

# 多聚磷酸激酶及其在 ATP 再生体系构建中的进展

程峰<sup>1,2</sup>, 李欢<sup>1,2</sup>, 李可欣<sup>1,2</sup>, 刘海云<sup>1,2</sup>, 沈其<sup>1,2</sup>, 薛亚平<sup>1,2\*</sup>, 郑裕国<sup>1,2</sup>

1 浙江工业大学 生物有机合成技术研究浙江省重点实验室, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学 手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

程峰, 李欢, 李可欣, 刘海云, 沈其, 薛亚平, 郑裕国. 多聚磷酸激酶及其在 ATP 再生体系构建中的进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4413-4427.

CHENG Feng, LI Huan, LI Kexin, LIU Haiyun, SHEN Qi, XUE Yaping, ZHENG Yuguo. Recent advances in poly phosphate kinase (PPK) and the construction of PPK-mediated ATP regeneration system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4413-4427.

**摘 要:** 构建高效的腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)再生体系可显著提高生物催化磷酸基团转移反应的效率。多聚磷酸激酶(poly phosphate kinase, PPK)能利用来源广、廉价且稳定的多聚磷酸(polyphosphate, Poly P)盐作为磷酸基供体, 能够实现单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、ATP、Poly P 之间磷酸基的高效定向转移, 已成为构建 ATP 再生体系的首选。本文介绍了不同类型 PPK 的结构特征、相关催化机制以及不同来源的 PPK 在酶活、催化效率、稳定性和底物偏好性的特征差异; 归纳和列举了针对野生 PPK 酶学性质不足进行分子改造的实例, 并对 PPK 在 ATP 再生体系构建的研究进展进行了总结。

**关键词:** 多聚磷酸激酶; 蛋白质工程; ATP 再生; 生物合成

## Recent advances in poly phosphate kinase (PPK) and the construction of PPK-mediated ATP regeneration system

CHENG Feng<sup>1,2</sup>, LI Huan<sup>1,2</sup>, LI Kexin<sup>1,2</sup>, LIU Haiyun<sup>1,2</sup>, SHEN Qi<sup>1,2</sup>, XUE Yaping<sup>1,2\*</sup>, ZHENG Yuguo<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

**Abstract:** Adenosine triphosphate (ATP) regeneration systems are essential for efficient

资助项目: 国家自然科学基金(31970046)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970046).

\*Corresponding author. E-mail: xyp@zjut.edu.cn

Received: 2023-04-16; Accepted: 2023-06-20; Published online: 2023-09-26

biocatalytic phosphoryl transfer reactions. Polyphosphate kinase (PPK) is a versatile enzyme that can transfer phosphate groups among adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP), ATP, and polyphosphate (Poly P). Utilization of PPK is an attractive solution to address the problem of ATP regeneration due to its ability to use a variety of inexpensive and stable Poly P salts as phosphate group donors. This review comprehensively summarizes the structural characteristics and catalytic mechanisms of different types of PPKs, as well as the variations in enzyme activity, catalytic efficiency, stability, and coenzyme preference observed in PPKs from different sources. Moreover, recent advances in PPK-mediated ATP regeneration systems and protein engineering of wild-type PPK are summarized.

**Keywords:** poly phosphate kinase; protein engineering; ATP regeneration; biosynthesis

腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)是一种高能磷酸化合物,其作为磷酸基团供体在工业上参与合成众多含磷酸重要化合物。但在生物合成中,若使用与底物等化学计量(甚至几倍于底物)的ATP作为原料则会大大增加生产成本,这是限制ATP作为磷酸基团供体工业化应用的主要瓶颈。多聚磷酸激酶(poly phosphate kinase, PPK)能够以多磷酸盐(polyphosphate, Poly P)作为磷酸盐供体,进行ATP的合成再生反应<sup>[1]</sup>,相较于其他ATP再生系统,如醋酸激酶-乙酰磷酸<sup>[2]</sup>、丙酮酸激酶-磷酸烯醇式丙酮酸<sup>[3]</sup>和肌酸激酶-磷酸肌酸<sup>[4]</sup>系统,所需的底物廉价且稳定,更适用于工业放大。选择采用PPK介导的ATP再生体系与主产物生产酶进行级联的方法(图1),共同进行生物催化反应,在很大程度上可以降低原料成本。

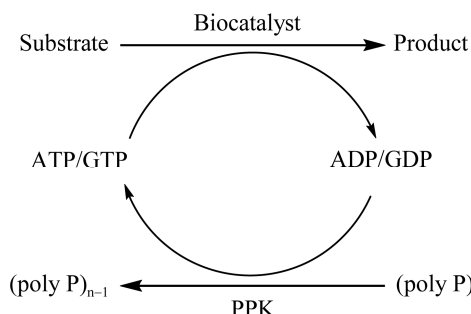


图1 多聚磷酸激酶 PPK 介导的 ATP 再生体系  
Figure 1 Schematic diagram of poly phosphate kinase (PPK)-mediated ATP regeneration system.

因此,多聚磷酸激酶 PPK 介导 ATP 再生在工业应用上具有重要意义。本文从以下几个方面展开:不同类型 PPK 的分类、PPK1 与 PPK2 的特征性结构、生物催化机制以及利用 PPK 实现 ATP 再生系统的典型示例(图2),并对未来工业化利用 PPK 的发展方向进行展望,为进一步创制活力高、稳定性强的 PPK,开发效率高的 ATP 再生体系提供理论指导。

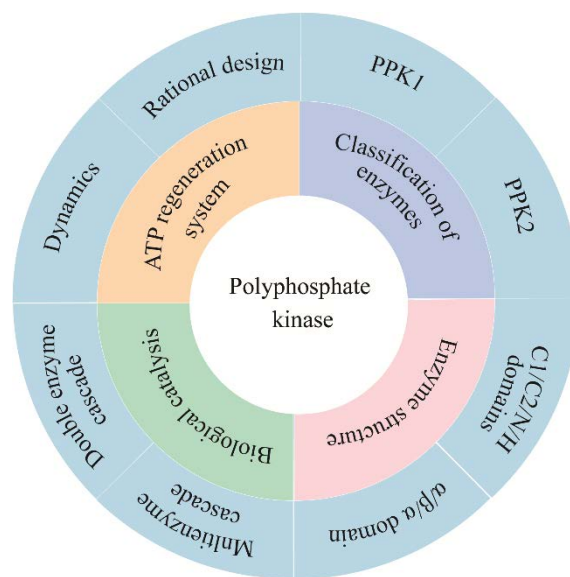


图2 本文主要内容示意图 示意图包括 PPK 酶的分类、结构、生物催化过程以及 ATP 再生体系构建  
Figure 2 Schematic illustration of this article. The schematic illustration includes classification and structure of PPK enzymes, biological catalytic processes, and the construction of ATP regeneration system.

# 1 多聚磷酸激酶(PPK)

## 1.1 PPK 概述

PPK (EC2.7.4.1)主要分为 PPK1 和 PPK2 两大家族,催化 ATP 或 GTP 的  $\gamma$  磷酸基可逆地转移到 Poly P,最早发现的 PPK 其系统命名为 ATP-多聚磷酸转移酶(ATP-poly phosphate phosphotransferase),属于 PPK1 家族,能够催化以 ATP 和 Poly P<sub>n</sub> 为底物生成二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)和 Poly P<sub>n+1</sub> 的可逆反应,其天然活力在许多病原体的基本代谢和毒力中具有重要作用<sup>[3]</sup>。虽然 PPK1 和 PPK2 这 2 个酶家族都能够催化合成 Poly P,但 PPK1 优先从三磷酸核苷合成 Poly P,而 PPK2 优先利用一磷酸核苷或二磷酸核苷<sup>[4]</sup>。Achbergerová 等分析比较大肠杆菌(*Escherichia coli*) PPK1 的 109 个序列同源物和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PPK2 的 109 个序列同源物的系统发育,证实了 PPK1 与 PPK2 的氨基酸序列相似度低,且 PPK2 的产生比 PPK1 早<sup>[5-6]</sup>。黄金玲等<sup>[7]</sup>证实 PPK1 和 PPK2 对鸟苷酸和腺苷酸的选择性不同:PPK2 可同等程度地转化 GTP 和 ATP 合成 Poly P;而 PPK1 只能以 ATP 为底物合成 Poly P,PPK2 能够利用 Poly P 合成 GTP 或 ATP,且利用 Poly P 合成 GTP 的能力是合成 ATP 的 30 多倍。

与 PPK1 相比,PPK2 可将 Poly P 作为供体实现 GDP 磷酸化为 GTP<sup>[8]</sup>。同时 PPK2 生成 ATP/GTP 的速度是其逆反应的 75 倍,远高于 PPK1。如图 3 所示,与 PPK1 相比,PPK2 将短链 Poly P 作为底物,主要应用于 Poly P 的分解代谢<sup>[7]</sup>;当 Poly P 的含量足够时, Poly P 间可发生齐聚反应使生物体内的 PPK2 表现活性提高 10 倍,故 PPK2 激酶可用于开发核苷酸的 Poly P 依赖的 ATP 再生系统,并被用于各种需要 ATP 参与的催化反应<sup>[9-10]</sup>。

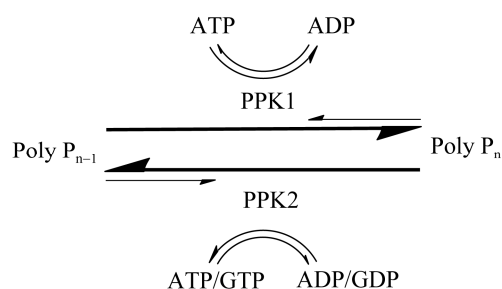


图 3 PPK1 与 PPK2 的反应示意图

Figure 3 Reaction diagram of PPK1 and PPK2.

PPK2 与 PPK1 的序列相似度低且各自高度保守。PPK2 家族按照 PPK2 的序列功能特征和发育分析可将其分为 I、II、III 这 3 个亚型<sup>[11]</sup>(图 4)。PPK2-I 型主要催化 ADP 磷酸化为 ATP<sup>[12]</sup>, PPK2-II 型偏好催化 AMP 磷酸化为 ADP<sup>[13]</sup>,而 PPK2-III 型对 ADP 和 AMP 这 2 种底物均有活性<sup>[14]</sup>,同时可以实现从 AMP 到 ADP 的磷酸化和 ADP 到 ATP 的磷酸化<sup>[15]</sup>,是一种双功能生物催化剂<sup>[14]</sup>。根据 Ogawa 等<sup>[16]</sup>的最新研究,PPK2-III 有可能连续利用 Poly P,同时转移多个 Pi 基团,使相当一部分的 AMP 通过焦磷酸化产生 ATP。因此,PPK2-III 有替代 I 型和 II 型用于生物催化再生 ATP 的潜力。还有一小部分 PPKs,只能进行嘧啶核酸基的磷酸化,被命名为 PPK3,但目前系统在发育上仍归类于 PPK2 家族<sup>[17]</sup>。

## 1.2 多聚磷酸激酶的序列、结构特性分析

目前已知 PPK 酶的类型主要有 PPK1 和 PPK2 两种,其不同之处在于 PPK2 的一级氨基酸序列仅约为 PPK1 氨基酸序列长度的一半,且 2 种 PPK 的氨基酸序列无相关性。尽管 PPK1 和 PPK2 之间缺乏同源性,但两类酶在整个细菌界都是高度保守的<sup>[18-19]</sup>。

PPK1 是具有 4 个结构域(N 结构域、H 结构域和两个 C 结构域)的约 80 kDa 的蛋白<sup>[20]</sup>。这 4 个结构域分别为氨基末端(N)结构域、头部(H)结构域和两个密切相关的羧基末端(C1 和 C2)结构

域<sup>[15]</sup>。N 结构域位于 C-末端结构域的上表面，为 ATP 的腺嘌呤环提供结合界面，而 H 结构域参与二聚化。PPK1 的 2 个 C 结构域在结构上类似于磷脂酶 D 的催化结构域，而 C1 结构域包含一个自磷酸化的组氨酸位点(图 5)。来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 PPK (*EcPPK1*)通常被认为是 PPK1 的模式酶，在溶液中呈四聚体，单体分子量约为 80 kDa<sup>[20]</sup>。它是第一个经过纯化和生物化学表征的 PPK<sup>[21]</sup>，其三维结构也已解析<sup>[18]</sup>。大肠杆菌的 *EcPPK1* 结构分析显示其是具有 4 个结构域的二聚体，活性位点位于一个 ATP 结合口袋的结构通道内，Poly P 的迁移受到该通道的影响。结合口袋有可能是 PPK 抑制因子的靶位点，一旦抑制因子与结合口袋结合就会破坏

PPK 二聚体结构致使 PPK 失活<sup>[21]</sup>。*EcPPK1* 的 16 个组氨酸残基中，有 4 个在多种细菌物种中是保守的。将这 4 个组氨酸进行突变，其中 His-430 和 His-598 突变为谷氨酰胺后，*EcPPK1* 功能不受影响，而 His-441 和 His-460 突变为谷氨酰胺或丙氨酸，*EcPPK1* 则失去体外合成 Poly P 或 ATP 的能力<sup>[22]</sup>。此外，研究发现来源于 PPK1 的原核生物盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)的 *DdPPK* 具有 1 050 个氨基酸残基，而大肠杆菌的 PPK 只有 688 个氨基酸残基；*DdPPK* 多出的 362 个氨基酸残基与大肠杆菌的 PPK 蛋白序列无同源性<sup>[23]</sup>，可以推断真核生物 PPK 和原核生物的 PPK 在蛋白结构上是有显著差异的。

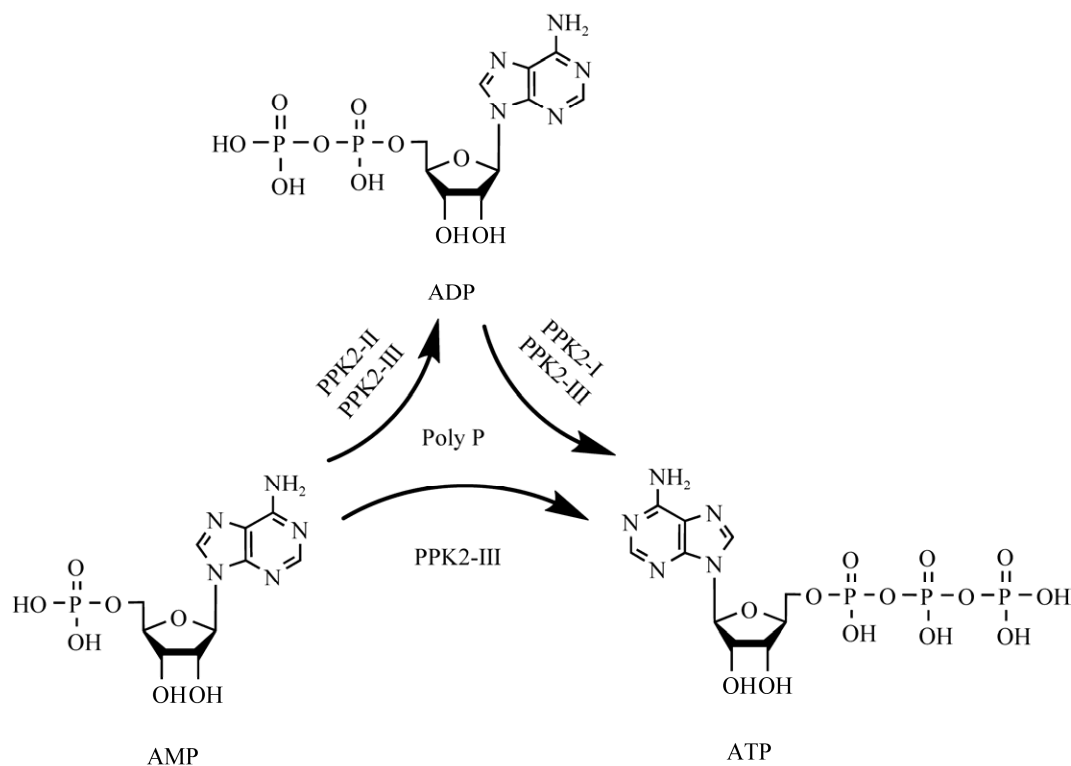
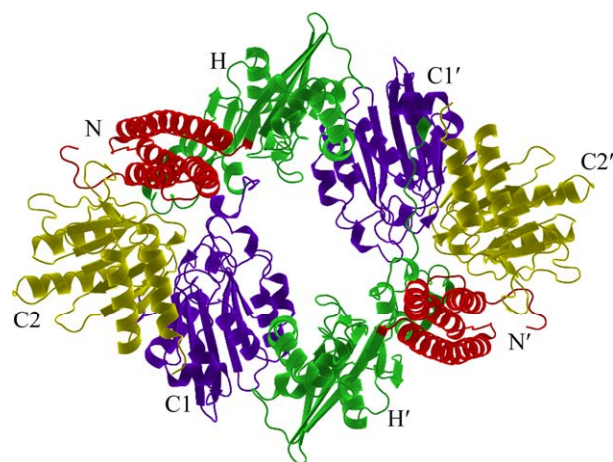


图 4 不同种类 PPK2 的催化示意图<sup>[10]</sup> PPK2 催化合成 ATP 的优先反应

Figure 4 Catalytic schematic diagram of different types of PPK2<sup>[10]</sup>. Preferred reactions catalyzed by PPK2 leading to ATP synthesis.

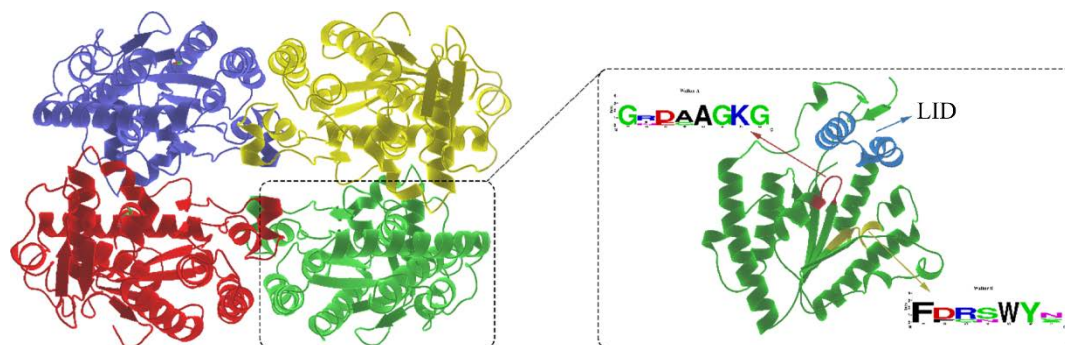


**图5 PPK1的模式酶EcPPK1的结构示意图(PDB 1XDO)** 该结构包含 4 个结构域: 两个亚基的 N-末端结构域(残基 2–106), 红色; 头部结构域(残基 107–321), 绿色; C-末端结构域 C1 (残基 322–502), 蓝色; C2 结构域(残基 503–687), 黄色

Figure 5 The diagram showing the structuring of a model enzyme of PPK1 (*EcPPK1*, PDB 1XDO). The structure contains four structural domains. The N-terminal domain of both subunits (residues 2–106) is colored in red, the head domain (residues 107–321) in green, the C-terminal domain C1 (residues 322–502) in blue and domain C2 (residues 503–687) in yellow.

PPK2 是具有特殊三级结构特征的约 40 kDa 的蛋白, 包括一个  $\alpha/\beta/\alpha$  三明治结构和一个  $\alpha$  螺

旋盖结构域<sup>[8]</sup>, 其特征也包括 2 个保守的基因序列(Walker A、Walker B)和一个 LID 模块<sup>[24]</sup>。其中 Walker A (GXXXXGK)用于结合 ATP 的  $\beta$  和  $\gamma$ -磷酸; Walker B (DR)上保守的羧酸残基与结合在核苷酸磷酸基上的金属离子配位<sup>[24]</sup>。LID 结构域为 Poly P 链端提供几个带正电荷的芳香族氨基酸残基与之配位(图 6)。来源于苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*, 曾用名 *Sinorhizobium meliloti*)的 PPK (*SmPPK2*, 图 6)通常被认为是 PPK2 的模式酶<sup>[25-26]</sup>, 其单体分子量大约为 40 kDa<sup>[8]</sup>, 在溶液中呈二聚体或四聚体<sup>[8,26-27]</sup>。目前已经公布了多个不同来源的细菌 PPK2 晶体结构, 具有代表性的包括: 第 I 类: 苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*, PDB ID: 3CZQ, name: *SMc02148*)和图拉氏弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*, PDB ID: 4YEG, Name: DR87\_59); II 类: 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PPK2C/PA3455 (PDB ID: 3CZP, Name: PA3455); III 类: 金黄色节杆菌(*Arthrobacter aureus*, PDB ID: 3RHF, name: AAur\_2811)、红毛节杆菌(*Meiothermus ruber*, PDB ID: 5LC9, name: MrH\_2468)、哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*, PDB ID: 6ANG, name: CHU\_0107) 和耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*, PDB ID: 6AQE, name: DR\_0132)。结



**图6 PPK2 的模式酶 SmPPK2 的结构示意图(PDB 3CZQ)** 该结构及其三维蛋白结构与保守序列 Walker A (GXXXXGK)、Walker B (DR)和 LID 模块

Figure 6 The diagram showing the structuring of a model enzyme of PPK2 (*SmPPK2*, PDB 3CZQ). This structure and its three-dimensional protein structure are related to the conserved sequence Walker A (GXXXXGK), Walker B (DR) and LID module.



合以上 7 种细菌的 PPK2 晶体结构, 构建含 PPK2 的第 I、II、III 类蛋白质序列(图 7)。由比对图可知几株 PPK2 序列相似度不高, 但均具备  $\alpha/\beta/\alpha$  结构, 且能观察到明显的 Walker A (GXXXXGK) 及 Walker B (DR) 模块。

### 1.3 多聚磷酸激酶的催化机理

#### 1.3.1 PPK1 自磷酸化的催化机制

Poly P 合成的第一步是 PPK1 的组氨酸残基自磷酸化(图 8), 突变研究表明 H435 和 H454 可能是 PPK 的自磷酸化位点<sup>[22]</sup>。在 PPK-AMPPNP 晶体结构中, H435 从背部位置攻击, 直接与 AMPPNP  $\gamma$ -磷酸基团相互作用, 而 H454 完全埋

在 C1-结构域的疏水中心内, 这一结果表明, H435 是 PPK1 唯一的自磷酸化位点<sup>[18]</sup>。

PPK1 的 H435 作为亲核剂攻击 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基团的磷酸二酯键, 而 H592 则起到使  $\beta$ -和  $\gamma$ -磷酸之间的氧原子质子化的作用(图 9)。在 C1 区和 C2 区有 4 个高度保守的氨基酸形成的关键氢键: E623 与 H435, D470 与 H592。推测 E623 在选择 H435 旋转异构体和降低攻击 ATP 的 pKa 方面具有一定的作用。D470 的作用可能是结合和正确定位 H592。这一模型与以前的生化研究结果一致, 即突变体 H435Q 和 H592Q 未能自动磷酸化<sup>[18]</sup>。

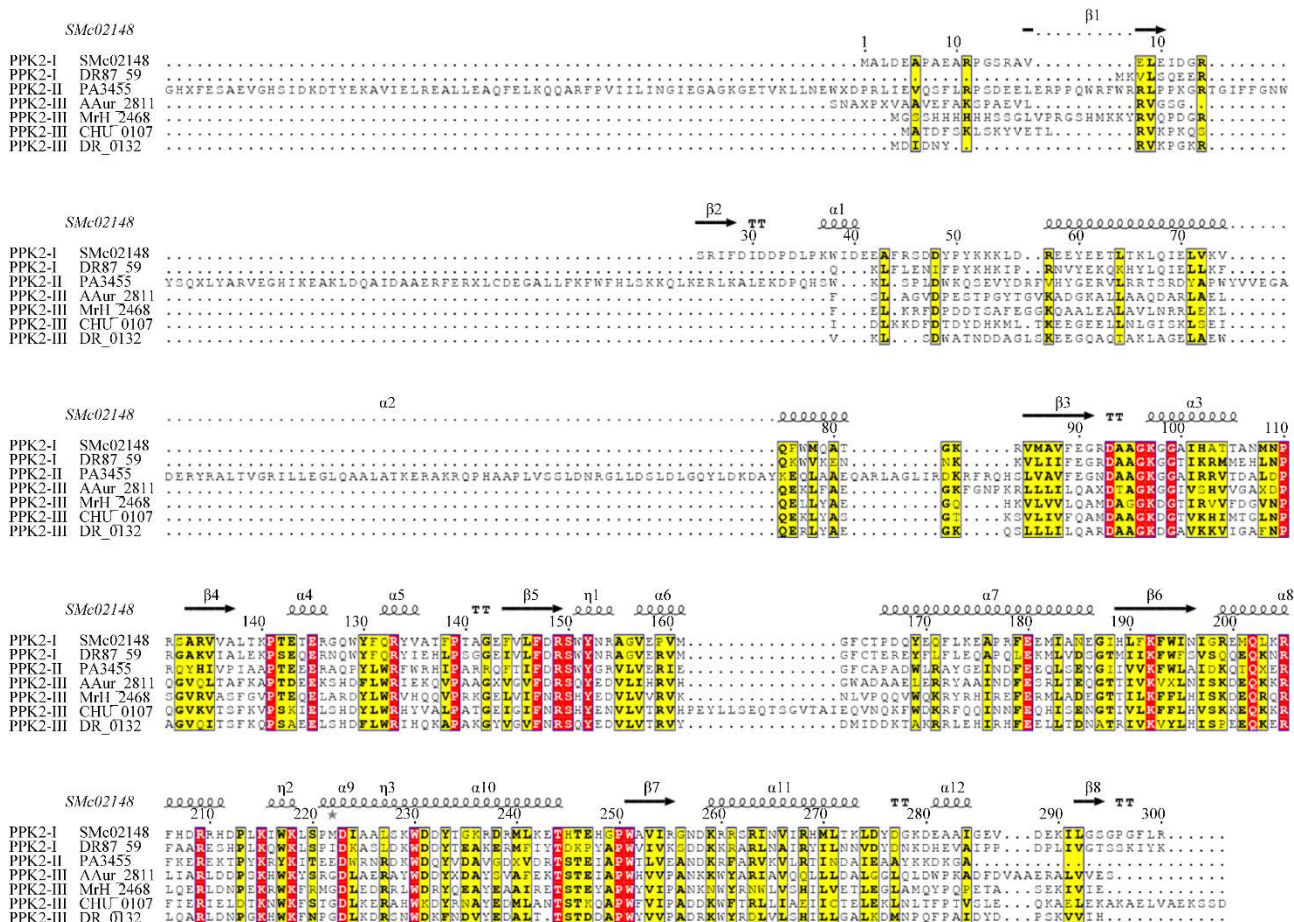


图7 PPK2的第I、II、III类蛋白质序列比对 该序列比对涉及 PPK2-I: SMC02148 和 DR87\_59; PPK2-II: PA3455; PPK2-III: AAur\_2811、MrH\_2468、CHU\_0107、DR\_0132

Figure 7 The diagram showing class I, II, and III protein sequence alignment of PPK2. The sequence alignment involves PPK2-I: SMC02148 and DR87\_59; PPK2-II: PA3455; PPK2-III: AAur\_2811, MrH\_2468, CHU\_0107, and DR\_0132.

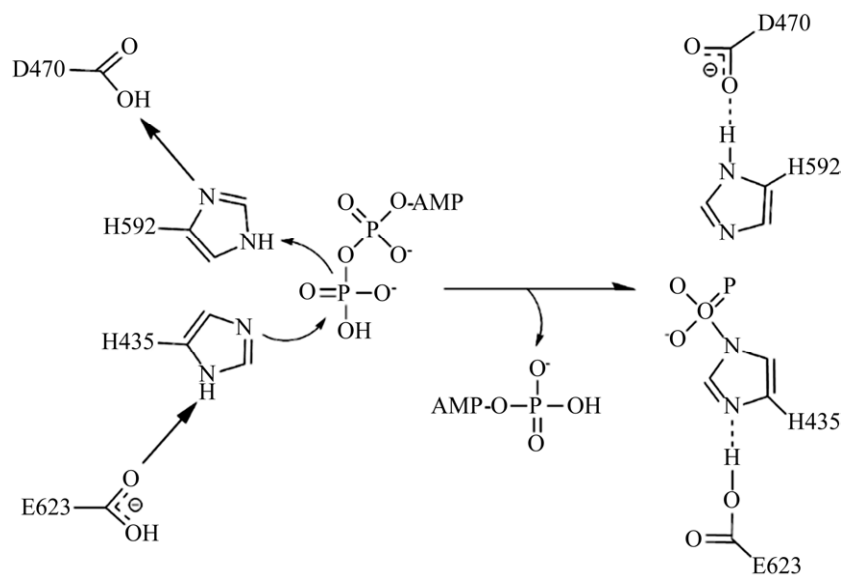


图 8 PPK1 催化机理解析 PPK1 自磷酸化的机制

Figure 8 Analysis of PPK1 catalytic mechanism. The proposed mechanism for PPK1 autophosphorylation.

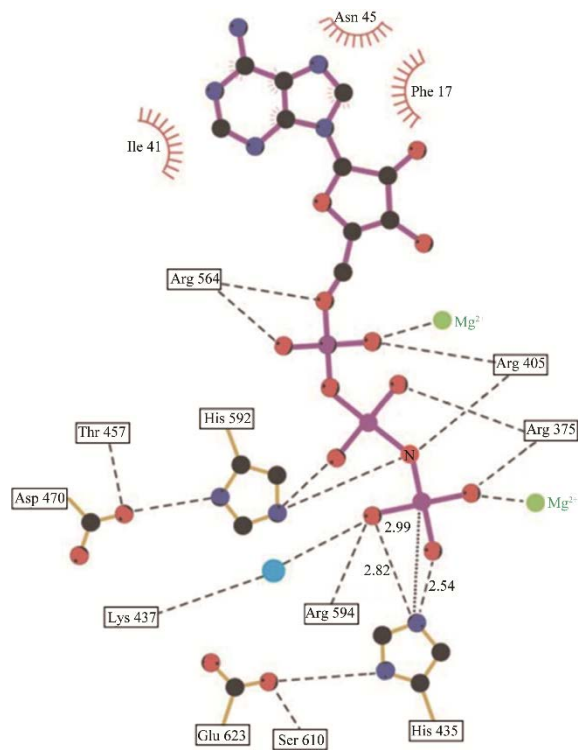


图 9 PPK1 催化机理的应用<sup>[10-12]</sup> 多聚磷酸激酶(PPK1)的 ATP 结合位点及其 PPK 自磷酸化的化学机制(截取文献[18]中的图 5 部分)

Figure 9 Application of PPK1 catalytic mechanism<sup>[10-12]</sup>. ATP-binding site of poly phosphate kinase (PPK) and the chemical mechanism for PPK autophosphorylation (screenshot of Figure 5 from literature [18]).

Kumble 等<sup>[22]</sup>的研究表明, 在大肠杆菌形成 Poly P 的过程中, ATP 末端磷酸基团先被转移到 PPK 的组氨酸残基 H441 和 H460 上形成一个磷酸酶中间体, 随后, 在 PPK 的作用下, 使 Poly P 的链长增加; 对 H441 和 H460 进行突变后发现突变体蛋白不具有合成 Poly P 的能力。对变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)的组氨酸标签蛋白分析发现其 PPK 与大肠杆菌的 PPK 具有相似的酶学特性, 所不同的是 *S. lividans* 的磷酸酶中间体可能是由 ATP 末端磷酸基团被转移到保守组氨酸残基 H517 和 H536 上而形成的。

### 1.3.2 PPK2 的催化机理

Nocek 等对 3 种不同宿主来源的 PPK2 [哈氏噬纤维菌(*C. hutchinsonii*) CHU\_0107、金色节杆菌(*A. aureus*) AAur\_2811 和耐辐射球菌(*D. radiodurans*) DR\_0142]结构进行分析比较<sup>[11]</sup>, 证实 PPK2 催化 AMP、ADP、GMP 和 GDP 的 Poly P 依赖性磷酸化为相应的核苷二磷酸和三磷酸; 并通过活性位点保守序列的分析以及分子间作用力<sup>[11]</sup>, 证明了来自 PPK2 核心和盖子结构域的几个保守残基的关键作用; 提出 PPK2 将 ADP 转化为 ATP 的催化机制, 首先由 PPK2、Poly P<sub>n</sub>、ADP 形成三元酶-底物复合物(图 10A),

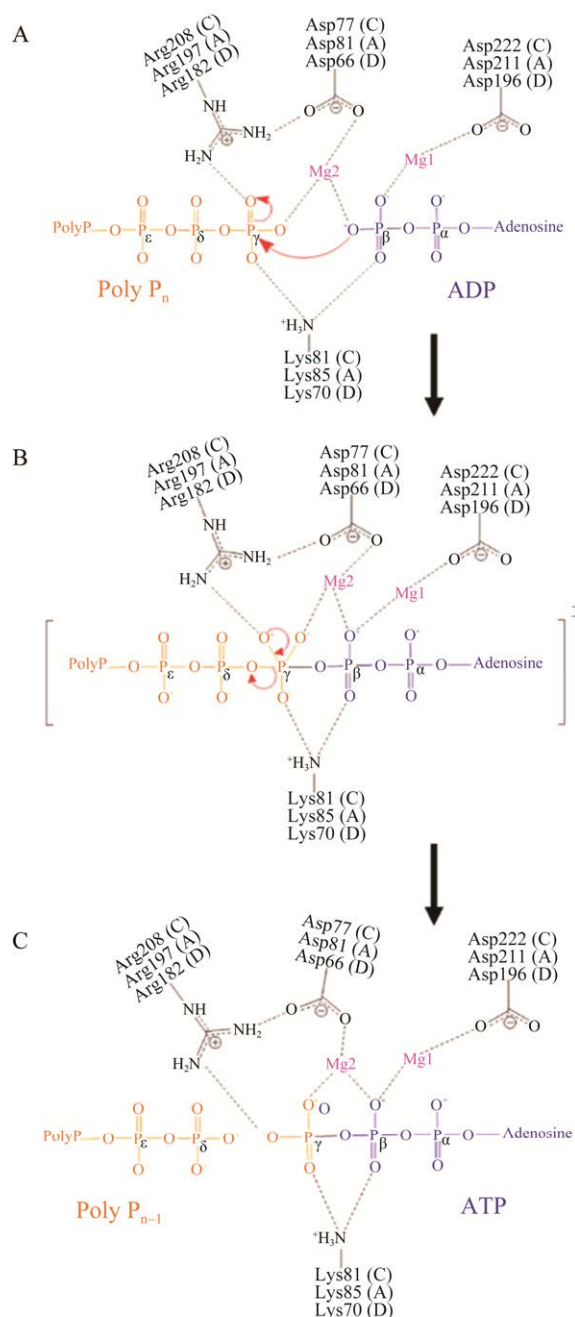


图 10 PPK2s 的催化机制: ADP 对 ATP 的多聚磷依赖性磷酸化<sup>[11]</sup> A: 三元酶-底物复合物 (PPK2+Poly P<sub>n</sub>+ADP). B: 过渡态中间体. C: 酶-产物复合物 (PPK2+Poly P<sub>n-1</sub>+ATP)

Figure 10 Proposed catalytic mechanism of PPK2s: Poly P-dependent phosphorylation of ADP to ATP<sup>[11]</sup>. A: Ternary enzyme-substrate complex (PPK2+poly P<sub>n</sub>+ADP). B: Transition-state intermediate. C: Enzyme-product complex (PPK2+poly P<sub>n-1</sub>+ATP).

通过桥接 Mg<sup>2+</sup> 离子 (DR0132 中的 Mg<sup>2+</sup>) 和几个参与磷酸盐结合、取向、转移和带正电荷的残基来完成匹配 (CHU0107 中的 Lys81、Arg133、Arg208、Lys214 和 Lys217; DR0132 中的 Lys70、Arg122、Arg182、Lys188 和 Lys191)。所有这些残基, 以及参与 Mg<sup>2+</sup> 配位的 2 个保守的 Asp 残基 (Asp77 和 Asp222), 接着由 ADP 的 β-磷酸氧对 Poly P 末端磷的亲核攻击引发形成过渡态中间体 (图 10B); 最后形成 PPK2、Poly P<sub>n-1</sub>、ATP 的酶-产物复合物 (图 10C)。反应最初, Poly P 和 ADP 与 2 个保守的天冬氨酸 (CHU0107 中的 Asp77 和 Asp222) 紧密结合在活性位点上。此外, Poly P 的转移端磷酸化基被 2 个保守的带正电荷的残基 (CHU0107 中的 Arg208 和 Lys81) 的侧链所稳定。

## 2 多聚磷酸激酶的分子改造及酶学性质

### 2.1 多磷酸激酶的分子改造

在工业环境下, 野生酶的酶学性质往往需要大幅提升, 特别是催化效率、底物选择性、对映选择性和热稳定性等, 例如 PPK2-III 类就存在活性低和对 ATP 催化效率低的问题, 通常采用蛋白质工程技术进行分子改造<sup>[28]</sup>。目前对多聚磷酸激酶的分子改造策略主要有理性设计、半理性设计和定向进化 3 个策略。理性设计对于酶结构、序列、机制的了解要求较高, 目前只有少数研究使用理性设计提高了 PPK2 的性能<sup>[29]</sup>。研究发现具有短 Poly P 使用能力的谷氨酸棒杆菌具有 2 个 PPK 基因, PPK2A (对应于 NCgl0880) 和 PPK2B (对应于 NCgl2620), 属于 PPK2 家族<sup>[12]</sup>, 其中 PPK2B 的过量表达会增加胞内 PPK 的整体活性及细胞 Poly P 含量 (即谷氨酸棒杆菌的 PPK2B 在 poly P 形成方向上的催化效率高于形成 ATP 的催化效率)。Cao 等<sup>[29]</sup>通过研究发现,



短 Poly P 分子会阻断 ADP 结合口袋入口的正电荷轨道,并与一个精氨酸(Arg154)相互作用,该精氨酸位于 PPK (*SMc02148*)晶体结构相似的位置。通过该现象,推论并找到了 ADP 分子在 PPK2 (*NCg12620*)中的替代结合位点(Lys-107、Glu-111 和 Thr-120),并将该构型使用到 PPK (*SMc02148*)上(H102K、A106E 和 V115T)创造了一个替代的 ADP 结合位点(*SMc02148-KET*),其三者动力学参数如表 1 所示。

相对于理性设计,定向进化不需要详细了解蛋白质结构信息,可以通过易错 PCR、DNA 重组等手段构建蛋白突变文库后再进行高通量筛选<sup>[30]</sup>,而半理性设计是目前实验室最常用的技术手段,依赖酶的结构,通过合理分析缩小筛选的范围<sup>[31]</sup>,选择合适的氨基酸位点进行突变改造<sup>[29]</sup>。例如 PPK2 家族的苜蓿中华根瘤菌(*SMc02148*) (PDB ID: 3CZQ)缺乏利用短链 Poly P 的能力,而 Cao 等<sup>[29]</sup>通过计算模拟和定点突变,设计出的突变体 PPK (*SMc02148-KET*)不仅对 ADP 形成三磷酸腺苷具有显著的活性,并在 ATP 再生的级联反应中,获得了高 GSH 滴度(38.79 mmol/L)和葡萄糖-6-磷酸滴度

(87.35 mmol/L),表明半理性设计的 PPK 为建立高效 ATP 再生系统提供了保证。

## 2.2 金属离子偏好性

### 2.2.1 金属离子对 PPK2-I 酶学性质影响

符合 PPK2-I 类型的酶如根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)<sup>[26]</sup>、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)<sup>[25]</sup>显示出  $Mg^{2+}$  依赖性,能够利用 Poly P 生成 ATP 或 GTP<sup>[4]</sup>。Kornberg 实验室将 PPK2-I 酶从铜绿假单胞菌裂解物中纯化后,对其进行了生化表征。与其他 2 个铜绿假单胞菌 PPK2 相比,PPK2-I 对二磷酸核苷磷酸化的偏好是 Poly P 合成的 75 倍<sup>[19]</sup>。在核苷二磷酸受体中,GDP 比 ADP 更受青睐,前者的米氏常数较后者大约低 2.5 倍。在核苷二磷酸方面,在最佳浓度(10 mmol/L)下  $Mg^{2+}$  比  $Mn^{2+}$  催化效率更高<sup>[28]</sup>,但在 Poly P 合成方面却相反, $Mn^{2+}$  将 PPK2 对 Poly P 合成速率提高到与 PPK1 相当的水平<sup>[27]</sup>。I 类谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) PPK2 也有类似的现象,添加  $Mn^{2+}$  时会表现出最佳的活性,但无论提供什么阳离子,它会优先从 ATP/GTP 合成 Poly P<sup>[12]</sup>。

表 1 PPK (*SMc02148*, PDB ID: 3CZQ)、PPK (*NCg12620*)和 PPK (*SMc02148*, PDB ID: 3CZQ-KET)的动力学参数<sup>[29]</sup>

Table 1 Kinetic parameters of PPK (*SMc02148*, PDBID: 3CZQ), PPK (*NCg12620*) and PPK (*SMC02148*, PDBID: 3CZQ-KET)<sup>[29]</sup>

Variable substrate	Constant substrate	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ (1/s)	$k_{cat}/K_m$ (L/(mol·s))
PPK ( <i>SMc02148</i> , PDB ID: 3CZQ)				
Poly P <sub>(4)</sub>	ADP	Not detectable	Not detectable	
ADP	Poly P	Not detectable	Not detectable	
PPK ( <i>NCg12620</i> )				
Poly P <sub>(4)</sub>	ADP	15.2±2.2	5.6±0.9	0.37
ADP	Poly P	0.03±0.003	9.1±0.7	303.30
PPK ( <i>SMc02148</i> , PDB ID: 3CZQ-KET)				
Poly P <sub>(4)</sub>	ADP	19.0±1.3	15.0±2.4	0.79
ADP	Poly P	2.3±0.5	2.9±0.5	1.26

2.2.2 金属离子对 PPK2-II 酶学性质的影响

PPK2-II 催化单磷酸核苷磷酸化，该家族中第一个被发现的成员是来自不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)<sup>[13]</sup>(AjPPK2)的酶，被称为 Poly P-AMP 磷酸转移酶(Poly P-AMP phosphotransferase, PAP)<sup>[17]</sup>，能够消耗 Poly P 也可以从 ADP 合成 Poly P。AjPPK2 的 Poly P 合成动力学参数( $K_m$  和  $k_{cat}$ )与 EcPPK1 相似。高浓度(100 mmol/L)的氯化镁有利于 Poly P 的消耗，而低水平(20 mmol/L)的氯化镁有利于 Poly P 的合成，再次表明细胞中金属离子可能有助于调节 PPK2 的反应偏好<sup>[32]</sup>。AjPPK2 后来被证明可以磷酸化 GMP 和 dAMP，但不能磷酸化 CMP、UMP 或 IMP<sup>[10]</sup>。其辅因子实验中， $Mg^{2+}$ 效果最佳， $Co^{2+}$ 和  $Ni^{2+}$ 的活性较弱，而  $Mn^{2+}$ 和  $Ca^{2+}$ 没有活性<sup>[26]</sup>。Sun 等<sup>[33]</sup>筛选到 PPK2-I 家族中一株来自嗜无机硫卵菌(*Sulfurovum lithotrophicum*)的 PPK (SI/PPK)，在不存在  $Mg^{2+}$  的情况下反应几乎没有进行；当  $Mg^{2+}$  浓度为 20 mmol/L 时达到最佳催化效率，10 mmol/L 腺苷的条件下 ATP 的产率可达 76.0%。

2.2.3 金属离子对 PPK2-III 酶学研究影响

III 类 PPK2 亚家族，能够磷酸化核苷单磷酸或二磷酸(AMP 和 ADP)。基于对这类新酶的系统发育预测，Motomura 等首先验证了来自 *Meiothermus silvanus*、*Deinococcus gethermalis*、*Thermosynechococcus elongatus* 和 *Deinococcus radiodurans* 的 PPK2 能够利用 Poly P 从 AMP 合成 ATP<sup>[14]</sup>。Nocek 等<sup>[11]</sup>新发现的 3 种 II 类酶：*Ch*PPK2、*Dr*PPK2 和 *Aa*PPK2 都对  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 和  $Ni^{2+}$ 表现出显著的活性，这表明与 I 类和 II 类酶相比，PPK2-III 似乎可以接受更广泛的金属离子作为辅助因子。

2.3 PPK2 的动力学参数

表 2 概述了已报道的与各种 PPK2 酶的 ATP 再生相关的动力学参数<sup>[15]</sup>。当以 ADP 为底物时，PPK2-III 的  $k_{cat}$  比以 AMP 为底物时要慢，*Mr*PPK 和 *Dr*PPK 的  $k_{cat}^{ADP}$  值在  $10^{-1} s^{-1}$  范围内。*Ch*PPK 和 *Aa*PPK 对 AMP 和 ADP 的催化效率相似，而 *Mr*PPK 和 *Dr*PPK 的  $k_{cat}/K_m^{AXP}$  比  $k_{cat}/K_m^{ADP}$  高两个数量级。因此，ADP 的磷酸化可以代表双功

表 2 PPK2-III 的动力学参数<sup>[15,33]</sup>  
Table 2 Kinetic parameters of PPK2-III<sup>[15,33]</sup>

Entry	PPK2-III	$K_m^{AMP}$ ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>[a]</sup>	$K_m^{ADP}$ ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>[b]</sup>	$k_{cat}^{AMP}$ (1/s) <sup>[a]</sup>	$k_{cat}^{ADP}$ (1/s) <sup>[b]</sup>	$k_{cat}/K_m^{AMP}$ (L/(mol·s)) <sup>[a]</sup>	$k_{cat}/K_m^{ADP}$ (L/(mol·s)) <sup>[b]</sup>	Relevant PDB	Relevant ligand
1	<i>Dt</i> PPK	120	>50	56	N.d.	4.7E+05	N.d.	N.d.	N.a.
2	<i>Dr</i> PPK	270	200	94.5	0.4	3.5E+05	2.0E+03	6AQE	ATP, $Mg^{2+}$
3	<i>Aa</i> PPK	830	170	21.2	4.1	2.5E+04	2.4E+04	3RHF	Citrate, $PO_4^{3-}$
4	<i>Ch</i> PPK	620	350	16.8	9.4	2.7E+04	2.7E+04	6ANH	G <sub>4</sub> P
5	<i>Mr</i> PPK	33	246	7.1	0.25	2.1E+04	1.0E+03	5O6M	ATP, $PO_4^{3-}$
6	<i>Lh</i> PPK	5 700		92		1.6E+01		5LC9	AMP
7	SI/PPK(PPK2-I)		610		140		2.3E+03	5LLF	ADP

[a] measured product was ADP. [b] measured product was ATP. Abbreviations: Polyphosphate kinase from *Delftia tsuruhatensis* (*Dt*PPK, PDB ID: N.d.), polyphosphate kinase from *Deinococcus radiodurans* (*Dr*PPK, PDB ID: 6AQE), polyphosphate kinase from *Arthrobacter aureus* (*Aa*PPK, PDB ID: 3RHF ), polyphosphate kinase from *Cytophaga hutchinsonii* (*Ch*PPK, PDB ID: 6ANH), polyphosphate kinase from *Meiothermus ruber* (*Mr*PPK, PDB ID: 5O6M), polyphosphate kinase from *Lamprospedia hyalina* (*Lh*PPK, PDB ID: 5LC9), polyphosphate kinase from *Sulfurovum lithotrophicum* (SI/PPK, PDB ID: 5LLF), guanosine 5'-tetrphosphate (G<sub>4</sub>P), not applicable (N.a.), not determined (N.d.).

能 PPKs 介导的从 AMP 产生 ATP 反应的决定步骤。而 PPK2 酶在 AMP 磷酸化的实验中, ATP 合成的延迟现象也支持这一结论<sup>[34-37]</sup>。通过比较不同来源的 PPK2 能够更有助于理解其是否通过损失活性与催化效率以保持更广泛的底物范围。

### 3 基于 PPK 的 ATP 再生体系构建

#### 3.1 PPK 再生 ATP 的双酶级联生物催化系统

基于 PPK 的 ATP 再生体系构建成功与否可根据生物催化的常用衡量标准进行评估<sup>[29]</sup>, 主要的技术经济指标有生物催化剂负载量、生物催化剂配比、底物负载和转化, 以及时空产率 [(space-time yield, STY) g/(L·h)]、生产规模等; 其次是辅因子的总周转数(total turnover, TTN), 通常认为, 辅因子的 TTN 需要达到  $10^2$  到  $10^5$ 。Kameda 等<sup>[38]</sup>利用多磷酸腺苷磷酸转移酶(PAP)和多磷酸激酶(PPK)设计了一种新的 ATP 再生系统, 命名为“PAP-PPK”ATP 再生系统。PAP 能催化 AMP 磷酸转化为 ADP, PPK 催化 ADP 形成 ATP。两种酶都使用无机多磷酸盐 Poly P 作为磷酸盐供体。在“PAP-PPK”ATP 再生系统中, 利用 Poly P 通过 PAP 和 PPK 的偶联反应由 AMP 连续合成 ATP, 该反应中, ATP 再生 39.8 次, 99.5% 的 CoA 转化为乙酰辅酶 A。“PAP-PPK”ATP 再生系统可以从 GMP 再生 GTP, 它也可以用作 GTP 再生系统。Strohmeier 等<sup>[35]</sup>开发了一种无细胞体系, 使用微小栖热菌的 *MrPPK* 和苜蓿中华根瘤菌 *SmPPK* 利用平均长度超过 12 的聚磷酸酯链作为供体从 AMP 生成 ATP, 并级联羧酸盐还原酶, 将不同的芳香族、杂环和脂肪族羧酸在水系中被定量还原成相应的醛。该研究还可以扩展酶法 ATP 再生系统的应用, 另一方面为生物催化合成 L-氨基酸等提供有效方法。例如, 李元等<sup>[36]</sup>利用来源于类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 的 PPK2 构建了共表达 ATP 再生和

L-茶氨酸合成酶的重组大肠杆菌菌株, 合成多聚磷酸盐激酶 (PPK) 和谷氨酰甲胺合成酶 (glutamylmethanimine synthetase, GMAS) 基因序列, 将表达重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 在 37 °C、pH 7.0 条件下, 使用 5 mmol/L 的 ATP 与 200 mmol/L 的 L-谷氨酸钠反应 24 h 后, L-茶氨酸的产率可达到 86.0%。

#### 3.2 PPK 再生 ATP 的多酶级联生物催化系统

关于体外利用 PPK 从 AMP 再生 ATP 的报道较少, 通常为小规模、低底物浓度的研究。Petchey 等<sup>[34]</sup>利用 ATP 依赖的酰胺键合成酶 *McbA*, 通过腺苷酸中间体, 可以在水介质中从羧酸和伯胺生物催化合成酰胺。该反应过程中 AMP 与 Poly P 作为磷酸供体在 *AjPPK2-II* 作用下转化为 ADP, *SmPPK2-I* 将 ADP 转化为 ATP 以实现能量循环, 底物转化率 >99%。Winkler 小组研究了基于 *SmPPK* 与 *MrPPK* 联合催化的 ATP 再生系统的 Poly P 需求, 该系统用于维持羧酸还原酶(carboxylate reductase, CARS)从羧酸中合成醛。研究表明, 根据所应用的回收模块, 需要大约 2 倍到 6 倍的 Poly P<sub>25</sub> (基于正磷酸盐单元和产品浓度)来推动反应完成<sup>[35,37]</sup>。Mordhorst 等<sup>[39]</sup>构建了具有 ATP 再生的酰基辅酶 A 再生系统, 该系统使用廉价的多磷酸盐作为单一能源, 约氏曲霉的多磷酸激酶 PPK2-II (*AjPPK2*)用于将 AMP 磷酸化为 ADP, 苜蓿中华根瘤菌 PPK2-I (*SmPPK2*)用于 ADP 磷酸化。再生的 ATP 可以被羧酸-CoA 连接酶用来产生另一种硫酯。在四酶级联中, 酰基辅酶 A 和 ATP 这两种辅因子, 每种可再生 2 000 次。

Citoler 等<sup>[40]</sup>通过 *SmPPK* 将 AMP 转化为 ADP, 利用 *MrPPK* 将 ADP 转化为 ATP 实现 ATP 循环, 并用由羧酸还原酶(CAR)和转氨酶( $\omega$ -TA)进行的串联级联来替代传统的脂肪酸胺化。*McCAR* 和 *Sp-TA* 在以正庚烷作为溶剂覆盖层的

双相系统中已成功与辅因子再循环酶偶联, 获得高达 96% 的底物转化率, 实现了碳链长度从 C6 到 C18 的饱和及不饱和脂肪酸的胺化。

因此, 当使用 AjPPK 作为冷冻干燥的无细胞提取物从 AMP 合成 ATP 时, Poly P 浓度增加 2.5 倍(从 200 mmol/L 到 500 mmol/L), 最终的 ATP 浓度也会相应增加<sup>[41]</sup>。而当使用 PPK2-III 酶作为 ATP 再生的双功能生物催化剂时, 需要过量的多磷酸盐(约 5 倍的产物浓度)以使反应转化率最大化<sup>[41]</sup>。PPK2-III 酶的系统也适用于短链多磷酸盐的积累和磷酸盐供体的低效使用。例如, 使用 PURE system™ 无细胞蛋白质合成系统与来自 *Cytophaga hutchinsonii* 的 PPK2-III 的 C 末端截短突变体相结合获得的蛋白质产量在 Poly P 使用后提高了约 25%。Sun 等<sup>[33]</sup>构建了从腺苷合成 ATP 的多酶体系, 利用来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 AtAdk 在少量 ATP 作为磷酸盐供体下将腺苷完全转化为 AMP, 在 PPK2-III 的 LhPPK (*Lamprospira hyalina*, DSM16112 (SHF67157.1)) 与 PPK2-I 家族中 SPPK 作用下, 将反应产生的 AMP、ADP 转化为 ATP, 整个体系在腺苷为 10 mmol/L 的条件下, ATP 的转化率可达 76.0%。

### 3.3 Poly P 性质对 ATP 再生体系的影响

在使用 PPKs 介导的 ATP 再生体系中, Poly P 是目前使用的最主要磷酸盐供体(天然聚合物), 普遍以不同链长的线状和环状磷酸盐形式存在<sup>[11,37]</sup>。商业上可用的 Poly P 聚磷酸盐是不同链长聚合物的混合物, 具有限定的平均链长, 如 Poly P<sub>n=25</sub>、Poly P<sub>n=45</sub>、Poly P<sub>n=65</sub>、Poly P<sub>n=100</sub> 和 Poly P<sub>n=700</sub> 等长链磷酸盐聚合物和焦磷酸盐、三磷酸盐、四磷酸盐等短链磷酸盐聚合物<sup>[14,42]</sup>。聚磷酸盐不仅可以作为磷酸盐供体, 还可以介导一些 PPK2 在溶液中的寡聚化并促进它们的稳定。链长在 10–100 之间的线性聚磷酸盐通常是 PPK2

催化的首选底物<sup>[43]</sup>。而利用 Poly P<sub>n<5</sub> 的 PPKs 极少<sup>[43–44]</sup>, CgPPK 和 SmPPK 是其中的代表, 分子对接研究表明 CgPPK 可以利用 Poly P<sub>n=4</sub> 是因为 PPK 亚基之间有一个不寻常的 ADP 结合位点; 而 SmPPK 对三磷酸盐显示出活性可能是由于 ADP 隧道入口处与短 Poly P 结合引起的<sup>[24]</sup>。

通常来说, 增加 Poly P 的浓度对 PPK 及消耗 ATP 的酶表现出抑制作用, 例如 Poly P 可以通过阻断酶的活性部位直接发挥其抑制作用<sup>[45]</sup>, 或通过螯合反应的二价阳离子间接地发挥抑制作用<sup>[10,45]</sup>。但也有研究表明, 有的反应需要较多的 Poly P 来驱动 ATP 合成反应的发生, 这种对 Poly P 的低效利用可能是因为部分 PPK 偏好较长链的聚磷酸盐, 这意味着添加的聚磷酸盐中只有一小部分可以作为“活性”磷酸盐供体, 短链聚磷酸盐则随着时间的推移而积累。为此, 可通过优化 Poly P 组成、分批补料 Poly P 和优化镁离子浓度等方法来解决。

### 3.4 PPK1 和 PPK2 在 ATP 合成和降解方面的平衡浓度

ATP 再生体系构建中, 存在 ATP 及 ADP 反应的动态平衡。Keppler 等<sup>[46]</sup>在 37 °C、pH 8 的条件下, 以 Poly P 为共底物, 将 EcPPK1 和 SmPPK2 作为模式酶分别与 ADP 和 ATP 反应, 90 min 后达到平衡, 延长反应时间不会进一步改变产物浓度。两种反应结果平衡都趋向于 70% 的 ATP 和 30% 的 ADP (摩尔比, ADP/ATP=0.43), 反应过程中大约产生 5% 的 AMP。霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) VcPPK1 催化的反应也有类似的平衡浓度(摩尔比, ADP/ATP=0.43)。谷氨酸棒杆菌 CgPPK2 氨基酸序列虽然是 PPK2, 但具有 PPK1 的动力学偏好。在 CgPPK2 催化的反应中, ADP/ATP 的比率(ADP/ATP=35%–40%: 65%–60%) (ADP 与 ATP 为体系 1, ADP 35% 时 ATP 65%; ADP 40% 时 ATP 60%), 其 AMP 的生成量比其他



PPKs 略高, 当以 ADP 为底物时 AMP 的生成量明显增高。这表明 CgPPK2 具有明显的肌酸激酶活性, 这种 PPK2 的副反应暂时还无法消除<sup>[11,47]</sup>。

## 4 总结与展望

本文介绍了不同类型 PPK 的结构特征、相关催化机制, 以及不同来源的 PPK 在酶活、催化效率、稳定性和底物偏好性的特征差异, 归纳了近些年通过酶分子改造方法提高 PPK 的稳定性、优化动力学参数、改变辅酶偏好性的研究, 为生物催化体系构建 ATP 再生体系提供了思路 and 基础。虽然通过蛋白质分子改造 PPK 后, 其酶学性质有所提升, 但是目前 PPK 应用于工业上的实例还比较少。PPK 工业化过程指标不仅需要考虑生物催化剂和产品的成本<sup>[24]</sup>, 还需要考察影响其催化过程的其他限制因素(如传质限制)等<sup>[10,44]</sup>。作为一种常见的 ATP 再生途径, PPK 与需要 ATP 的酶组成酶联反应体系的前景十分可观, 可解决 ATP 再生系统相关的问题。

通过系统比较不同来源 PPK 的结构、性质、反应机理等, 对 PPK 的工业化应用基础研究可侧重于以下 3 个方面: (1) 通过基因组挖掘、宏基因组筛选或蛋白质工程改造等方法筛选出酶活更高的野生型或突变体 PPK; (2) 利用蛋白质工程对 PPK 继续改造, 获得稳定性更强、对不同链长 Poly P 都有良好接受度的 PPK; (3) 研究主产物生产酶与 PPK 偶联后的最适反应条件, 根据主产物生产酶的特点匹配 PPK, 形成工业属性强的生物合成体系, 服务于工业生物制造。

## REFERENCES

- [1] KHAN JA, XIANG S, TONG L. Crystal structure of human nicotinamide riboside kinase[J]. *Structure*, 2007, 15(8): 1005-1013.
- [2] RATAJCZAK J, JOFFRAUD M, TRAMMELL SAJ, RAS R, CANELA N, BOUTANT M, KULKARNI SS, RODRIGUES M, REDPATH P, MIGAUD ME, AUWERX J, YANES O, BRENNER C, CANTÓ C. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13103.
- [3] BIEGANOWSKI P, BRENNER C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a preiss-handler independent route to NAD<sup>+</sup> in fungi and humans[J]. *Cell*, 2004, 117(4): 495-502.
- [4] NEVILLE N, ROBERGE N, JIA ZC. Polyphosphate kinase 2 (PPK<sub>2</sub>) enzymes: structure, function, and roles in bacterial physiology and virulence[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 670.
- [5] ACHBERGEROVÁ L, NAHÁLKA J. PPK<sub>1</sub> and PPK<sub>2</sub>—which polyphosphate kinase is older?[J]. *Biologia*, 2014, 69(3): 263-269.
- [6] 袁林江, 周国标, 南亚萍. 微生物聚磷及其酶学调控[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(7): 1955-1962.  
YUAN LJ, ZHOU GB, NAN YP. Review on microbial polyphosphate accumulation and its enzymological regulation[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(7): 1955-1962 (in Chinese).
- [7] 黄金玲, 魏峥, 于常海. 多聚磷酸相关蛋白结构及生物学功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(2): 115-124.  
HUANG JL, WEI Z, YU CH. The structure and biological function of polyphosphate-related proteins[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 30(2): 115-124 (in Chinese).
- [8] ISHIGE K, ZHANG HY, KORNBERG A. Polyphosphate kinase (PPK<sub>2</sub>), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(26): 16684-16688.
- [9] ANDEXER JN, RICHTER M. Emerging enzymes for ATP regeneration in biocatalytic processes[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2015, 16(3): 380-386.
- [10] RESNICK SM, ZEHNDER AJB. *In vitro* ATP regeneration from polyphosphate and AMP by polyphosphate: amp phosphotransferase and adenylate kinase from *Acinetobacter johnsonii* 210A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2045-2051.
- [11] NOCEK BP, KHUSNUTDINOVA AN, RUSZKOWSKI M, FLICK R, BURDA M, BATYROVA K, BROWN G,

- MUCHA A, JOACHIMIAK A, BERLICKI Ł, YAKUNIN AF. Structural insights into substrate selectivity and activity of bacterial polyphosphate kinases[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(11): 10746-10760.
- [12] LINDNER SN, VIDAURRE D, WILLBOLD S, SCHOBERTH SM, WENDISCH VF. NCgl2620 encodes a class II polyphosphate kinase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(15): 5026-5033.
- [13] BONTING CF, KORTSTEE GJ, ZEHNDER AJ. Properties of polyphosphate: amp phosphotransferase of *Acinetobacter* strain 210A[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(20): 6484-6488.
- [14] MOTOMURA K, HIROTA R, OKADA M, IKEDA T, ISHIDA T, KURODA A. A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (class III PPK<sub>2</sub>) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(8): 2602-2608.
- [15] TAVANTI M, HOSFORD J, LLOYD RC, BROWN MJB. Recent developments and challenges for the industrial implementation of polyphosphate kinases[J]. ChemCatChem, 2021, 13(16): 3565-3580.
- [16] OGAWA M, UYEDA A, HARADA K, SATO Y, KATO Y, WATANABE H, HONDA K, MATSUURA T. Class III polyphosphate kinase 2 enzymes catalyze the pyrophosphorylation of adenosine-5'-monophosphate[J]. ChemBioChem: a European Journal of Chemical Biology, 2019, 20(23): 2961-2967.
- [17] NAHÁLKA J, PĚTOPRSTÝ V. Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK<sub>3</sub>)[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2009, 7(9): 1778-1780.
- [18] ZHU Y, HUANG WJ, LEE SSK, XU WQ. Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis[J]. EMBO Reports, 2005, 6(7): 681-687.
- [19] ZHANG HY, ISHIGE K, KORNBERG A. A polyphosphate kinase (PPK<sub>2</sub>) widely conserved in bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(26): 16678-16683.
- [20] RAO NN, GÓMEZ-GARCÍA MR, KORNBERG A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival[J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78: 605-647.
- [21] FERRIER R J. Synthetic carbohydrate chemistry of the 1980s[J]. Carbohydrate Research, 1990, 202: ix-xi.
- [22] KUMBLE KD, AHN K, KORNBERG A. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(25): 14391-14395.
- [23] BROWN MRW, KORNBERG ARTHUR. The long and short of it-polyphosphate, PPK and bacterial survival[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2008, 33(6): 284-290.
- [24] LEIPE DD, KOONIN EV, ARAVIND L. Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 333(4): 781-815.
- [25] SUREKA K, DEY S, DATTA P, SINGH AK, DASGUPTA A, RODRIGUE S, BASU J, KUNDU M. Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(2): 261-276.
- [26] NOCEK B, KOCHINYAN S, PROUDFOOT M, BROWN G, EVDOKIMOVA E, OSIPIUK J, EDWARDS AM, SAVCHENKO A, JOACHIMIAK A, YAKUNIN AF. Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(46): 17730-17735.
- [27] PARNELL AE, MORDHORST S, KEMPER F, GIURRANDINO M, PRINCE JP, SCHWARZER NJ, HOFER A, WOHLWEND D, JESSEN HJ, GERHARDT S, EINSLE O, OYSTON PCF, ANDEXER JN, ROACH PL. Substrate recognition and mechanism revealed by ligand-bound polyphosphate kinase 2 structures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(13): 3350-3355.
- [28] BORNSCHEUER UT, HUISMAN GW, KAZLAUSKAS RJ, LUTZ S, MOORE JC, ROBINS K. Engineering the third wave of biocatalysis[J]. Nature, 2012, 485(7397): 185-194.
- [29] CAO H, NIE KL, LI CC, XU HJ, WANG F, TAN TW, LIU L. Rational design of substrate binding pockets in polyphosphate kinase for use in cost-effective ATP-dependent cascade reactions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(13): 5325-5332.
- [30] STEMMER WP. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution[J]. Proceedings of the National

- Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(22): 10747-10751.
- [31] XIA YY, CUI WJ, CHENG ZY, PEPLOWSKI L, LIU ZM, KOBAYASHI M, ZHOU ZM. Improving the thermostability and catalytic efficiency of the subunit-fused nitrile hydratase by semi-rational engineering[J]. *ChemCatChem*, 2018, 10(6): 1370-1375.
- [32] ITOH H, SHIBA T. Polyphosphate synthetic activity of polyphosphate: amp phosphotransferase in *Acinetobacter johnsonii* 210A[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(15): 5178-5181.
- [33] SUN CQ, LI ZL, NING X, XU WT, LI ZM. *In vitro* biosynthesis of ATP from adenosine and polyphosphate[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 117.
- [34] PETCHEY MR, ROWLINSON B, LLOYD RC, FAIRLAMB IJS, GROGAN G. Biocatalytic synthesis of moclobemide using the amide bond synthetase McbA coupled with an ATP recycling system[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(8): 4659-4663.
- [35] STROHMEIER GA, EITELJÖRG IC, SCHWARZ A, WINKLER M. Enzymatic one-step reduction of carboxylates to aldehydes with cell-free regeneration of ATP and NADPH[J]. *Chemistry-a European Journal*, 2019, 25(24): 6119-6123.
- [36] 李元, 刘珊, 祝俊. PPK 和 GMAS 共表达重组菌株的构建及其在 L-茶氨酸合成中的应用[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(12): 1745-1749.
- LI Y, LIU S, ZHU J. Construction of recombinant strains co-expressing PPK and GMAS for the synthesis of L-theanine[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(12): 1745-1749 (in Chinese).
- [37] STROHMEIER GA, SCHWARZ A, ANDEXER JN, WINKLER M. Co-factor demand and regeneration in the enzymatic one-step reduction of carboxylates to aldehydes in cell-free systems[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 307: 202-207.
- [38] KAMEDA A, SHIBA T, KAWAZOE Y, SATOH Y, IHARA Y, MUNEKATA M, ISHIGE K, NOGUCHI T. A novel ATP regeneration system using polyphosphate-AMP phosphotransferase and polyphosphate kinase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(6): 557-563.
- [39] MORDHORST S, MAURER A, POPADIĆ D, BRECH J, ANDEXER JN. A flexible polyphosphate-driven regeneration system for coenzyme a dependent catalysis[J]. *ChemCatChem*, 2017, 9(22): 4164-4168.
- [40] CITOLER J, DERRINGTON SR, GALMAN JL, BEVINAKATTI H, TURNER NJ. A biocatalytic cascade for the conversion of fatty acids to fatty amines[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(18): 4932-4935.
- [41] TAVANTI M, HOSFORD J, LLOYD RC, BROWN MJB. ATP regeneration by a single polyphosphate kinase powers multigram-scale aldehyde synthesis *in vitro*[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(2): 828-837.
- [42] WOODLEY JM. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(12): 4733-4739.
- [43] HILDENBRAND JC, TELEKI A, JENDROSSEK D. A universal polyphosphate kinase: PPK2c of *Ralstonia eutropha* accepts purine and pyrimidine nucleotides including uridine diphosphate[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(15): 6659-6667.
- [44] SELEY-RADTKE KL, YATES MK. The evolution of nucleoside analogue antivirals: a review for chemists and non-chemists. Part 1: early structural modifications to the nucleoside scaffold[J]. *Antiviral Research*, 2018, 154: 66-86.
- [45] MAHOUR R, KLAPPROTH J, REXER TFT, ANNA S, STEFFEN K, MARKUS P, ERDMANN R, UDO R. Establishment of a five-enzyme cell-free cascade for the synthesis of uridine diphosphate N-acetylglucosamine[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 283: 120-129.
- [46] KEPPLER M, MOSER S, JESSEN HJ, HELD C, ANDEXER JN. Make or break: the thermodynamic equilibrium of polyphosphate kinase-catalysed reactions[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2022, 18: 1278-1288.
- [47] MORDHORST S, SINGH J, MOHR MKF, HINKELMANN R, KEPPLER M, JESSEN HJ, ANDEXER JN. Several polyphosphate kinase 2 enzymes catalyse the production of adenosine 5'-polyphosphates[J]. *ChemBioChem: a European Journal of Chemical Biology*, 2019, 20(8): 1019-1022.

(本文责编 郝丽芳)