.3 倍;而当同时提高核糖和 NAM 的浓度,NMN 的相对产量反而大幅度下降至对照组的 30%。可以知道在 NMN 的催化合成中,当 NAM 或核糖浓度的提高伴随着 ATP 浓度的提高时,有利于 NMN 的产量提高,而不提高 ATP 的浓度仅提高 NAM 和核糖的浓度则不利于 NMN 的积累。在 Ngivprom 等<sup>[29]</sup>利用大肠杆菌从木糖催化合成 NMN 的研究中,发现了提高 D-核糖的加入量 NMN 产量反而下降。由此可知,对于 NMN 的合成,ATP 对于产量的提升较为关键,而反应体系中过高的核糖浓度则可能对 NMN 的合成存在不利影响。推测原因包括如下:①Burgos 等<sup>[18]</sup>报道,在 NAM 与 PRPP 生成 NMN 的反应平衡中,ATP 的水解使 Nampt 的底物亲和力显著增加,化学平衡向产物方向移动,促进了反应的进行。因此,ATP 在合成中既起到了底物的作用,也起到了提高末端酶 Nampt 催化效率的作用。②Zhou 等<sup>[8]</sup>在对 NMN 的酶催化合成体系设计中发现,AMP 和 ATP 在反应中会被迅速消耗,而 NAM 转化为 NMN 的转化率仍较低。这也说明了为何在体系中投入大量

ATP 与 NAM 会提高 NMN 的产量,而提高核糖的量则没有明显的效果。③提高 NAM 的浓度时,高浓度的底物 NAM 也会推进反应平衡朝生成产物的方向移动。

### 2.4.4 酶配比优化

催化反应中,酶的配比可以影响底物的转化率,进而影响产物的积累。在加入反应体系中总酶活不变的情况下,通过提高单酶及双酶的酶活性比例,探究其对催化 NMN 合成的影响。以三酶在体系中加入的酶活性比例 1:1:1 作为对照组,定为 100%,其余为相对对照组的产量,结果如图 11。当只提高其中一种酶的活性比例时,提高 Sfnampt 对 NMN 的产量提升有帮助,其产量相对提升为对照组的 1.3 倍;提高 Tkprs 对 NMN 产量的提升并没有显著影响;而当提高 Erbks 时 NMN 的产量反而下降为对照组的 60%。当同时提高两种酶的活性比例时,同时提高 Sfnampt 与 Tkprs, NMN 的产量提升为对照组的 1.5 倍;同时提高 Sfnampt、Erbks, NMN 的产量基本与对照组持平;而当同时提高 Tkprs 与 Erbks, NMN 的产量却下降至对照组的 56%。从对哺乳动物中 NAD<sup>+</sup>代谢合成调控的研究报道中我们可知, Nampt 是 NAD<sup>+</sup>代谢合成过程中的限速酶<sup>[30]</sup>,这也解释了为何提高 Sfnampt 在催化体系中的总酶活比例有利于 NMN 产量的提升。且在对单酶性质分析时可知, Sfnampt 的底物亲和力相对以往报道中的 Nampt 略显劣势,因此,在 Sfnampt、Tkprs、Erbks 的三酶催化体系中, Sfnampt 为限制性的关键酶。当同时提高 Tkprs 与 Erbks 在体系中的活性比例时,也降低了 Sfnampt 在反应体系中的加入量,因此不利于反应的进行。由底物优化实验可知,提高 ATP 加入量有利于催化反应的进行,也是因为 ATP 水解提高了 Sfnampt 的活性,这证明了 Sfnampt 在反应体系中的重要性。故在后续的催化反应中,应当首要提高 Sfnampt 在催化体系中的总酶活,并可适当提升 Tkprs 的在催化体系中的总酶活,而 Erbks 的总酶活应当在前两者提高的基础上,做适当提高。

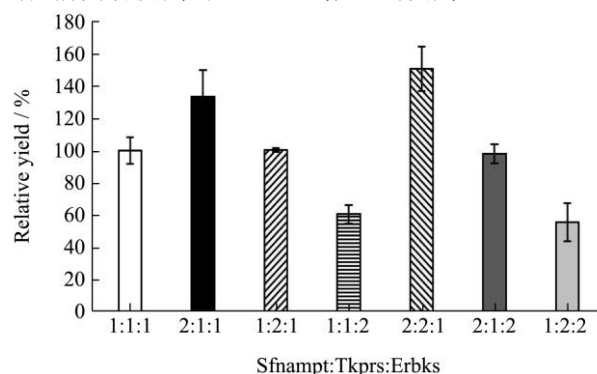


图 11 不同酶配比下 NMN 的合成情况

Fig.11 Synthesis of NMN under different enzyme ratios

### 2.4.5 $Mg^{2+}$ 添加量的优化

金属离子  $Mg^{2+}$  的添加,对反应体系中的 Prs、Rbks 均具有激活作用<sup>[14,20]</sup>,并且 ATP 的作用通常需要  $Mg^{2+}$  的辅助,因此体系中的  $Mg^{2+}$  浓度同样是不可忽略的因素。在反应体系中含有 2 mmol/L 的 ATP、100  $\mu\text{mol/L}$  的核糖及 100  $\mu\text{mol/L}$  的 NAM 时,通过添加不同终浓度的  $Mg^{2+}$ ,以探究其添加量对反应的影响,结果如图 12。当  $Mg^{2+}$  的浓度从 100  $\mu\text{mol/L}$  提升至 2 mmol/L 时, NMN 的相对产量也在提升。而当继续提升  $Mg^{2+}$  时, NMN 的相对产量并没有继续提升,甚至当  $Mg^{2+}$  浓度提升至 10 mmol/L 时,其相对产量有所下降。因此,在反应中,控制  $Mg^{2+}$  的添加量大致与 ATP 的终浓度相近,可能有利于 NMN 的最终积累。

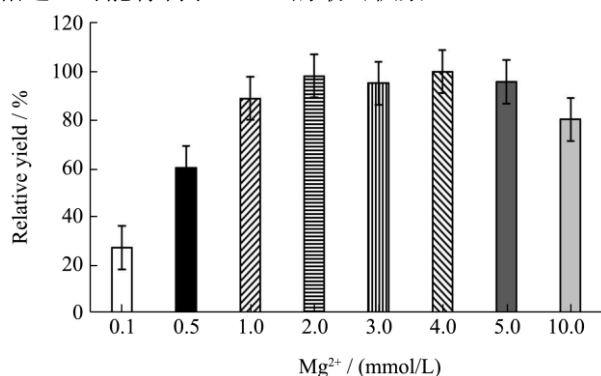


图 12 不同  $Mg^{2+}$  添加量下 NMN 的合成情况

Fig.12 Synthesis of NMN under different concentration of  $Mg^{2+}$

### 2.4.6 三酶催化反应曲线

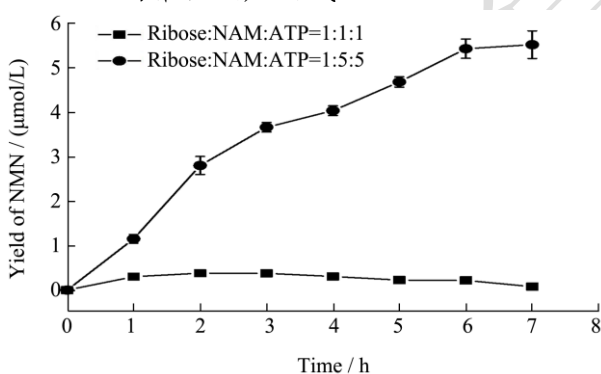


图 13 体系优化前后 NMN 的催化反应曲线

Fig.13 Catalytic reaction curves of NMN before and after system optimization

在对催化反应条件进行初步优化后,参照方法 1.2.5,同时进行未优化与优化条件下的 NMN 催化合成,每隔 1 h 取样并终止反应,保存待检测,结果如图 13。当体系中底物配比为核糖:NAM:ATP=1:5:5,酶配比为 Sfnampt:Tkprs:Erbks=2:1:1 时,在反应 7 h 后,反应基本达到平衡。与未优化前相比, NMN 的产量提高 14 倍,核糖的转化率提高 71 倍。但其转化率仍旧较低,只有约 5.50%,在此转化率下 NMN 产

量约为 5.50  $\mu\text{mol/L}$ 。邦泰生物工程(深圳)有限公司以 NAM、ATP、核糖为原料,在 Nampt、Prs、Rbks 的催化下,当核糖、NAM、ATP 的摩尔比为 1~4:1~4:1 时,其转化率为 80%~100%,当摩尔比为 1.5:1:1.5 时,转化率可达 100%<sup>[31]</sup>。本研究三酶催化体系转化率低,推测原因可能是分泌表达量较低,因此加入反应体系的酶的浓度也不高;并且分泌表达的酶未经纯化直接用于催化反应,其培养基中的杂质可能会影响到催化反应的进行。

## 3 结论

本研究利用大肠杆菌 BL21(DE3)作为出发菌株构建分泌表达菌株,通过信号肽 PelB 的引导,成功分泌表达 *Sulfurovum* sp. FS06-10 来源的 Nampt(Sfnampt)、*Thermococcus kodakarensis* KOD1 来源的 Prs (Tkprs) 及 *Escherichia coli* K12 来源的 Rbks (Erbks),酶活性分别为 1.10、21.11、29.47 U/L。Tkprs、Erbks 与已表征的 Prs、Rbks 相比底物亲和力较高,用于催化合成 NMN 具备较大优势。分泌表达的三酶 Sfnampt、Tkprs、Erbks 可直接用于催化合成 NMN,经催化反应温度、pH 值及底物、酶配比等条件优化,探明了催化反应的较优条件为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 8.0。ATP 和 Sfnampt 分别为体系中的关键底物及关键酶,在体系中的含量变化对 NMN 产量有明显的影 响。经优化后的催化体系进行 7 h 的 NMN 合成,当加入的底物 NAM 及 ATP 终浓度提高 5 倍时, NMN 的产量提高 14 倍,核糖的转化率提高 71 倍。在此水平下 NMN 的产量约为 5.50  $\mu\text{mol/L}$ ,核糖转化率约为 5.50%。

本研究实现了 Sfnampt、Tkprs、Erbks 三酶在大肠杆菌中的分泌表达,简化了酶的下游纯化工 艺,对 NMN 的合成探索具有重要的意义。但比较遗憾的是目前分泌表达所得酶量较低,直接用于催化反应后所得 NMN 与国内外已报道的 NMN 合成水平仍有较大差距,在后续研究中可以在基因层面优化以提高其分泌表达量。目前体系优化依赖于提高 ATP 的添加量,而 ATP 作为三种底物中较为昂贵的底物,提高添加量则会增加工业生产成本,如能在体系中引入 ATP 循环途径应能大大降低成本。

## 参考文献

- [1] Ying W H. NAD(+)/ NADH and NADP(+)/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2008, 10(2): 179-206.
- [2] Hong W, Mo F, Zhang Z, et al. Nicotinamide mononucleotide:

- A promising molecule for therapy of diverse diseases by targeting NAD<sup>+</sup> metabolism [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 246.
- [3] Poddar S K, Sifat A E, Haque S, et al. Nicotinamide mononucleotide: Exploration of diverse therapeutic applications of a potential molecule [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(1): 34.
- [4] Chandrasekaran K, Choi J, Arvas M I, et al. Nicotinamide mononucleotide administration prevents experimental diabetes-induced cognitive impairment and loss of hippocampal neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3756.
- [5] Song J, Li J, Yang F, et al. Nicotinamide mononucleotide promotes osteogenesis and reduces adipogenesis by regulating mesenchymal stromal cells via the SIRT1 pathway in aged bone marrow [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5): 336.
- [6] Kiss T, Balasubramanian P, Valcarcel-Ares M N, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) treatment attenuates oxidative stress and rescues angiogenic capacity in aged cerebrovascular endothelial cells: a potential mechanism for the prevention of vascular cognitive impairment [J]. *Geroscience*, 2019, 41(5): 619-30.
- [7] 任丽梅, 王晓茹, 祁永浩, 等.  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸功能与合成研究进展[J]. *生物资源*, 2021, 43(2): 127-32.
- [8] Zhou C, Feng J, Wang J, et al. Design of an *in vitro* multienzyme cascade system for the biosynthesis of nicotinamide mononucleotide [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2022, 12(4): 1080-1091.
- [9] Kleiner-Grote G R M, Risse J M, Friehs K. Secretion of recombinant proteins from *E. coli* [J]. *Eng Life Sci*, 2018, 18(8): 532-550.
- [10] Choi J H, Lee S Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(5): 625-635.
- [11] Mergulhao F J, Summers D K, Monteiro G A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(3): 177-202.
- [12] Zhang R Y, Qin Y, Lv X Q, et al. A fluorometric assay for high-throughput screening targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase [J]. *Anal Biochem*, 2011, 412(1): 18-25.
- [13] 廖一波, 吴旻晖, 梁书利, 等. 烟酰胺磷酸核糖转移酶在大肠杆菌中的表达及催化合成烟酰胺单核苷酸[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(2): 87-93, 182.
- [14] Chuvikovskiy D V, Esipov R S, Skoblov Y S, et al. Ribokinase from *E. coli*: expression, purification, and substrate specificity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(18): 6327-6332.
- [15] Lin L F, Lan S J, Richardson A H, et al. Pyridine nucleotide synthesis. Purification of nicotinamide mononucleotide pyrophosphorylase from rat erythrocytes [J]. *J Biol Chem*, 1972, 247(24): 8016.
- [16] Rongvaux A, Shea R J, Mulks M H, et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis [J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(11): 3225-3234.
- [17] Revollo J R, Grimm A A, Imai S I. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(49): 50754-50763.
- [18] Burgos E S, Schramm V L. Weak coupling of ATP hydrolysis to the chemical equilibrium of human nicotinamide phosphoribosyltransferase [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(42): 11086-11096.
- [19] 吕小群. Nampt/Visfatin 酶活性筛选模型的建立[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [20] Lucarelli A P, Buroni S, Pasca M R, et al. Mycobacterium tuberculosis phosphoribosylpyrophosphate synthetase: biochemical features of a crucial enzyme for mycobacterial cell wall biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15494.
- [21] Zakataeva N P, Romanenkov D V, Skripnikova V S, et al. Wild-type and feedback-resistant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from *Bacillus amyloliquefaciens*: purification, characterization, and application to increase purine nucleoside production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(5): 2023-2033.
- [22] Esipov R S, Abramchik Y A, Fateev I V, et al. Recombinant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from *Thermus thermophilus* HB27: Isolation and properties [J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, 42(5): 512-521.
- [23] Bibi T, Perveen S, Aziz I, et al. Pcal\_1127, a highly stable and efficient ribose-5-phosphate pyrophosphokinase from *Pyrobaculum calidifontis* [J]. *Extremophiles*, 2016, 20(6): 821-830.
- [24] Donini S, Garavaglia S, Ferraris D M, et al. Biochemical and structural investigations on phosphoribosylpyrophosphate synthetase from *Mycobacterium smegmatis* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175815.

- [25] Ogbunude P O, Lamour N, Barrett M P. Molecular cloning, expression and characterization of ribokinase of *Leishmania major* [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007, 39(6): 462-466.
- [26] Li J, Wang C, Wu Y, et al. Crystal structure of Sa239 reveals the structural basis for the activation of ribokinase by monovalent cations [J]. J Struct Biol, 2012, 177(2): 578-582.
- [27] Sato T, Fujihashi M, Miyamoto Y, et al. An uncharacterized member of the ribokinase family in *Thermococcus kodakarensis* exhibits myo-inositol kinase activity [J]. J Biol Chem, 2013, 288(29): 20856-20867.
- [28] Riggs J W, Rockwell N C, Cavales P C, et al. Identification of the plant ribokinase and discovery of a role for *Arabidopsis* ribokinase in nucleoside metabolism [J]. J Biol Chem, 2016, 291(43): 22572-22582.
- [29] Ngivprom U, Lasin P, Khunnonkwao P, et al. Synthesis of nicotinamide mononucleotide from xylose via coupling engineered *Escherichia coli* and a biocatalytic cascade [J]. Chembiochem, 2022: e202200071.
- [30] Revollo J R, Grimm A A, Imai S I. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2007, 23(2): 164-170.
- [31] 傅荣昭,张琦.一种制备烟酰胺单核苷酸的方法:中国, CN107889504B [P]. 2017-11-02.