

· 综 述 ·

β -烟酰胺单核苷酸的生理活性与合成研究进展

陈宇娴¹, 周楚然¹, 黄建忠¹, 陶勇², 柯崇榕^{1*}, 杨欣伟^{1*}

1 福建师范大学生命科学学院 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心 工业微生物教育部工程中心, 福建 福州 350108

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

陈宇娴, 周楚然, 黄建忠, 陶勇, 柯崇榕, 杨欣伟. β -烟酰胺单核苷酸的生理活性与合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 516-536.

CHEN Yuxian, ZHOU Churan, HUANG Jianzhong, TAO Yong, KE Chongrong, YANG Xinwei. Advances in physiological activities and synthesis of β -nicotinamide mononucleotide[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 516-536.

摘 要: 烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)作为辅酶I (即 NAD^+)的关键前体之一, 广泛存在于多种生物中, β 异构体为其活性形式。研究表明 β -NMN 在多种生理代谢过程中起关键作用, 作为抗衰老、改善退行性疾病和代谢性疾病的潜在活性物质, β -NMN 的应用价值被深度发掘, 实现规模化生产迫在眉睫。生物合成法因其具有高立体结构选择性、反应条件温和、副产物少等优点, 成为合成 β -NMN 的首选方法。本文综述了 β -NMN 的生理活性、化学合成法和生物合成法, 其中重点介绍生物合成法中涉及到的代谢途径, 旨在探索利用合成生物学优化 β -NMN 生产策略的潜力, 为 β -NMN 的代谢途径研究与高效生产提供理论基础。

关键词: β -烟酰胺单核苷酸; 烟酰胺核糖; 磷酸核糖焦磷酸; 化学合成; 生物合成

Advances in physiological activities and synthesis of β -nicotinamide mononucleotide

CHEN Yuxian¹, ZHOU Churan¹, HUANG Jianzhong¹, TAO Yong², KE Chongrong^{1*}, YANG Xinwei^{1*}

1 Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, National and Local United Engineering Research Center of Industrial Microbiology and Fermentation Technology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Nicotinamide mononucleotide (NMN) is one of the key precursors of coenzyme I

资助项目: 福建省自然科学基金(2021J01170, 2021J01172)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01170, 2021J01172).

*Corresponding authors. E-mail: KE Chongrong, kechr@fjnu.edu.cn; YANG Xinwei, npkace@fjnu.edu.cn

Received: 2022-11-05; Accepted: 2022-12-29; Published online: 2023-01-11

(NAD^+). NMN exists widely in a variety of organisms, and β isomer is its active form. Studies have shown that β -NMN plays a key role in a variety of physiological and metabolic processes. As a potential active substance in anti-aging and improving degenerative and metabolic diseases, the application value of β -NMN has been deeply explored, and it is imminent to achieve large-scale production. Biosynthesis has become the preferred method to synthesize β -NMN because of its high stereoselectivity, mild reaction conditions, and fewer by-products. This paper reviews the physiological activity, chemical synthesis as well as biosynthesis of β -NMN, highlighting the metabolic pathways involved in biosynthesis. This review aims to explore the potential of improving the production strategy of β -NMN by using synthetic biology and provide a theoretical basis for the research of metabolic pathways as well as efficient production of β -NMN.

Keywords: β -nicotinamide mononucleotide; nicotinamide riboside; 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; chemical synthesis; biosynthesis

烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)属于维生素 B 族衍生物,是一种天然存在的生物活性核苷酸^[1],分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}$, 分子量为 334.221 g/mol, 是辅酶I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)的关键前体之一,富含于蔬菜、真菌、肉类和虾等食物中^[2],并且在毛豆、牛油果中尤为丰富^[3]。NMN 有 α 和 β 两种异构体,其中 β 异构体为 NMN 的活性形式(以下的 β -NMN 简称为 NMN),结构如图 1 所示。

NMN 与 NAD^+ 在多种细胞代谢的过程中扮演着关键角色,大量研究证明,包括脑组织在内, NAD^+ 分布于所有活细胞中,介导上千种生物催化过程,包括线粒体功能、能量代谢、细胞衰老和死亡等^[4]。人体内主要通过以 NMN 为

重要中间产物的补救合成途径补充 85% 的 NAD^+ ^[5-8], 维持随年龄而降低的 NAD^+ 水平^[9]。NMN 能被迅速吸收进入血液和组织中^[10], 胞外的 NMN 可通过 3 种方式进入细胞(图 2): ① NMN 通过 ADP-核糖基环化酶 CD73 (cyclic ADP-ribose synthases, including CD73)去磷酸化为烟酰胺核糖(nicotinamide riboside, NR)后被转运入胞内, NR 在烟酰胺核糖激酶(nicotinamide riboside kinase, NRK)的作用下会重新磷酸化生成 NMN^[11-12]; ② 在 Na^+ 的帮助下, 通过烟酰胺单核苷酸转运蛋白(nicotinamide mononucleotide transporter, SLC12A8)将 NMN 直接运输到细胞中^[13]; ③ 通过 ADP-核糖基环化酶 CD38 (cyclic ADP-ribose synthases, including CD38)转化、食物摄入与机体内消耗 NAD^+ 的酶促反应(如涉及

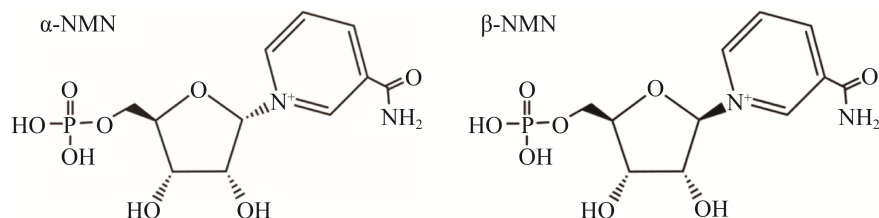


图 1 烟酰胺单核苷酸的分子结构式

Figure 1 Molecular structures of NMN.

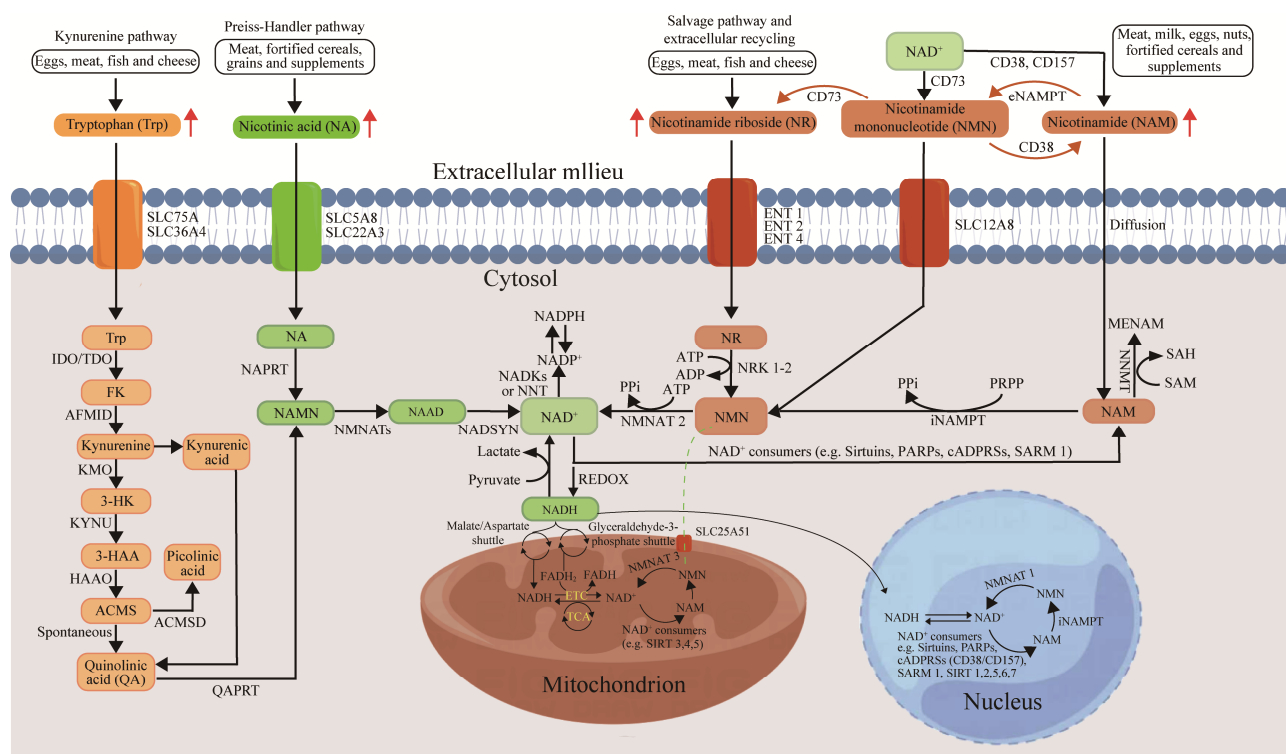


图 2 人体内 NMN 与 NAD⁺ 的主要代谢途径 NAD⁺ 水平由 3 个独立的生物合成途径维持。以下为关键酶和物质：色氨酸(Trp)；吲哚胺 2,3-双加氧酶(IDO)；色氨酸 2,3-双加氧酶(TDO)；N-甲酰基犬尿氨酸(FK)；犬尿氨酸甲酰胺酶(AFMID)；犬尿氨酸 3-单加氧酶(KMO)；3-羟基犬尿氨酸(3-HK)；犬尿氨酸酶(KYNU)；3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)；3-羟基邻氨基苯甲酸加氧酶(HAAO)； α -氨基- β -羧基粘康酸- ϵ -半醛(ACMS)； α -氨基- β -羧基粘康酸- ϵ -半醛脱羧酶(ACMSD)；喹啉酸(QA)；喹啉酸磷酸核糖转移酶(QAPRT)；烟酸(NA)；烟酸磷酸核糖转移酶(NAPRT)；烟酸单核苷酸(NAMN)；烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶(NMNATs)；烟酸腺嘌呤二核苷酸(NAAD)；NAD⁺合成酶(NADSYN)；烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)；多聚 ADP 核糖聚合酶(PARPs)；烟酰胺单核苷酸转运蛋白(SLC12A8)；ADP-核糖基环化酶(包括 CD38、CD73、CD157)；胞内烟酰胺磷酸核糖转移酶(iNAMPT)；胞外烟酰胺磷酸核糖转移酶(eNAMPT)；烟酰胺 N-甲基转移酶(NNMT)；烟酰胺单核苷酸(NMN)；烟酰胺(NAM)；烟酰胺核糖(NR)；烟酰胺核糖激酶 1-2 (NRK 1-2)；电子传递链(ETC)

Figure 2 Main metabolic pathways of NMN and NAD⁺ in human body. NAD⁺ levels are maintained by three independent biosynthetic pathways. The following are key enzymes and substances: Tryptophan (Trp); Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO); Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO); N-formylkynurenine (FK); Arylformamidase (AFMID); Kynurenine 3-monooxygenase (KMO); 3-hydroxykynurenine (3-HK); Kynureninase (KYNU); 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA); 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase (HAAO); α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde (ACMS); α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD); Quinolinic acid (QA); Quinolinic acid phosphoribosyltransferase (QAPRT); Nicotinic acid (NA); Nicotinic acid phosphoribosyltransferase (NAPRT); Nicotinic acid mononucleotide (NAMN); Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferases (NMNATs); Nicotinic acid adenine dinucleotide (NAAD); NAD⁺ synthetase (NADSYN); Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺); Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs); Nicotinamide mononucleotide transporter (SLC12A8); Cyclic ADP-ribose synthases (including CD38, CD73, CD157); Intracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (iNAMPT); Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT); Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT); Nicotinamide mononucleotide (NMN); Nicotinamide (NAM); Nicotinamide riboside (NR); Nicotinamide riboside kinase 1-2 (NRK 1-2); Electron transport chain (ETC).

氨肽酶, III型蛋白赖氨酸脱乙酰酶和多聚 ADP 核糖聚合酶等酶促反应)皆可补充细胞内的烟酰胺(nicotinamide, NAM)^[14-15], 在烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyltransferase, Nampt)的作用下可直接转化为 NMN^[16-17]。随后 NMN 与三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合, 在烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶(nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase, NMNAT)的介导下结合生成 NAD^{+} ^[1,5]。除了 NMN 补救合成途径, 从色氨酸(tryptophan, Trp)开始的从头合成途径与由烟酸(nicotinic acid, NA)开始合成的 Preiss-Handler 途径也可补充 NAD^{+} 。

1 NMN 的生理活性与安全性

通过调节生物体内的 NMN 与 NAD^{+} 水平, 可以在抗衰老^[5,18-19]、改善退行性疾病^[20-21]和代谢性疾病^[1,22-23]等方面起重要作用。最近 NMN 以抗衰老、延长寿命的潜力为人熟知^[24], Gomes 等^[25]发现补充 NMN 使小鼠体内 NAD^{+} 含量增加, 补充 7 d 就能够将 22 个月大的小鼠的线粒体稳态和肌肉功能等关键生化指标恢复到与 6 个月大的小鼠相似的水平; 同时 NMN 能够改善或逆转与衰老相关的线粒体功能障碍^[26-27]; 590 个在老化的神经血管中出现差异表达的基因, 204 个在 NMN 作用下恢复表达水平^[28]。此外, NMN 对退行性疾病具有良好的治疗和修复作用, Wang 等^[4]发现 NMN 使淀粉样蛋白- β (amyloid- β , A β)寡聚体诱导的细胞死亡数量减少 65% (剂量 500 mg/kg, 腹腔内), 通过改善神经元活力、改善能量代谢和减少活性氧积累, 从而阻止阿尔茨海默氏症(Alzheimer's disease, AD)的恶化; Yao 等和邓军等发现 NMN 可抑制凋亡信号的关键因素 C-Jun 氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK), 能够显著降低 A β 寡聚体生成,

逆转 AD 小鼠的认知障碍^[29-30]。在改善代谢性疾病方面, Uddin 等^[31]发现, NMN 可以影响肌肉、肝脏等部位的 NAD^{+} 水平, 改善葡萄糖耐受量、增加血浆中的胰岛素; Yoshino 等^[32]连续 7 d 和 10 d 分别向雌性和雄性糖尿病小鼠注射 NMN (剂量 500 mg/kg, 腹腔内), 结果证明小鼠的胰岛素不耐受性均有显著改善, 雌性小鼠改善更加明显。长时间在啮齿动物中进行的实验结果表明, 在正常和病理生理条件下, 进行系统性 NMN 给药能够有效增强各种外周组织中 NAD^{+} 生物合成, 包括脂肪组织^[33]、心脏^[34-36]、肾脏^[37]、眼睛^[38]和血管^[39]等。以上结果为进一步研究 NMN 的生理活性奠定基础, 并影响 NMN 的医疗使用和发展(图 3)。

随着对 NMN 应用价值的深度发掘, NMN 的安全性也受到了极大关注, 越来越多 NMN 的相关临床试验已经获得批准(如 NCT03151239、UMIN000021309、UMIN000030609、UMIN000036321 和 UMIN000025739 等), 将 NMN 用于治疗各种疾病^[40]。Caton 等^[41]的研究表明, 小鼠长期(12个月)口服 NMN (剂量 300 mg/kg), 具有良好的安全性和耐受性。Irie 等^[42]在口服 NMN 第一阶段 I 期临床试验表明, NMN 在人类中具有良好的耐受性, 不会引起脸红、胃部以及肠道不适等副作用; Igarashi 等^[43]的 II 期临床试验表明, 老年男性持续服用 6 周或 12 周 NMN (剂量 250 mg/d), 未出现任何不良反应, 血液学、肝功能、肾功能指标一切正常; Altay 等的 III 期临床试验结果表明, 由 NAD^{+} 前体和数种其他物质组成的鸡尾酒套餐, 能使新冠患者的恢复速度提升 40%^[44]; 多项临床结果从侧面进一步证明了 NMN 是一种适合人类使用的安全药物^[1]。2020 年, 日本厚生劳动省批准 NMN 用于食品生产^[45]。2022 年, 国家药品监督管理局也陆续批准多项 NMN 化妆品新原料

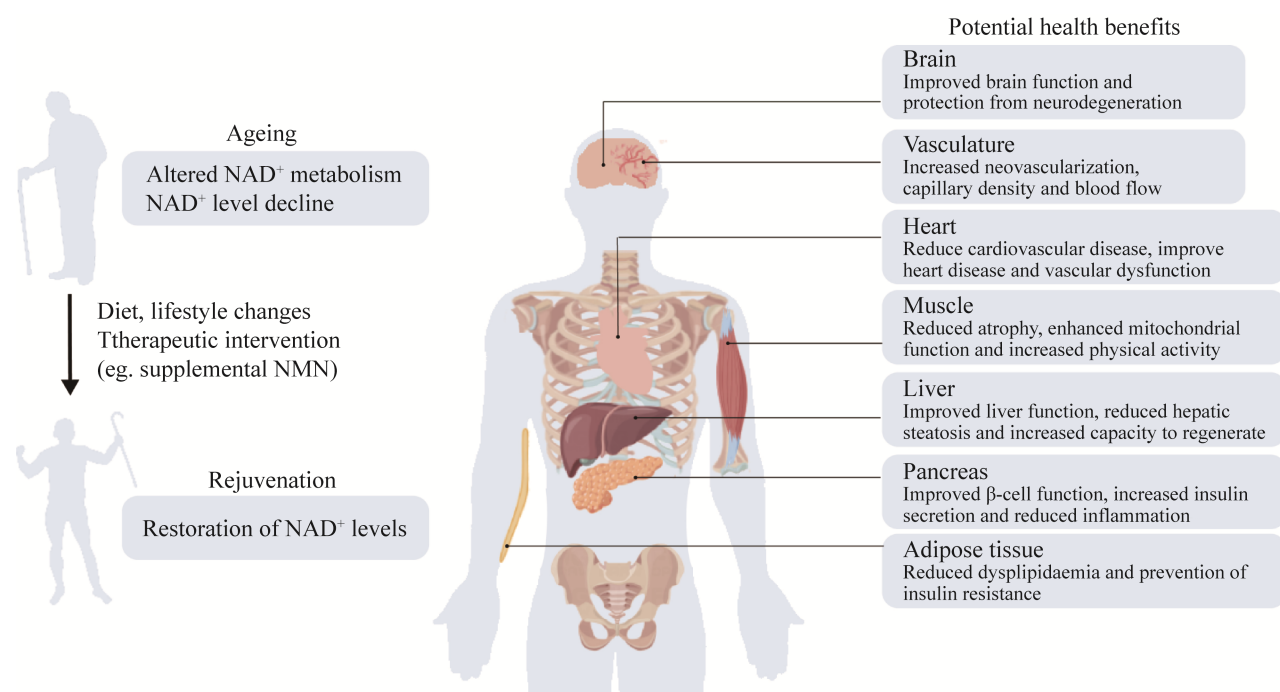


图3 NMN 和 NAD^+ 调节的治疗性前景

Figure 3 Prospects for therapeutic NMN and NAD^+ modulation.

备案。NMN 的临床试验结果出炉与相关政策开放，使 NMN 的高效制备途径引起广泛关注，实现 NMN 规模化生产迫在眉睫。目前，制备 NMN 的方法主要可以分为化学合成法及生物合成法 2 类。

2 NMN 的化学合成法

化学合成法实现 NMN 规模化生产的时间较早，2010 年之前，NMN 大部分来源于化学合成法^[45]，其中主要以一磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)、四乙酰核糖、NAM 等作为原料通过不同的合成步骤完成。

早在 1980 年，Walt 等报道了由 AMP 生成 NAD^+ 的半化学合成方法，其中就包括了由 AMP 合成关键中间体 NMN 的步骤。首先，酸催化 AMP 水解后调 pH，得到 5-磷酸核糖(ribose 5-phosphate, R-5-P)；其次，用无水氨处理无水

乙二醇中的 R-5-P，得到核糖胺-5-磷酸溶液(ribosamine 5-phosphate, RA-5-P)；然后将 RA-5-P 与 1-(2,4-二硝基苯基)-3-氨基甲酰-氯化吡啶[1-(2,4-dinitrophenyl)-3-carbamoylpyridinium sodium chloride, NDC]缩合后即可获得 NMN (以 R-5-P 为基准计算产率约为 25%)^[46-47]。1984 年，Walt 等同样使用 AMP 作为原料合成 NMN，使用 10 mol/L 的氢氧化钠(sodium hydroxide, NaOH)调至弱碱性后，在无水条件下经氨气(ammonia, NH_3)处理，再与 NDC 反应生成 NMN，虽然减少了酸化水解 AMP 的过程，但是最终产物含有部分 α -NMN ($\alpha:\beta=2:3$)，存在手性异构体^[2,48]，以上方法虽然收率较低，但为后续 NMN 的化学合成法提供了可借鉴的部分(图 4)。

此后，以四乙酰核糖为原料制备 NMN 的方法被研发，并且陆续经过优化(图 5)。1999 年，Lee 等将四乙酰核糖与溴化氢(hydrogen bromide,

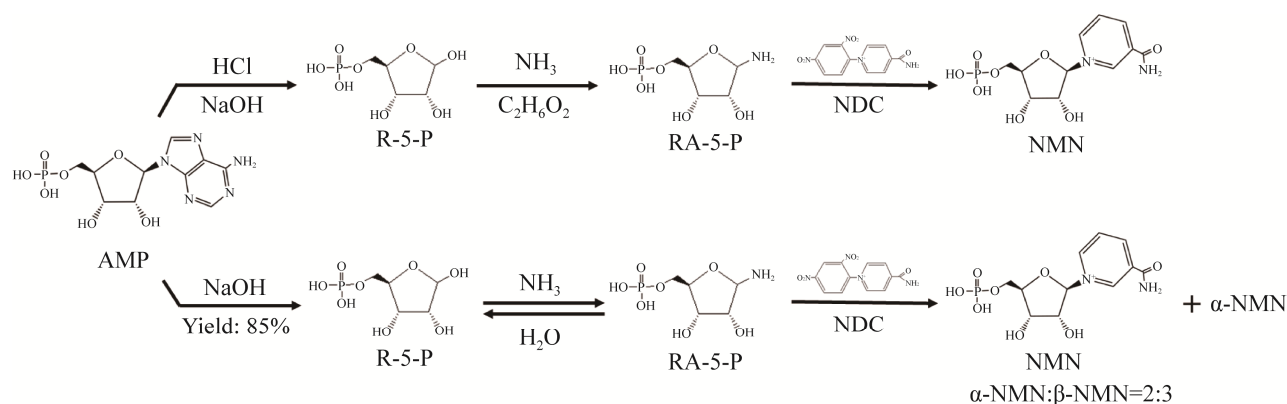


图4 以AMP为底物化学合成NMN 以下为关键物质: 一磷酸腺苷(AMP); 氯化氢(HCl); 氢氧化钠(NaOH); 氨气(NH_3); 乙二醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$); 5-磷酸核糖(R-5-P); 核糖胺-5-磷酸(RA-5-P); 烟酰胺单核苷酸(NMN); 1-(2,4-二硝基苯基)-3-氨基甲酰-氯化吡啶(NDC)

Figure 4 Chemical synthesis of NMN with AMP as substrate. The following are key substances: Adenosine monophosphate (AMP); Hydrogen chloride (HCl); Sodium hydroxide (NaOH); Ammonia (NH_3); Ethylene glycol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$); Ribose 5-phosphate (R-5-P); Ribosamine 5-phosphate (RA-5-P); Nicotinamide mononucleotide (NMN); 1-(2,4-dinitrophenyl)-3-carbamoylpyridinium sodium chloride (NDC).

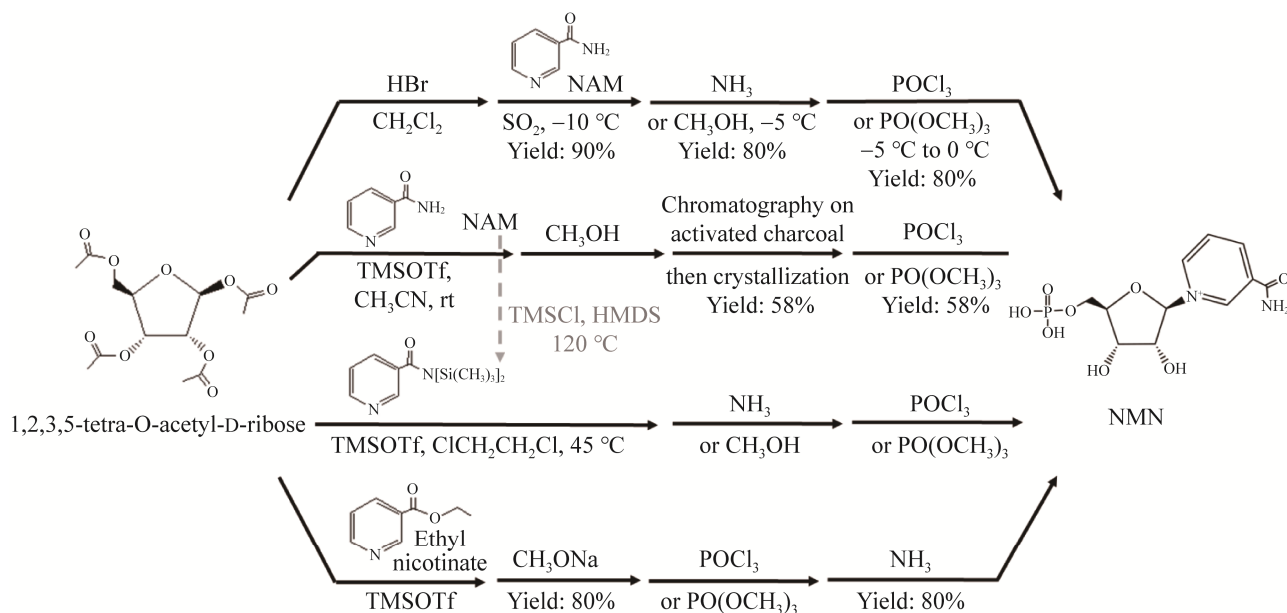


图5 以四乙酰核糖为底物化学合成NMN 以下为关键物质: 溴化氢(HBr); 二氧化硫(SO_2); 甲醇(CH_3OH); 1,1,1,3,3,3-六甲基二硅氮烷(HMDS); 三甲基氯硅烷(TMScI); 三氟甲磺酸三甲基硅酯(TMSOTf); 三氯氧磷(POCl_3); 磷酸三甲酯[$\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$]; 烟酰胺单核苷酸(NMN); 烟酰胺(NAM)

Figure 5 Chemical synthesis of NMN with 1,2,3,5-tetra-O-acetyl-D-ribose as substrate. The following are key substances: Hydrogen bromide (HBr); Sulfur dioxide (SO_2); Methanol (CH_3OH); 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS); Chlorotrimethylsilane (TMScI); Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf); Phosphorus oxychloride (POCl_3); Trimethyl phosphate ($\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$); Nicotinamide mononucleotide (NMN); Nicotinamide (NAM).

HBr) 进行溴代反应后得到溴代乙酰核糖 ($\alpha:\beta=1:1.5$), 再与 NAM 发生缩合反应取代溴基生成核苷, 后续使用 NH_3 脱去乙酰基, 最终使用三氯氧磷/磷酸三甲酯 [phosphorus oxychloride/trimethyl phosphate, $\text{POCl}_3/\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$] 进行酸化, 经树脂层析分离纯化可得 NMN, 以液态二氧化硫 (sulfur dioxide, SO_2) 作糖苷化溶剂时, NMN 的产率达到 80%。该路线的立体选择性强, 能够去除较多 α -NMN, 纯度约为 97%^[49], 使用 NH_3 脱乙酰基更温和有效, 提高了原子经济性; 但溴代乙酰核糖不稳定, 且反应所需溶剂为液态 SO_2 , 对反应仪器要求较高。

在此基础上, 2002 年, Tanimori 等以四乙酰核糖与 NAM 为原料, 在三氟甲磺酸三甲基硅酯 (trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate, TMSOTf) 的催化下缩合得到三乙酰基烟酰胺核苷三氟甲磺酸盐, 用甲醇 (methanol, CH_3OH) 代替碱脱去乙酰基后, 使用活性炭进行色谱分离后重结晶得到烟酰胺核苷盐, 再经 $\text{POCl}_3/\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ 磷酸化后可得 NMN, 产率达到 58%。该方法避免了 HBr 和 SO_2 的使用, 但同时产物被消旋, 最终 α 异构体约为 13%, 且 2 种异构体分离困难, 为工业化生产带来一定困难^[50-51]。2004 年, Franchetti 等改进 TMSOTf 催化缩合法, 先使用硅烷化试剂 [如六甲基二硅氮烷 (1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane, HMDS)、三甲基氯硅烷 (chlorotrimethylsilane, TMSCl) 等] 对 NAM 进行烷

化保护后, 蒸馏出多余的硅烷化试剂, 再与四乙酰核糖进行 TMSOTf 催化缩合, 用 $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 进行脱保护后, 经过 $\text{POCl}_3/\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ 磷酸化直接生成 NMN, 实现 NMN 的立体选择性合成, 但烷化反应操作要求绝对无水, 条件较为苛刻^[52-54]。2018 年, 魏霞蔚等对 TMSOTf 催化缩合法进行再次改进, 以四乙酰核糖与烟酸乙酯为原料, 在 TMSOTf 催化下发生缩合反应后得到含有烟酸乙酯三乙酰核苷溶液; 经有机碱 (如甲醇钠、乙醇钠、异丙醇钠等) 处理后去乙酰基得到烟酸乙酯核苷盐; 经过 $\text{POCl}_3/\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ 磷酸化后得到 5'-烟酸乙酯单核苷酸溶液; 通入 NH_3 进行氨解可得 NMN 粗品, 该方法总收率约为 64%, 最终 NMN 纯度大于 97%。中间体无须纯化, 具有原料易得、易放大、收率高等优点, 适用于工业化批量生产, 但该方法后续仍需使用离子交换树脂进行精制纯化^[55], 并且 TMSOTf 催化剂价格昂贵, 增加原料成本。

除了以上几种主要方法, 按照原料保护基团的种类区分, 还可以通过三苯甲酰基- β -D-核糖^[56]、2,2-二甲氧基丙烷^[57]与 NR^[58]等为原料来制备 NMN (表 1)。化学合成法存在手性异构体分离困难的问题, 同时制备过程中使用了有机溶剂, 存在化学残留风险, 带来环境污染, 不符合绿色生产的要求, 因此, 生物合成法制备 NMN 已经成为当前的研究热点^[45]。

表 1 使用不同化学法生产 NMN 的比较

Table 1 Comparison of NMN production using different chemical methods

Substrates	Time	Conversion (%)	Steps	References
AMP	1980	25	3	[46]
AMP	1984	NA	3	[48]
1,2,3,5-tetra-O-acetyl-D-ribose and NAM	1999	80	4	[49]
1,2,3,5-tetra-O-acetyl-D-ribose and NAM	2002	58	4	[50-51]
1,2,3,5-tetra-O-acetyl-D-ribose and NAM	2004	NA	3	[52]
1,2,3,5-tetra-O-acetyl-D-ribose and ethyl nicotinate	2018	NA	4	[55]

NA: Not available.

3 NMN 的生物合成法

与化学合成法相比,生物合成法具有高立体结构选择性,反应条件温和、副产物更少、产品纯度更高等优点,因其不含有机溶剂残留与手性问题,且制备的 NMN 与机体内的构型相同,成为目前 NMN 绿色环保的制备方法。目前 NMN 的生物合成制备方法主要包括以下 2 种:(1) 生物催化法(即酶催化法/全细胞催化法);(2) 微生物发酵法;具体合成途径如下。

3.1 生物催化法

2016 年以前,生物催化法合成 NMN 在研发的同时不断完成工业化,NMN 原料售价可控制到 1.5–2.0 万元/kg 以下。2016 年以后,随着 NMN 代谢途径的深入研究以及代谢工程、酶工程技术的飞速发展,生物催化法已经成为 NMN 最主要、最有前景的规模化生产方案,目前售价已经降低至千元级别^[45],因此本文也主要聚焦在近年研究新进展。

根据提供核糖基与烟酰胺基的核心底物不同,目前生物催化法主要分为 2 种:第一种是以磷酸核糖焦磷酸(5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, PRPP)和 NAM 为核心底物,搭配关键酶 Nampt 合成 NMN;另一种是以 NR 为核心底物,以 NRK 为关键酶,可与异源表达的多种 PRPP 与 NR 生物合成途径相结合。此外,还有其他特殊的方法,如 1974 年,Jeck 等以二磷酸吡啶核苷酸为原料,在焦磷酸化酶的催化水解作用下生成 NMN 等^[59]。生物催化法可高效生产 NMN,在反应过程中所用催化酶常进行固定化,使其成为固定化酶(或者固定化细胞),以此达循环利用的目的,减少成本。

3.1.1 生物催化法——以 PRPP 和 NAM 为核心底物

早在 1957 年,Preiss 等在人的红细胞提取

物中合成 PRPP,并且以 PRPP 和 NAM 为底物,在红细胞提取物中的酶催化下生成 NMN^[60],此方法虽然转化率较低,但是揭示了 NMN 的主要生物合成途径:1 分子的 PRPP 与 1 分子的 NAM 在 Nampt 的催化作用下,生成 1 分子 NMN 和 1 分子焦磷酸盐(inorganic pyrophosphate, PPI)。研究证明 Nampt 是生物合成途径中的限速酶^[61–62],而具有高酶活的 Nampt 更适用于 NMN 的工业化生产,可从不同来源中筛选出酶学性质优良的 Nampt。Shoji 等的研究比较了来自哺乳动物和细菌的 10 种 Nampt 在大肠杆菌中的异源表达情况,其中来自松树噬几丁质菌(*Chitinophaga pinensis*)的 Nampt (即 CP Nampt)在大肠杆菌中表达效果最佳,酶活为来源于希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*)的 2.4 倍^[63]。廖一波等经过同源建模和底物 NAM 分子对接等方式评估后,选择在大肠杆菌中过表达红色稍栖热菌(*Meiothermus ruber*)来源的 Nampt,以 PRPP 和 NAM 为底物进行酶催化反应 10 min, NMN 产量可达 34 mg/L,生产效率约为 3 mg/(L·min)^[64]。

除直接筛选外,高效稳定催化生产 NMN 的另一策略是对 Nampt 进行改造,而确定晶体结构可能有助于 Nampt 潜在突变位点的确定,以便于完成酶的理性设计与定向进化,例如:位于人类染色体 7q22 上的 Nampt 基因,包含 11 个外显子和 10 个内含子,并产生 2 357 bp 的 cDNA, Nampt 蛋白含有 491 个氨基酸,分子量为 52 kDa^[65–67],X 射线晶体结构表明 Nampt 属于 II 型磷酸核糖基转移酶的二聚体类,二聚体的界面有 2 个活性位点,能够结合 2 个 NMN 分子,其中的保守残基 His247、Asp313 等与产物 NMN 结合位点相邻(图 6),可能对催化活性至关重要^[68]。傅荣昭等通过基因定点突变,以 *M. ruber* DSM 1279 为亲本构建系列高催化活性的 Nampt 突变体,对 F180A、F180W 等多个

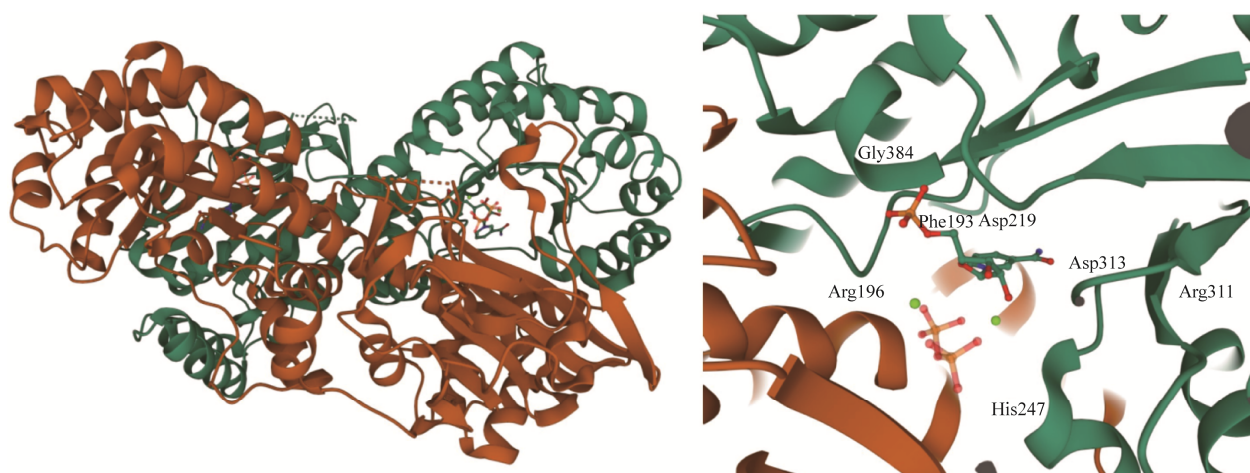


图6 Nampt酶活性的关键部位(来自PDB数据库, PDB代码: 3DHD) 一个单体为绿色, 另一个为橙色, NMN呈绿色棒状

Figure 6 Crucial sites for Nampt enzymatic activity (from Protein Data Bank, PDB code: 3DHD). One monomer is green, the other is orange, and NMN is shown in green stick shape.

位点进行联合突变, 突变体催化活性为野生型的1.2–6.9倍^[69]。此外也有研究指出, 催化过程可能受到不直接参与转化的其他因素影响, 2008年, Burgos等证明ATP水解与NMN合成相关, Nampt催化反应的副产物PPi可促进ATP水解, 增强底物亲和力, 使Nampt催化效率提高约1100倍^[70]。

如上所述, PRPP是合成NMN的关键中间体, 但其无法稳定存在, 因此市场价格较高且来源受限^[71], 但是从简单的起始原料(如核糖、腺苷、木糖和葡萄糖等)合成关键底物PRPP有以下多种途径^[72]。

(1) 以核糖作为核心底物时, 历经3步酶促反应生成NMN(图7的A部分橙色模块): ①核糖以ATP作为磷酸基团供体, 在核糖激酶(ribokinase, RK)催化下生成R-5-P与副产物二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP); ②R-5-P在磷酸核糖焦磷酸激酶(phosphoribosyl pyrophosphate synthetase, PRPPs)的催化下转化为PRPP, 能够将ATP的PPi部分转移到R-5-P

的C1-羟基上, 从而产生PRPP与副产物AMP; ③PRPP与NAM在Nampt的催化作用下结合生成NMN与副产物PPi。Maharjan等共表达Nampt基因与PRPPs1和PRPPs2基因(来源于智人*Homo sapiens*)后, 以1%核糖为核心底物, 以0.5% NAM为共底物, 同时添加1 mmol/L Mg^{2+} 和磷酸盐, 全细胞催化后可得NMN产量为771.5 mg/L^[73]。傅荣昭等以来源于*M. ruber* DSM 1279的Nampt突变体结合外源添加的PRPPs和RK纯化酶, 优化NAM:ATP:核糖=1–4:1:1–4按摩尔比投放时, 转化率最高可达100%, 反应8 h最高可获得8.3 g/L NMN^[74]。竺伟等以R-5-P为核心底物, NAM为共底物, 通过固定化含有Nampt和PRPPs的基因工程菌, 通过全细胞催化合成13.3 g/L NMN, 转化率为99.5%, 其使用的固定化细胞可在一定程度上重复使用, 降低部分生产成本^[75]。

(2) 以腺苷为核心底物合成NMN, 同样可分为3个步骤(图7的B部分蓝色模块): ①腺苷首先通过腺苷激酶(adenosine kinase, Adk)的

催化作用消耗 1 分子 ATP 转化为 AMP 与副产物 ADP^[76];②由腺嘌呤磷酸核糖转移酶(adenine phosphoribosyltransferase, APRT)催化,通过 AMP 和 PPi 合成 PRPP 和腺嘌呤;③合成的 PRPP 与 NAM 在 Nampt 存在下转化为 NMN 与副产物 PPi。周浩使用来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 APRT,以腺苷作为核心底物, NAM 为共底物,在外源添加 Adk、APRT、Nampt 纯化酶的基础上,最终合成 NMN 浓度达 19.67 g/L,最高转化率可达 96%,最终收率约为 65%–70%^[77]。傅荣昭等以 AMP 作为核心底物,仅需添加 APRT 与 Nampt 突变体纯化酶,完成后 2 步反应即可获得 NMN,当 NAM:焦磷酸或其盐:AMP=1–4:1–2:1 按摩尔比投放时,反应 8 h 最高得 32.3 g/L 的 NMN 粗产品溶液^[78]。此外,傅荣昭等还以 AMP 作为核心底物,在 AMP 核苷酶(AMP nucleosidase, Amn)的作用下,消耗 H₂O 合成 R-5-P 和腺嘌呤,再由 PRPPs 和 Nampt 共同作用生成 NMN;当 NAM:ATP:AMP=1–6:1:1–2 按摩尔比投放时,通过分步投料方式,最终可获得 NMN 粗产品溶液 12.9 g/L^[79]。除了以 AMP 作为核心底物外,次黄苷酸(inosine monophosphate, IMP)也可以用作核心底物,通过次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HPRT)产生 PRPP 与副产物次黄嘌呤。比如在 HPRT 和 Nampt 纯化酶的作用下,当 NAM:焦磷酸或其盐:IMP 或其盐=1–3:1–2:1 按摩尔比投放时,摩尔转化率可达 80%–100%,其中特别加入了黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD),使次黄嘌呤降解,反应 8 h 后可获得 14.6 g/L NMN 粗产品溶液^[80]。与以腺苷为原料相比,以 AMP 或 IMP 作为生产原料的成本偏高,在实际生产中相对较少应用。

(3) 以葡萄糖作为核心底物合成 NMN (图 7 的 C 部分绿色模块,红色箭头标注):①葡萄糖

通过磷酸戊糖途径生成 5-磷酸核酮糖(ribulose 5-phosphate, RU5P);②5-磷酸核糖异构酶(ribose 5-phosphate isomerase A, RpiA)催化将 RU5P 变构为 R-5-P,随后过程和以 R-5-P 为原料合成 NMN 相同,即在 PRPPs 和 Nampt 的共同催化作用下结合生成 NMN。Liu 等通过代谢工程设计加强葡萄糖的代谢通量,即引入加强糖摄取 *E. coli* 内源性 *YgcS* 基因表达,敲除 NMN 氨基水解酶(NMN aminohydrolase, PncC)、NMN 腺苷转移酶(NMN adenylyltransferase, NadR)、Amn 的编码基因以增强前体 PRPP 和 ATP 的供应,筛选出来源于贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的高酶活 Nampt 与来源于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的腺苷激酶(adenosine kinase, Ado1),将其高表达后可加强 ATP 循环,以葡萄糖与 NAM 为核心底物,在 37 °C、pH 6.0 和 OD₆₀₀=50 条件下进行全细胞催化, NMN 的最高产量为 496.2 mg/L^[81]。Shoji 等过表达 6 个内源性基因(*pgi*、*zwf*、*pgl*、*gnd*、*rpiA*、*rpiB*)加强了磷酸戊糖途径,在引入内源的 PRPPs 和 CP Nampt 酶的同时加强了 NMN 的转运,即在 *E. coli* 中异源表达并筛选了来源于新洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)的烟酸转运蛋白(niacin transporter, NiaP),来源于蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)的烟酰胺核糖转运蛋白(nicotinamide riboside transporter, PnuC,可有效地将 NMN 从胞内转运到胞外),该工程菌能够以葡萄糖和 NAM 为核心底物反应 8 h 获得 6.79 g/L NMN,以 NAM 计算的转化率为 87%^[63]。

(4) 木糖同样可以作为核心底物用于 NMN 核糖基的建构(图 7 的 C 部分绿色模块):首先在木糖还原酶(xylose reductase, XR)作用下还原木糖为木糖醇,随后在木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase, XDH)作用下氧化形成木酮糖,再经木酮糖激酶(xylulokinase, XK)消耗 1 分子

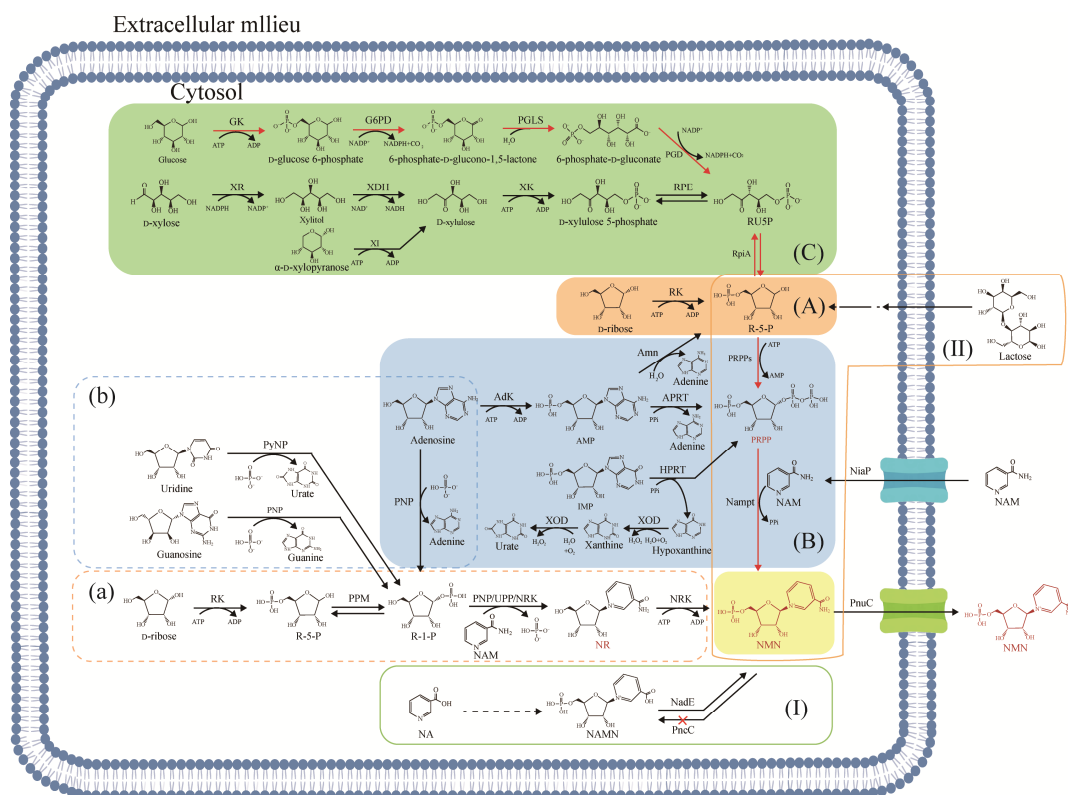


图 7 使用不同底物的 NMN 生物合成途径 以下为关键酶和物质：葡萄糖激酶(GK)；葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)；6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(PGLS)；磷酸葡萄糖酸脱氢酶(PGD)；5-磷酸核糖异构酶(RpiA)；磷酸核糖焦磷酸激酶(PRPPs)；烟酰胺磷酸核糖转移酶(Nampt)；5-磷酸核酮糖(RU5P)；5-磷酸核糖(R-5-P)；磷酸核糖焦磷酸(PRPP)；烟酰胺(NAM)；烟酰胺单核苷酸(NMN)；木糖还原酶(XR)；木糖醇脱氢酶(XDH)；木糖异构酶(XI)；木酮糖激酶(XK)；核酮糖-3-磷酸异构酶(RPE)；核糖激酶(RK)；AMP 核苷酶(Amn)；腺苷激酶(Adk)；腺嘌呤磷酸核糖转移酶(APRT)；三磷酸腺苷(ATP)；二磷酸腺苷(ADP)；一磷酸腺苷(AMP)；焦磷酸盐(PPI)；黄嘌呤氧化酶(XOD)；次黄苷酸(IMP)；次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)；尿苷磷酸酶(UPP)；嘧啶核苷磷酸化酶(PyNP)；嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)；磷酸核糖变位酶(PPM)；核糖-1-磷酸(R-1-P)；烟酰胺核糖(NR)；烟酰胺核糖激酶(NRK)；烟酰胺核糖转运蛋白(PnuC)；烟酸转运蛋白(NiaP)；烟酸(NA)；烟酸单核苷酸(NAMN)；NMN 合成酶(NadE)；NMN 氨基水解酶(PncC)

Figure 7 Biosynthetic pathways of NMN using different substrates. The following are key enzymes and substances: Glucokinase (GK); Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD); 6-phosphogluconolactonase (PGLS); Phosphogluconate dehydrogenase (PGD); Ribose 5-phosphate isomerase A (RpiA); Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (PRPPs); Nicotinamide phosphoribosyl transferase (Nampt); Ribulose 5-phosphate (RU5P); Ribose 5-phosphate (R-5-P); 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP); Nicotinamide (NAM); Nicotinamide mononucleotide (NMN); Xylose reductase (XR); Xylitol dehydrogenase (XDH); Xylose isomerase (XI); Xylulokinase (XK); Ribulose-phosphate 3-epimerase (RPE); ribokinase (RK); AMP nucleosidase (Amn); Adenosine kinase (Adk); Adenine phosphoribosyltransferase (APRT); Adenosine triphosphate (ATP); Adenosine diphosphate (ADP); Adenosine monophosphate (AMP); Inorganic pyrophosphate (PPI); Xanthine oxidase (XOD); Inosine monophosphate (IMP); Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT); Uridine phosphorylase (UPP); Pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNP); Purine nucleoside phosphorylase (PNP); Phosphopentomutase (PPM); Ribose 1-phosphate (R-1-P); Nicotinamide riboside (NR); Nicotinamide riboside kinase (NRK); Nicotinamide riboside transporter (PnuC); Niacin transporter (NiaP); Nicotinic acid (NA); Nicotinic acid mononucleotide (NAMN); NMN synthetase (NadE); NMN aminohydrolase (PncC).

ATP 磷酸化形成木酮糖-5-磷酸,最后在核酮糖-3-磷酸异构酶(ribulose-phosphate 3-epimerase, RPE)的作用下将木酮糖-5-磷酸变构为 RU5P,由此进入磷酸戊糖途径,进而在 RpiA 的变构作用下将 RU5P 形成 R-5-P,在 PRPPs 和 Nampt 的共同催化下生成 NMN。傅荣昭等根据以上途径设计并进行酶催化反应,额外加入木糖异构酶(xylose isomerase, XI)将吡喃木糖转化为呋喃形式的木酮糖以增强前体供应,以木糖和 NAM 作为核心底物,当 NAM:ATP:木糖=1-4:1:1-4 按摩尔比投放时,酶催化反应 8 h 后,最高可获得 7.35 g/L 的 NMN 粗产品溶液,摩尔转化率可以达 80%-100%^[82]。以上 2 种途径虽然产量不如其他中间产物的酶催化途径,但是能够以葡萄糖、木糖等单糖作为核心底物合成 NMN,进一步降低了 NMN 的合成成本,为 NMN 的工业化生产提供了新的思路。

无论是哪一种合成 PRPP 的途径都需要大量昂贵的磷酸盐供体——ATP,工业上通过构建 ATP 循环系统减少催化过程中的 ATP 消耗,例如:引入基于多聚磷酸激酶(polyphosphate kinase, PPK)的 ATP 循环系统可显著降低 ATP 消耗,从而实现具有成本效益的 NMN 工业化生产。在某些途径中,ATP 消耗的过程会产生副产物 PPi,通过添加焦磷酸酶(pyrophosphatase, PPase)将 PPi 降解为磷酸盐,能够使 NMN 的产量增加约 50%,这可能是因为副产物的降解促进了反应过程^[72]。

3.1.2 生物催化法——以 NR 为核心底物

除了使用多种核心底物(如核糖、核苷、葡萄糖和木糖等)优化代谢网络增强 PRPP 的前体供应外,以具有核糖基和烟酰胺基的 NR 为直接底物进行催化反应,能够避免使用价格较高且来源受限的 PRPP,核心途径为:1 分子 NR 与 1 分子 ATP 结合,在 NRK 的催化作用下磷

酸化生成 1 分子 NMN 和 1 分子副产物 ADP。2016 年,陶军华等以 NR 为直接底物、以 ATP 为共底物,在 *S. cerevisiae* 来源的 NRK 的催化作用下生成 NMN,转化率达 90%以上;经离子交换树脂分离、冻干等后处理纯化后得到的 NMN 纯度大于 95%^[83]。2019 年,祝俊等通过易错 PCR、DNA 重排、半理性设计及三维结构模拟等定向进化技术获得的 NRK 突变体(亲本来源于马克思克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus*),分别对 D45、D58、R161、Y164 四个位点进行联合突变,酶活提高 1.94-6.39 倍;以 10 g/L 的 NR 为底物,配合 ATP 辅因子循环系统进行 20 h 催化反应合成 NMN,转化率大于 90%^[45,84]。

除了对高酶活的 NRK 进行突变筛选外, NRK 还存在热稳定性普遍较差的问题,提高 NRK 热稳定性有利于在反应前去除杂酶减少副反应,无需经过柱纯化。肖春英筛选到来源于太瑞斯梭孢壳霉(*Thermothielavioides terrestris* NRRL 8126, 以前称为 *Thielavia terrestris*)的 NRK,其最适反应温度为 70 °C,利用 65 °C 热处理 15 min 后的 NRK 粗酶液,以 NR 为核心底物,ATP 为共底物,在 40 °C、pH 5.0-6.0 条件下反应 4 h, NMN 的转化率可达 93%^[85]。戴维等针对 *H. sapiens* 来源的 NRK,通过大分子建模技术,利用定点突变降低蛋白整体结构的自由能,从 15 个可能与提高蛋白稳定性有关的位点中筛选出突变体 NRK15,配合 *E. coli* 来源的 PPK2 实现 ATP 循环,以 NR 等为底物,在 42 °C 条件下催化 3 h 后, NMN 的底物转化率>99%^[86]。刘峰等将 *S. cerevisiae* 来源的絮凝素锚定蛋白 flo1 和 NRK 蛋白串联表达,使 NRK 高效展示于酿酒酵母细胞壁表面,利用免疫荧光技术筛选到酶活和热稳定性均较高的 NRK,该酶以 NR 等为底物,在 40 °C 反应 4 h 可生成 16.44 g/L NMN,转化率达到 98.3%^[87]。目前市售的 NR 普遍采

用化学法合成,存在化学残留风险,且价格昂贵;通过深入研究 NR 为核心中间产物的代谢途径后发现其同样能够使用通过多种途径合成,具体代谢途径如下。

(1) 以核糖为核心底物时,与 PRPP 的合成途径相似,历经 4 步酶促反应生产 NMN (即图 7 的 a 部分橙色虚线框模块): ①核糖以 ATP 作为磷酸基团供体,在 RK 催化下生成 R-5-P 与副产物 ADP; ②R-5-P 在磷酸核糖变位酶(phosphopentomutase, PPM)的作用下生成核糖-1-磷酸(ribose 1-phosphate, R-1-P); ③R-1-P 在 NRK 的解磷酸作用下合成 NR; ④NR 消耗 1 分子 ATP 在 NRK 的磷酸化作用下合成 NMN 与 ADP。2022 年,赵强等首次揭示了 NRK 的双功能,即对 R-1-P 具有解磷酸作用和对 NR 具有磷酸化作用,在反应中加入来源于 *S. cerevisiae* 的 RK 固定化酶、来源于水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的 PPM 固定化酶和来源于 *H. sapiens* 的 NRK 固定化酶,以核糖、NAM、ATP 为底物,在 25 °C 反应 4 h 可得到 30.73 g/L 的 NMN,底物转化率为 92%^[88]。

(2) 以核苷为核心底物时,可通过 3 步酶促反应合成 NMN (即图 7 的 b 部分蓝色虚线框模块): ①核苷与磷酸盐在嘌呤核苷磷酸化酶(purine nucleoside phosphorylase, PNP)或嘧啶核苷磷酸化酶(pyrimidine nucleoside phosphorylase, PyNP)的作用下,脱去相应的嘌呤或嘧啶生成 R-1-P; ②R-1-P 在尿苷磷酸酶(uridine phosphorylase, UPP)或 PNP 的催化下,与 NAM 生成关键中间产物 NR; ③最后 NR 在 NRK 的作用下消耗 1 分子 ATP,生成 1 分子 NMN 与 1 分子 ADP。2020 年,范文超等以鸟苷等为底物,在 PNP 和 UPP 突变体(亲本来源于 *E. coli*)和来源于 *S. cerevisiae* S288C 的 NRK 作用下一锅法催化合成 NMN,最终浓度可达 768.7 mg/L^[89]。

Zhou 等设计了 NR 磷酸化途径生成 NMN,能够以尿苷等为底物,增强 NR 的前体供应,通过筛选与系统优化后 PyNP、PNP、NRK、PPK2 四酶级联催化系统实现 3 g/L 的 NMN 产量^[90]。与其相似的还有于铁妹等^[91],以腺苷为核心底物,在来源于牛(*Bos taurus*)的 PNP 作用下合成 R-1-P,而后在来源于流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* ATCC 51907)的 NRK 催化下生成 NMN,并且其加入来源于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692)的 PPK 后可实现 ATP 循环降低工艺成本,经过条件优化于 1 L 转化罐 38 °C 反应 15 h,最高可生成 75.15 g/L 的 NMN,底物转化率为 90%。

以上生物催化法生产 NMN 的方案,主要是通过葡萄糖、木糖、核糖以及各种核苷代谢途径中的重要中间产物为核心底物,搭配 NAM 为共底物提供核糖基与烟酰胺基,增强 PRPP、NR 的前体供应,共同催化 NMN 高效合成。并且通过对酶的稳定性、催化活性、辅因子循环体系以及多酶催化系统的全方位优化,进一步提升了 NMN 生物合成效率。

3.2 微生物发酵法

除了生物催化法合成 NMN 在近年备受关注,微生物发酵法生产 NMN 也同样取得了新的研究进展,其核心为高产菌株的选择。首先是通过传统的菌株筛选方法(图 7 的 C 部分绿色模块,红色箭头标注): Sugiyama 等以 NR 营养缺陷型酵母为筛选工具,从 174 株兼性厌氧乳酸菌中筛选获得 3 株具有生产活性的菌株[均为果糖芽胞杆菌属(*Fructobacillus*)],最高能够在 YPD 培养基(主要成分之一为葡萄糖)中产生 1.5 mg/L 的 NR 和 2.1 mg/L NMN^[92]。赵丽青等以 NAM 为底物利用土壤中筛选鉴定出的成都肠杆菌(*Enterobacter chengduensis* 2021T4.7)发酵生产 NMN,15 min 可达 22.6 mg/L 的 NMN

产量^[93]。

除了传统的菌株筛选方法外,可通过对工程菌进行酶工程、代谢工程等方式的改造构建高产菌株。Black 等发现,细胞内 NMN 水平低可归因于 PncC 对 NMN 的降解。因此在 $\Delta pncC$ 大肠杆菌中过表达来源于土拉热弗朗西斯菌 (*Francisella Tularensis*) 的 NMN 合成酶 (NMN synthetase, NadE) 和来源于青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 的烟酰胺磷酸核糖转移酶 NadV (即前文所述 Nampt), 以 1 mmol/L NA 为底物,最高可将 NMN 产量提到 501 mg/L, 达到了野生型的 130 倍(即图 7 的 I 部分绿色实线框模块)^[94]。除敲除降解途径外,也需解除负反馈抑制同时加强前体供应。2018 年, Marinescu 等以 NAM 和乳糖为底物,在大肠杆菌中进行重组双顺反子表达,将来自杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*) 的 Nampt 和来自解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的 PRPPs (具有 L135I 突变解除负反馈抑制) 转化到大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 中,最终发酵 12 h 获得 NMN 的产量达 15.42 mg/L (或 17.26 mg/g 总蛋白质) (即图 7 的 II 部分橙色实线框模块)^[95]。

与上述全细胞催化葡萄糖生产 NMN 的代

谢途径相似(图 7 的 C 部分绿色模块,红色箭头标注),2022 年, Huang 等以葡萄糖和 NAM 为底物发酵合成 NMN,通过对大肠杆菌进行系统性修饰后,异源表达并筛选 Nampt [来源于弧菌噬菌体 *Vibrio bacteriophage* KVP40 (VpNadV)] 同时共表达解除负反馈抑制的 PRPPs 基因 $BaPRS^{L135I}$ (来源于 *B. amyloliquefaciens*), 此外引入来源于 *B. mycoides* 的 PnuC 与来源于 *B. cenocepacia* 的 NiaP, 敲除 NMN 降解途径中 NadR、PncC、UDP 糖水解酶 (UDP-sugar hydrolase, UshA) 和 PRPP 调控因子 (PRPP regulatory factor, *purR* gene) 的编码基因,使其更有利于 NMN 的生物合成和积累。最后通过优化后的分批补料工艺,在 5 L 生物反应器水平上,使 NMN 的滴度达到 16.2 g/L, NAM 转化率为 97.0%, 实现目前发酵法最高的 NMN 滴度^[96], 不同生物合成法的对比具体见表 2。

4 结论与展望

近年来的广泛研究和关注,使 NMN 生理活性研究的空白领域逐渐被填补,同时生物合成所涉及的关键酶基因和代谢途径被阐明,为构建高效稳定的微生物细胞工厂奠定了基础。

表 2 使用不同生物合成法生产 NMN 的比较

Table 2 Comparison of NMN production using different biosynthesis methods

Substrates	Strategies	Time	NMN production (g/L)	References
Biological catalysis				
PRPP, NAM	Nampt	1957	NA	[60]
PRPP, NAM	Overexpression Nampt with mutation	2018	NA	[69]
PRPP, NAM	Overexpression Nampt (from <i>M. ruber</i>)	2021	0.034	[64]
NAM, ribose, phosphate	Overexpression Nampt (from <i>H. sapiens</i>), PRPPs1 and PRPPs2 (from <i>H. sapiens</i>)	2021	0.772	[73]
NAM, ribose, ATP	Overexpression Nampt (from <i>M. ruber</i> DSM 1279) with mutation, PRPPs, RK	2016	8.322 (conversion=80%–100%)	[74]
NAM, ATP, R-5-P	Overexpression Nampt, PRPPs	2018	13.300 (conversion=99.5%)	[75]

(待续)

(续表 2)

Substrates	Strategies	Time	NMN production (g/L)	References
NAM, ATP, adenosine	Overexpression Nampt, APRT (from <i>E. coli</i>), Adk	2020	19.670 (conversion=96%)	[77]
NAM, PPi, AMP	Overexpression Nampt with mutation, APRT	2016	32.252 (conversion=80%–100%)	[78]
NAM, ATP, AMP	Overexpression Nampt, PRPPs, Amn	2016	12.868 (conversion=80%–100%)	[79]
NAM, PPi, IMP	Overexpression Nampt, HPRT, XOD	2016	14.639 (conversion=80%–100%)	[80]
NAM, glucose	Overexpression Nampt (from <i>B. velezensis</i>), Ado1 (from <i>S. cerevisiae</i>), PRPPs, G6PD, PGLS, PGD, RpiA, YgcS, deletion of <i>pncC</i> , <i>nadR</i> and <i>amn</i>	2021	0.496	[81]
NAM, glucose	Overexpression Nampt (from <i>C. pinensis</i>), NiaP (from <i>B. cenocepacia</i>), PnuC (from <i>B. mycooides</i>) and PRPPs, G6PD, PGLS, PGD, RpiA, GPI (from <i>E. coli</i>)	2021	6.790 (conversion=87%)	[63]
NAM, ATP, D-xylose	Overexpression Nampt, PRPPs, XR, XDH, XK, XI, PRE, RpiA	2016	7.353 (conversion=80%–100%)	[82]
NR, ATP	Overexpression NRK (from <i>S. cerevisiae</i>)	2016	(conversion>90%)	[83]
NR, ATP	Overexpression NRK with mutation (from <i>K. marxianus</i>), PPK	2019	(conversion>90%)	[84]
NR, ATP	Overexpression NRK (from <i>T. terrestris</i> NRRL 8126)	2020	(conversion=93%)	[85]
NR, ATP	Overexpression NRK (from <i>H. sapiens</i>), PPK2 (from <i>E. coli</i>)	2020	(conversion>99%)	[86]
NR, ATP	Overexpression NRK (from <i>S. cerevisiae</i>) and flo1 (from <i>S. cerevisiae</i>)	2021	16.444 (conversion=98.3%)	[87]
Ribose, NAM, ATP	Overexpression PPM (from <i>T. aquaticus</i>), RK (from <i>S. cerevisiae</i>), NRK (from <i>H. sapiens</i>)	2022	30.730 (conversion=92%)	[88]
Guanosine, NAM, ATP, phosphate	Overexpression PNP, UPP (from <i>E. coli</i> K-12, MG1655) with mutation, NRK (from <i>S. cerevisiae</i> S288C)	2020	0.769	[89]
Uridine or AMP	Overexpression PyNP, PNP, NRK, PPK2 (or Amn, PRPPs, Nampt)	2022	3.000	[90]
Adenosine, NAM, ATP	Overexpression PNP (from <i>B. taurus</i>), NRK (from <i>H. influenzae</i> ATCC 51907), PPK (from <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692)	2021	75.150 (conversion=90%)	[91]
Fermentation				
Glucose	<i>Fructobacillus</i>	2021	0.002	[92]
NAM	<i>E. chengduensis</i> 2021T4.7	2021	0.023	[93]
NA	Overexpression NadE (from <i>F. Tularensis</i>), NadV (from <i>R. solanacearum</i>) and deletion of <i>pncC</i>	2020	0.501	[94,97]
NAM, lactose	Overexpression Nampt (from <i>H. ducreyi</i>), PRPPs (from <i>B. amyloliquefaciens</i> with L135I mutation)	2018	0.015	[95]
NAM, glucose	Overexpression Nampt (from <i>Vibrio bacteriophage</i> KVP40), PRPPs (from <i>B. amyloliquefaciens</i> with L135I mutation), NiaP (from <i>B. cenocepacia</i>), PnuC (from <i>B. mycooides</i>), deletion of <i>pncC</i> , <i>nadR</i> , <i>purR</i> and <i>ushA</i>	2022	16.200 (conversion=97%)	[96]

NA: Not available.

目前, NMN 可以通过不同的途径从相对便宜和简单的起始原料转化而来, 但其转化率与产率仍有提高的空间。在未来, 利用生物技术、分子生物学和合成生物学相结合的方式, 结合代谢工程设计, 通过进一步增强核心酶活性与稳定性, 引入 NAM 合成模块, 优化异源生物合成途径, 优化 ATP 循环模块, 优化发酵生产及培养条件, 完善下游纯化工艺等方式, 进一步构建经济更强, 遗传稳定的微生物细胞工厂, 从根本上改变 NMN 的生产现状。

REFERENCES

- [1] HONG WQ, MO F, ZHANG ZQ, HUANG MY, WEI XW. Nicotinamide mononucleotide: a promising molecule for therapy of diverse diseases by targeting NAD^+ metabolism[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 246.
- [2] 史海波, 赵海, 周春松, 王泉明. β -烟酰胺单核苷酸制备研究进展[J]. *精细化工中间体*, 2020, 50(4): 1-5. SHI HB, ZHAO H, ZHOU CS, WANG QM. Progress in synthesis of β -nicotinamide mononucleotide[J]. *Fine Chemical Intermediates*, 2020, 50(4): 1-5 (in Chinese).
- [3] MILLS KF, YOSHIDA S, STEIN LR, GROZIO A, KUBOTA S, SASAKI Y, REDPATH P, MIGAUD ME, APTE RS, UCHIDA K, YOSHINO J, IMAI SI. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice[J]. *Cell Metabolism*, 2016, 24(6): 795-806.
- [4] WANG XN, HU XJ, YANG Y, TAKATA T, SAKURAI T. Nicotinamide mononucleotide protects against β -amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death[J]. *Brain Research*, 2016, 1643: 1-9.
- [5] VERDIN E. NAD^+ in aging, metabolism, and neurodegeneration[J]. *Science*, 2015, 350(6265): 1208-1213.
- [6] 李旺, 郭文彬, 王晓季. 烟酰胺单核苷酸(NMN)的活性与化学制备的研究进展[J]. *江西科技师范大学学报*, 2020(6): 112-115. LI W, GUO WB, WANG XJ. Progress of the activity and synthesis of nicotinamide mononucleotide (NMN)[J]. *Journal of Jiangxi Science & Technology Normal University*, 2020(6): 112-115 (in Chinese).
- [7] IMAI SI, YOSHINO J. The importance of NAMPT/NAD/SIRT1 in the systemic regulation of metabolism and ageing[J]. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 2013, 15(3): 26-33.
- [8] das A, HUANG GX, BONKOWSKI MS, LONGCHAMP A, LI C, SCHULTZ MB, KIM LJ, OSBORNE B, JOSHI S, LU YC, TREVIÑO-VILLARREAL JH, KANG MJ, HUNG TT, LEE B, WILLIAMS EO, IGARASHI M, MITCHELL JR, WU LE, TURNER N, ARANY Z, et al. Impairment of an endothelial NAD^+ - H_2S signaling network is a reversible cause of vascular aging[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 74-89.e20.
- [9] CHINI CCS, TARRAGÓ MG, CHINI EN. NAD and the aging process: role in life, death and everything in between[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 455: 62-74.
- [10] 王思蓉, 王言之, 李世芬, 王光路, 张静姝. β -烟酰胺单核苷酸对衰老小鼠的抗氧化作用研究[J]. *甘肃科技*, 2021, 37(20): 69-71, 90. WANG SR, WANG YZ, LI SF, WANG GL, ZHANG JS. Antioxidant effect of β -nicotinamide mononucleotide on aging mice[J]. *Gansu Science and Technology*, 2021, 37(20): 69-71, 90 (in Chinese).
- [11] PALMER RD, ELNASHAR MM, VACCAREZZA M. Precursor comparisons for the upregulation of nicotinamide adenine dinucleotide. Novel approaches for better aging[J]. *Aging Medicine*, 2021, 4(3): 214-220.
- [12] REITEN OK, WILVANG MA, MITCHELL SJ, HU ZP, FANG EF. Preclinical and clinical evidence of NAD^+ precursors in health, disease, and ageing[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2021, 199: 111567.
- [13] GROZIO A, MILLS KF, YOSHINO J, BRUZZONE S, SOCIALI G, TOKIZANE K, LEI HC, CUNNINGHAM R, SASAKI Y, MIGAUD ME, IMAI SI. Slc12a8 is a nicotinamide mononucleotide transporter[J]. *Nature Metabolism*, 2019, 1(1): 47-57.
- [14] CANTÓ C, MENZIES KJ, AUWERX J. NAD^+ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus[J]. *Cell Metabolism*, 2015, 22(1): 31-53.
- [15] MOUCHIROUD L, HOUTKOOPER RH, MOULLAN N, KATSYUBA E, RYU D, CANTÓ C, MOTTIS A, JO YS, VISWANATHAN M, SCHOONJANS K, GUARENTE L, AUWERX J. The NAD^+ /sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling[J]. *Cell*, 2013,

- 154(2): 430-441.
- [16] BRAIDY N, BERG J, CLEMENT J, KHORSHIDI F, POLJAK A, JAYASENA T, GRANT R, SACHDEV P. Role of nicotinamide adenine dinucleotide and related precursors as therapeutic targets for age-related degenerative diseases: rationale, biochemistry, pharmacokinetics, and outcomes[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2019, 30(2): 251-294.
- [17] KLIMOVA N, KRISTIAN T. Multi-targeted effect of nicotinamide mononucleotide on brain bioenergetic metabolism[J]. *Neurochemical Research*, 2019, 44(10): 2280-2287.
- [18] SIMS CA, GUAN YX, MUKHERJEE S, SINGH K, BOTOLIN P, DAVILA A Jr, BAUR JA. Nicotinamide mononucleotide preserves mitochondrial function and increases survival in hemorrhagic shock[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(17): e120182.
- [19] KISS T, BALASUBRAMANIAN P, VALCARCEL-ARES MN, TARANTINI S, YABLUCHANSKIY A, CSIPO T, LIPECZ A, REGLODI D, ZHANG XA, BARI F, FARKAS E, CSISZAR A, UNGVARI Z. Nicotinamide mononucleotide (NMN) treatment attenuates oxidative stress and rescues angiogenic capacity in aged cerebromicrovascular endothelial cells: a potential mechanism for the prevention of vascular cognitive impairment[J]. *GeroScience*, 2019, 41(5): 619-630.
- [20] LIN JM, PAN YC, WANG JY. NAD⁺ and its precursors in human longevity[J]. *Quantitative Biology*, 2015, 3(4): 193-198.
- [21] LONG AN, OWENS K, SCHLAPPAL AE, KRISTIAN T, FISHMAN PS, SCHUH RA. Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an Alzheimer's disease-relevant murine model[J]. *BMC Neurology*, 2015, 15: 19.
- [22] 赵娟, 张健, 余志坚, 曹永强, 陈超, 杨贞耐. 烟酰胺单核苷酸的研究及应用进展[J]. *食品科技*, 2018, 43(4): 257-262.
- ZHAO J, ZHANG J, YU ZJ, CAO YQ, CHEN C, YANG ZN. Progress on research and application of nicotinamide mononucleotides[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(4): 257-262 (in Chinese).
- [23] REVOLLO JR, KÖRNER A, MILLS KF, SATOH A, WANG T, GARTEN A, DASGUPTA B, SASAKI Y, WOLBERGER C, TOWNSEND RR, MILBRANDT J, KIESS W, IMAI SI. Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in β cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme[J]. *Cell Metabolism*, 2007, 6(5): 363-375.
- [24] TSUBOTA K. The first human clinical study for NMN has started in Japan[J]. *npj Aging and Mechanisms of Disease*, 2016, 2: 16021.
- [25] GOMES AP, PRICE NL, LING AJY, MOSLEHI JJ, MONTGOMERY MK, RAJMAN L, WHITE JP, TEODORO JS, WRANN CD, HUBBARD BP, MERCKEN EM, PALMEIRA CM, de CABO R, ROLO AP, TURNER N, BELL EL, SINCLAIR DA. Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1624-1638.
- [26] 王欢. NMN 通过 NAD⁺/Sirt3 通路改善线粒体功能抑制间充质干细胞衰老的作用研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2020.
- WANG H. NMN improves mitochondrial function and rescues cellular senescence by NAD⁺/Sirt3 pathway in mesenchymal stem cells[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2020 (in Chinese).
- [27] SCHÖNDORF DC, IVANYUK D, BADEN P, SANCHEZ-MARTINEZ A, de CICCIO S, YU C, GIUNTA I, SCHWARZ LK, di NAPOLI G, PANAGIOTAKOPOULOU V, NESTEL S, KEATINGE M, PRUSZAK J, BANDMANN O, HEIMRICH B, GASSER T, WHITWORTH AJ, DELEIDI M. The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside rescues mitochondrial defects and neuronal loss in iPSC and fly models of Parkinson's disease[J]. *Cell Reports*, 2018, 23(10): 2976-2988.
- [28] KISS T, GILES CB, TARANTINI S, YABLUCHANSKIY A, BALASUBRAMANIAN P, GAUTAM T, CSIPO T, NYÚL-TÓTH Á, LIPECZ A, SZABO C, FARKAS E, WREN JD, CSISZAR A, UNGVARI Z. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation promotes anti-aging miRNA expression profile in the aorta of aged mice, predicting epigenetic rejuvenation and anti-atherogenic effects[J]. *GeroScience*, 2019, 41(4): 419-439.
- [29] YAO ZW, YANG WH, GAO ZQ, JIA P. Nicotinamide mononucleotide inhibits JNK activation to reverse Alzheimer disease[J]. *Neuroscience Letters*, 2017, 647: 133-140.
- [30] 邓军, 罗统有, 刘道甫, 许俊伟, 罗明亮, 姚礼伦, 谭志聪. 烟酰胺核苷酸临床研究进展及化学制备方法[J]. *广东化工*, 2021, 48(12): 98-100, 88.
- DENG J, LUO TY, LIU DF, XU JW, LUO ML, YAO LL, TAN ZC. Clinical research and chemical preparation progress of nicotinamide nucleotide[J].

- Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(12): 98-100, 88 (in Chinese).
- [31] UDDIN GM, YOUNGSON NA, SINCLAIR DA, MORRIS MJ. Head to head comparison of short-term treatment with the NAD^+ precursor nicotinamide mononucleotide (NMN) and 6 weeks of exercise in obese female mice[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7: 258.
- [32] YOSHINO J, MILLS KF, YOON MJ, IMAI SI. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD^+ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice[J]. *Cell Metabolism*, 2011, 14(4): 528-536.
- [33] STROMSDORFER KL, YAMAGUCHI S, YOON MJ, MOSELEY AC, FRANCIK MP, KELLY SC, QI N, IMAI SI, YOSHINO J. NAMPT-mediated NAD^+ biosynthesis in adipocytes regulates adipose tissue function and multi-organ insulin sensitivity in mice[J]. *Cell Reports*, 2016, 16(7): 1851-1860.
- [34] MARTIN AS, ABRAHAM DM, HERSHBERGER KA, BHATT DP, MAO L, CUI HX, LIU J, LIU XJ, MUEHLBAUER MJ, GRIMSRUD PA, LOCASALE JW, PAYNE RM, HIRSCHHEY MD. Nicotinamide mononucleotide requires SIRT3 to improve cardiac function and bioenergetics in a Friedreich's ataxia cardiomyopathy model[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(14): e93885.
- [35] NORTH BJ, ROSENBERG MA, JEGANATHAN KB, HAFNER AV, MICHAN S, DAI J, BAKER DJ, CEN YN, WU LE, SAUVE AA, van DEURSEN JM, ROSENZWEIG A, SINCLAIR DA. SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan[J]. *The Embo Journal*, 2014, 33(13): 1438-1453.
- [36] YAMAMOTO T, BYUN J, ZHAI PY, IKEDA Y, OKA S, SADOSHIMA J. Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD^+ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98972.
- [37] GUAN Y, WANG SR, HUANG XZ, XIE QH, XU YY, SHANG D, HAO CM. Nicotinamide mononucleotide, an NAD^+ precursor, rescues age-associated susceptibility to AKI in a sirtuin 1-dependent manner[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*: JASN, 2017, 28(8): 2337-2352.
- [38] LIN JB, KUBOTA S, BAN N, YOSHIDA M, SANTEFORD A, SENE A, NAKAMURA R, ZAPATA N, KUBOTA M, TSUBOTA K, YOSHINO J, IMAI SI, APTE RS. NAMPT-mediated NAD^+ biosynthesis is essential for vision in mice[J]. *Cell Reports*, 2016, 17(1): 69-85.
- [39] de PICCIOTTO NE, GANO LB, JOHNSON LC, MARTENS CR, SINDLER AL, MILLS KF, IMAI SI, SEALS DR. Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice[J]. *Aging Cell*, 2016, 15(3): 522-530.
- [40] PODDAR SK, SIFAT AE, HAQUE S, NAHID NA, CHOWDHURY S, MEHEDI I. Nicotinamide mononucleotide: exploration of diverse therapeutic applications of a potential molecule[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(1): 34.
- [41] CATON PW, KIESWICH J, YAQOOB MM, HOLNESS MJ, SUGDEN MC. Nicotinamide mononucleotide protects against pro-inflammatory cytokine-mediated impairment of mouse islet function[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(12): 3083-3092.
- [42] IRIE J, INAGAKI E, FUJITA M, NAKAYA H, MITSUISHI M, YAMAGUCHI S, YAMASHITA K, SHIGAKI S, ONO T, YUKIOKA H, OKANO H, NABESHIMA YI, IMAI SI, YASUI M, TSUBOTA K, ITOH H. Effect of oral administration of nicotinamide mononucleotide on clinical parameters and nicotinamide metabolite levels in healthy Japanese men[J]. *Endocrine Journal*, 2020, 67(2): 153-160.
- [43] IGARASHI M, NAKAGAWA-NAGAHAMA Y, MIURA M, KASHIWABARA K, YAKU K, SAWADA M, SEKINE R, FUKAMIZU Y, SATO T, SAKURAI T, SATO J, INO K, KUBOTA N, NAKAGAWA T, KADOWAKI T, YAMAUCHI T. Chronic nicotinamide mononucleotide supplementation elevates blood nicotinamide adenine dinucleotide levels and alters muscle function in healthy older men[J]. *npj Aging*, 2022, 8: 5.
- [44] ALTAY O, ARIF M, LI XY, YANG H, AYDIN M, ALKURT G, KIM W, AKYOL D, ZHANG C, DINLER-DOGANAY G, TURKEZ H, SHOAIE S, NIELSEN J, BORÉN J, OLMUSCELIK O, DOGANAY L, UHLÉN M, MARDINOGLU A. Combined metabolic activators accelerates recovery in mild-to-moderate COVID-19[J]. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 2021, 8(17): e2101222.
- [45] 任丽梅, 王晓茹, 祁永浩, 韩广欣, 韩天森, 桂阳, 张森, 李小兵. β -烟酰胺单核苷酸功能与合成研究进展[J]. *生物资源*, 2021, 43(2): 127-132.
- REN LM, WANG XR, QI YH, HAN GX, HAN TM,

- GUI Y, ZHANG M, LI XB. Research progress on function and synthesis of β -nicotinamide mononucleotide[J]. Biotic Resources, 2021, 43(2): 127-132 (in Chinese).
- [46] WALT DR, RIOS-MERCADILLO VM, AUGÉ J, WHITESIDES GM. Synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) from adenosine monophosphate (AMP)[J]. Journal of the American Chemical Society, 1980, 102(26): 7805-7806.
- [47] 单欣淑. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的生物合成研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2020.
- SHAN XS. Study on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [48] WALT DR, FINDEIS MA, RIOS-MERCADILLO VM, AUGÉ J, WHITESIDES GM. An efficient chemical and enzymic synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)[J]. Journal of the American Chemical Society, 1984, 106(1): 234-239.
- [49] LEE J, CHURCHIL H, CHOI WB, LYNCH JE, ROBERTS FE, VOLANTE RP, REIDER PJ. A chemical synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)[J]. Chemical Communications, 1999(8): 729-730.
- [50] 王波, 孙勇, 文军. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸的制备方法: CN201210421216.6[P]. 2013-01-16.
- WANG B, SUN Y, WEN J. Preparation of nicotinamide adenine dinucleotide: CN201210421216.6[P]. 2013-01-16.
- [51] TANIMORI S, OHTA T, KIRIHATA M. An efficient chemical synthesis of nicotinamide riboside (NAR) and analogues[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, 12(8): 1135-1137.
- [52] FRANCHETTI P, PASQUALINI M, PETRELLI R, RICCIUTELLI M, VITA P, CAPPELLACCI L. Stereoselective synthesis of nicotinamide beta-ribose and nucleoside analogs[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, 14(18): 4655-4658.
- [53] 潘钦孩. 辅酶I及其中间体化学合成的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2013.
- PAN QH. Study on the chemical synthesis of coenzyme I and its intermediate[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2013 (in Chinese).
- [54] 张颖, 蒋雨馨, 朱逸浩, 吴剑荣. β -烟酰胺单核苷酸合成技术研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 236-240.
- ZHANG Y, JIANG YX, ZHU YH, WU JR. Advance in synthesis of β -nicotinamide mononucleotide[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(10): 236-240 (in Chinese).
- [55] 魏霞蔚, 魏于全. 制备 β -烟酰胺单核苷酸或 β -烟酰胺核糖的方法: CN201810835636.6[P]. 2018-12-21.
- WEI XW, WEI YQ. Preparation β -nicotinamide mononucleotide or β -nicotinamide ribose method: CN201810835636.6[P]. 2018-12-21.
- [56] MIKHAILOPULO IA, PRICOTA TI, TIMOSHCHUK VA, AKHREM AA. Synthesis of glycosides of nicotinamide and nicotinamide mononucleotide[J]. Synthesis, 1981, (5): 388-389.
- [57] ZHANG N, SAUVE AA. Synthesis of β -nicotinamide riboside using an efficient two-step methodology[J]. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 2017, 71: 14.14.1-14.14.9.
- [58] A·索韦, F·S·穆罕默德. 烟酰胺单核苷酸的有效合成: CN201680029859.2[P]. 2021-03-26.
- SAUVE A, MOHAMMED FS. Effective synthesis of nicotinamide mononucleotide: CN201680029859.2[P]. 2021-03-26 (in Chinese).
- [59] JECK R, HEIK P, WOENCKHAUS C. Simple methods of preparing nicotinamide mononucleotide[J]. FEBS Letters, 1974, 42(2): 161-164.
- [60] PREISS J, HANDLER P. Enzymatic synthesis of nicotinamide mononucleotide[J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 225(2): 759-770.
- [61] REVOLLO JR, GRIMM AA, IMAI SI. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals[J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2007, 23(2): 164-170.
- [62] LIU L, SU XY, QUINN WJ 3rd, HUI S, KRUKENBERG K, FREDERICK DW, REDPATH P, ZHAN L, CHELLAPPA K, WHITE E, MIGAUD M, MITCHISON TJ, BAUR JA, RABINOWITZ JD. Quantitative analysis of NAD synthesis-breakdown fluxes[J]. Cell Metabolism, 2018, 27(5): 1067-1080.e5.
- [63] SHOJI S, YAMAJI T, MAKINO H, ISHII J, KONDO A. Metabolic design for selective production of nicotinamide mononucleotide from glucose and nicotinamide[J]. Metabolic Engineering, 2021, 65: 167-177.
- [64] 廖一波, 吴旻晖, 梁书利, 林影. 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.
- LIAO YB, WU MH, LING SL, LIN Y. Expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli* and catalytic synthesis of nicotinamide mononucleotide[J]. Modern Food Science and

- Technology, 2021, 37(2): 87-93, 182 (in Chinese).
- [65] SOMMER G, GARTEN A, PETZOLD S, BECK-SICKINGER AG, BLÜHER M, STUMVOLL M, FASSHAUER M. Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine[J]. Clinical Science (London, England: 1979), 2008, 115(1): 13-23.
- [66] SUN ZJ, LEI H, ZHANG ZE. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), a cytokine with multiple physiological functions[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2013, 24(5): 433-442.
- [67] ZHU YM, XU P, HUANG X, SHUAI W, LIU L, ZHANG S, ZHAO R, HU XY, WANG G. From rate-limiting enzyme to therapeutic target: the promise of NAMPT in neurodegenerative diseases[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 920113.
- [68] WANG T, ZHANG XB, BHEDA P, REVOLLO JR, IMAI SI, WOLBERGER C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD^+ biosynthetic enzyme[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2006, 13(7): 661-662.
- [69] 傅荣昭, 张琦. 一种烟酰胺磷酸核糖转移酶突变体及其应用: CN201680003981.2[P]. 2021-05-25.
- FU RZ, ZHANG Q. A mutant of nicotinamide phosphoribosyltransferase and its application: CN201680003981.2[P]. 2021-05-25 (in Chinese).
- [70] BURGOS ES, SCHRAMM VL. Weak coupling of ATP hydrolysis to the chemical equilibrium of human nicotinamide phosphoribosyltransferase[J]. Biochemistry, 2008, 47(42): 11086-11096.
- [71] HOVE-JENSEN B, ANDERSEN KR, KILSTRUP M, MARTINUSSEN J, SWITZER RL, WILLEMOËS M. Phosphoribosyl diphosphate (PRPP): biosynthesis, enzymology, utilization, and metabolic significance[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2016, 81(1): e00040-e00016.
- [72] SHEN Q, ZHANG SJ, XUE YZ, PENG F, CHENG DY, XUE YP, ZHENG YG. Biological synthesis of nicotinamide mononucleotide[J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(12): 2199-2208.
- [73] MAHARJAN A, SINGHVI M, KIM BS. Biosynthesis of a therapeutically important nicotinamide mononucleotide through a phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 and 2 engineered strain of *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(11): 3055-3065.
- [74] 傅荣昭, 张琦. 一种制备烟酰胺单核苷酸的方法: CN201680003986.5[P]. 2021-04-02.
- FU RZ, ZHANG Q. A method for preparing nicotinamide mononucleotide: CN201680003986.5[P]. 2021-04-02 (in Chinese).
- [75] 竺伟, 张小飞. 固定化全细胞一步酶法催化制备 β -烟酰胺单核苷酸: CN201810940729.5[P]. 2018-12-07.
- ZHU W, ZHANG XF. Immobilized whole cell one-step enzymatic catalytic preparation β -nicotinamide mononucleotide: CN201810940729.5[P]. 2018-12-07 (in Chinese).
- [76] PARK J, GUPTA RS. Adenosine kinase and ribokinase-the RK family of proteins[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(18): 2875-2896.
- [77] 周浩. 用于制备烟酰胺单核苷酸的酶组合物及酶法制备烟酰胺单核苷酸的方法: CN202010058700.1[P]. 2020-05-22.
- ZHOu H. Enzyme composition for preparing nicotinamide mononucleotide and method for preparing nicotinamide mononucleotide by enzymatic method: CN202010058700.1[P]. 2020-05-22 (in Chinese).
- [78] 傅荣昭, 张琦. 一种制备烟酰胺单核苷酸的方法: CN201680003975.7[P]. 2021-04-27.
- FU RZ, ZHANG Q. A method for preparing nicotinamide mononucleotide: CN201680003975.7[P]. 2021-04-27 (in Chinese).
- [79] 傅荣昭, 张琦. 一种制备烟酰胺单核苷酸的方法: CN201680003974.2[P]. 2021-04-27.
- FU RZ, ZHANG Q. A method for preparing nicotinamide mononucleotide: CN201680003974.2[P]. 2021-04-27 (in Chinese).
- [80] 傅荣昭, 张琦. 一种制备烟酰胺单核苷酸的方法: CN201680003973.8[P]. 2021-05-25.
- FU RZ, ZHANG Q. A method for preparing nicotinamide mononucleotide: CN201680003973.8[P]. 2021-05-25 (in Chinese).
- [81] LIU Y, YASAWONG M, YU B. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of β -nicotinamide mononucleotide from nicotinamide[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(6): 2581-2591.
- [82] 傅荣昭, 张琦. 一种制备烟酰胺单核苷酸的方法: CN201680003960.0[P]. 2021-07-27.
- FU RZ, ZHANG Q. A method for preparing nicotinamide mononucleotide: CN201680003960.0[P]. 2021-07-27 (in Chinese).
- [83] 陶军华, 付敏杰, 梁晓亮. 一种酶法制备 β -烟酰胺单核苷酸的方法: CN201611245619.4[P]. 2021-07-23.
- TAO JH, FU MJ, LIANG XL. A method of enzymatic preparation β -nicotinamide mononucleotide:

- CN201611245619.4[P]. 2021-07-23 (in Chinese).
- [84] 祝俊, 李斌, 徐飞, 余允东, 刘双喜, 李二军, 张超, 邢飞, 马晶晶, 张晨晨, 许昇. 一种烟酰胺磷酸核糖转移酶突变体及其应用: CN201910723177.7[P]. 2022-09-13.
- ZHU J, LI B, XU F, YU YD, LIU SX, LI EJ, ZHANG C, XING F, MA JJ, ZHANG CC, XU S. A mutant of nicotinamide phosphoribosyltransferase and its application: CN201910723177.7[P]. 2022-09-13 (in Chinese).
- [85] 肖春英. 烟酰胺核糖激酶及其应用: CN202011473646.3[P]. 2021-04-06.
- XIAO CY. Nicotinamide ribokinase and its application: CN202011473646.3[P]. 2021-04-06 (in Chinese).
- [86] 戴维, 周嘉莹, 余允东, 刘慧, 徐广见. 热稳定性和活性增强的烟酰胺核糖激酶突变体及其编码基因和应用: CN202011561179.X[P]. 2021-03-26.
- DAI W, ZHOU JY, YU YD, LIU H, XU GJ. Nicotinamide ribokinase mutant with enhanced thermal stability and activity and its coding gene and application: CN202011561179.X[P]. 2021-03-26 (in Chinese).
- [87] 刘峰, 熊绪千, 刘梦元, 刘喜元. 烟酰胺核苷激酶全酵母细胞及其生物催化合成 NMN 工艺: CN202110020769.X[P]. 2021-04-16.
- LIU F, XIONG XQ, LIU MY, LIU XY. Nicotinamide nucleoside kinase whole yeast cell and its biocatalytic process for NMN synthesis: CN202110020769.X[P]. 2021-04-16 (in Chinese).
- [88] 赵强, 赵士敏, 周晶辉, 曾红宇, 许岗. 一种基于酶法合成烟酰胺单核苷酸的方法: CN202110120111.6[P]. 2022-08-26.
- ZHAO Q, ZHAO SM, ZHOU JH, ZENG HY, XU G. A method for synthesis of nicotinamide mononucleotide based on enzymatic method: CN202110120111.6[P]. 2022-08-26 (in Chinese).
- [89] 范文超, 王金刚, 梁岩, 高书良, 袁圣伦, 任亮. 一种尿苷磷酸酶突变体及其应用: CN202010772689.5[P]. 2021-11-26.
- FAN WC, WANG JG, LIANG Y, GAO SL, YUAN SL, REN L. A uridine phosphatase mutant and its application: CN202010772689.5[P]. 2021-11-26 (in Chinese).
- [90] ZHOU CL, FENG J, WANG J, HAO N, WANG X, CHEN KQ. Design of an *in vitro* multienzyme cascade system for the biosynthesis of nicotinamide mononucleotide[J]. Catalysis Science & Technology, 2022, 12(4): 1080-1091.
- [91] 于铁妹, 林立峰, 凌瑞枚, 秦国富, 何秀秀, 谭文静, 潘俊锋, 刘建. 一种 β -烟酰胺单核苷酸的酶催化合成方法: CN202110397653.8[P]. 2021-07-27.
- YU TM, LIN LF, LING RM, QING GF, HE XX, TAN WJ, PAN JF, LIU J. An enzyme catalyzed synthesis method of β -nicotinamide mononucleotide: CN202110397653.8[P]. 2021-07-27 (in Chinese).
- [92] SUGIYAMA K, IJIMA K, YOSHINO M, DOHRA H, TOKIMOTO Y, NISHIKAWA K, IDOGAKI H, YOSHIDA N. Nicotinamide mononucleotide production by fructophilic lactic acid bacteria[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 7662.
- [93] 赵丽青, 陈建生, 段志刚, 张海潮. 一株产烟酰胺单核苷酸的成都肠杆菌及其应用: CN202110250748.7[P]. 2021-11-05.
- ZHAO LQ, CHEN JS, DUAN ZG, ZHANG HC. An *Enterobacter chengduensis* producing nicotinamide mononucleotide and its application: CN202110250748.7[P]. 2021-11-05 (in Chinese).
- [94] BLACK WB, ASPACIO D, BEVER D, KING E, ZHANG LY, LI H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for optimized biosynthesis of nicotinamide mononucleotide, a noncanonical redox cofactor[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 150.
- [95] MARINESCU GC, POPESCU RG, STOIAN G, DINISCHIOTU A. β -nicotinamide mononucleotide (NMN) production in *Escherichia coli*[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 12278.
- [96] HUANG ZS, LI N, YU SQ, ZHANG WP, ZHANG TM, ZHOU JW. Systematic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of nicotinamide mononucleotide from nicotinamide[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(9): 2979-2988.
- [97] BLACK WB, ZHANG LY, MAK WS, MAXEL S, CUI YT, KING E, FONG B, MARTINEZ AS, SIEGEL JB, LI H. Engineering a nicotinamide mononucleotide redox cofactor system for biocatalysis[J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16(1): 87-94.

(本文责编 郝丽芳)