

# 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

廖一波, 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:** 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (Nicotinamide phosphate ribose transferase, Nampt) 是生物酶法合成烟酰胺单核苷酸 (Nicotinamide ribotide, NMN) 中重要的酶, 催化烟酰胺 (Nicotinamide, NAM) 和磷酸核糖焦磷酸 (Phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP) 合成 NMN。本研究将来源 *Meiothermus ruber* 的 Nampt 在大肠杆菌系统进行胞内表达, 表达产物经纯化后进行酶学性质分析, 并进一步将其用于催化合成 NMN。将重组菌株在 16 °C 低温下进行摇瓶水平诱导 21 h, 收集发酵菌体并进行超声破碎, 破碎后上清利用 Ni-NTA 螯合亲和层析的方法进行纯化, SDS-PAGE 结果显示表达与纯化后的产物大小约 55 ku, 与预期的蛋白分子量相符。重组 Nampt 的最适反应温度为 45 °C, 最适 pH 为 6。酶动力学分析显示, 该酶对底物 NAM 催化的  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $k_{cat}$  分别是 0.39  $\mu\text{mol/L}$ 、3.20  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 、1.39 1/s。使用该酶催化生产 NMN, 通过反应中补加一次底物 PRPP, 反应 10 min 产物 NMN 产量可达 30 mg/L。本研究成功表达一个酶学性质和热稳定性优良的 Nampt, 并将其应用在单酶催化生产 NMN 时有较高的产量和生产效率, 为生物酶法合成 NMN 的应用研究奠定了基础。

**关键词:** 烟酰胺磷酸核糖转移酶; 烟酰胺单核苷酸; 大肠杆菌

文章编号: 1673-9078(2021)02-87-93

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0239

## Expression of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli* and Catalytic Synthesis of Nicotinamide Mononucleotide

LIAO Yi-bo, WU Min-hui, LING Shu-li, LIN Ying

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

**Abstract:** Nicotinamide phosphate ribose transferase (Nampt) is an important enzyme in the bioenzymatic synthesis of nicotinamide ribotide (NMN), and is used to catalyze the synthesis of NMN from nicotinamide (NAM) and phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP). In this study, Nampt from *Meiothermus ruber* was expressed intracellularly in the *Escherichia coli* expression system, and the expressed product was purified for the examinations of enzymatic properties and catalysis for the synthesis of NMN. Recombinant strains were induced in shake flasks at a low temperature (16 °C) for 21 h. The fermented cells were collected and disrupted ultrasonically. After the disruption, the supernatant was purified by Ni-NTA chelation affinity chromatography. SDS-PAGE results showed that the size of the expressed and purified product was about 55 ku (which was consistent with the expected protein molecular weight). The optimal reaction temperature of the recombinant Nampt was 45 °C, with the optimal pH as 6. Enzyme kinetic analysis showed that the  $K_m$ ,  $V_{max}$ , and  $k_{cat}$  of the enzyme on the substrate NAM were 0.39  $\mu\text{mol/L}$ , 3.20  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ , and 1.39 1/s, respectively. The enzyme was used to catalyze the production of NMN, and the product NMN yield could reach 30 mg/L with an addition of the substrate PRPP within the 10 min reaction. In this study, a Nampt with excellent enzymatic

引文格式:

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, 2020, 37(2): 87-93

LIAO Yi-bo, WU Min-hui, LING Shu-li, et al. Expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli* and catalytic synthesis of nicotinamide mononucleotide [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 87-93

收稿日期: 2020-03-14

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020210001)

作者简介: 廖一波 (1994-), 男, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 林影 (1962-), 女, 博士, 教授, 酶学与酶工程

properties and thermal stability was successfully expressed, and applied to a single enzyme-catalyzed production of NMN with a higher yield and production efficiency. This research has laid the foundation for the application of bioenzymatic synthesis of NMN.

**Key words:** nicotinamide phosphoribosyl transferase; nicotinamide mononucleotide; *Escherichia coli*

近年来, 具有调节III型蛋白赖氨酸脱乙酰酶 (Sirtuins) 活性能力的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 被认为具有治疗癌症、帕金森病、肥胖、糖尿病及其他衰老相关疾病的潜力, NAD是Sirtuins唯一的底物, NAD的水平高低直接决定了Sirtuins家族的活性, 而Sirtuins活性又对细胞寿命有着重要的影响<sup>[1-5]</sup>。但NAD难以直接进入细胞, 因此需要通过补充其前体来提高NAD在细胞中含量, 从而起到抗衰老等作用。在NAD各前体中, NMN在口服管饲小鼠实验中提高胞内NAD的效果最佳, 30 min内NMN可以被迅速吸收并有效转化为主要代谢组织中的NAD, 因此适合作为NAD补充剂<sup>[4,5]</sup>。NMN广泛存在于蔬菜、真菌、肉类和虾中等天然食物中, 且在长时间干预期中, NMN未显示有任何明显的毒性和副作用, 具有较高的食品安全性<sup>[6]</sup>。加工特性研究发现, NMN在水中或乳中, 75℃处理5 min, 活性稳定; 95℃处理5 min后活性损失约20%, 表明在巴氏杀菌乳中添加NMN具有可行性。日本的Megumi开发了NMN与白藜芦醇的食物组合物, 实验表明具有可以降低血液中总胆固醇含量、减少血液中尿酸含量等作用<sup>[4,6,7]</sup>。

生产NMN的方法中, 生物酶法因无有机溶剂残留也不存在手性问题, 成为最环保无公害的生产方法。

然而利用生物酶法生产NMN仍然存在一些限制。Namppt催化烟酰胺和磷酸核糖焦磷酸合成NMN, 但已报道的来源较少。Emmanuel的研究表明在ATP水解与NMN合成的弱偶联下, 人源的Namppt合成NMN的系统催化效率可以提高了1100倍, 与底物NAM亲和力也大幅度增加<sup>[8]</sup>。近年来也有表达Namppt应用于生产NMN的研究报道, George在大肠杆菌中单独过表达分别来源于*Mus musculus*, *Shewanella oneidensis*和*Haemophilus ducreyi*的Namppt, 补加底物NAM, 边发酵边生产NMN。其中过表达*Haemophilus ducreyi*来源的Namppt的大肠杆菌NMN产量可达14.33 mg/L培养液<sup>[9]</sup>。筛选和表达一个酶学性质优良、稳定的Namppt酶, 成为生物酶法合成NMN的关键。

本研究采用大肠杆菌系统表达来源*Meiothermus ruber*的Namppt, 该酶在前期经过同源建模以及和底物小分子NAM的分子对接等一系列手段进行评估, 发现来源于嗜热菌*Meiothermus ruber*可能是高效稳定催化生产NMN的酶元件。本研究采用大肠杆菌系统表达来源*Meiothermus ruber*的Namppt, 在测定该酶酶学特性的基础上进行单酶催化生产NMN, 旨在挖掘一个酶学性质优良、稳定的Namppt, 为NMN酶法合成提供研究基础。

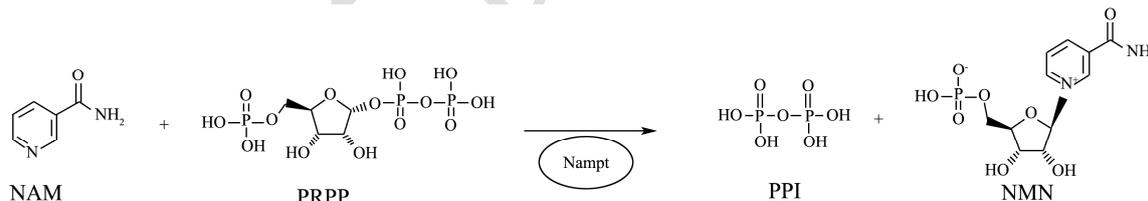


图1 Namppt催化反应示意图

Fig.1 Schematic of Namppt-catalyzed reaction

注: NAM为烟酰胺; PRPP为磷酸核糖焦磷酸; PPI为焦磷酸; NMN为烟酰胺单核苷酸。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

克隆宿主菌*Escherichia coli* Top10、表达宿主菌*E. coli* BL21 (DE3)、表达载体pET-30a(+)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 主要试剂和培养基

限制性内切酶*Nde* I和*Not* I、KOD DNA聚合

酶、DNA Marker、标准分子量蛋白质购自TaKaRa公司; Bradford蛋白浓度测定试剂盒购自GeneRay公司; IPTG、质粒提取试剂盒, 凝胶回收试剂盒购自Magen公司; 卡那霉素(KAN)购自上海生工生物工程有限公司; 烟酰胺购于Sigma公司, 磷酸核糖焦磷酸购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 其余试剂均为分析纯。

#### 1.1.3 仪器与设备

SKY2102S小容量恒温培养摇床, 上海速坤仪器仪表有限公司; 5804R型高速冷冻台式离心机, 德国

Eppendorf 公司; AKTA 蛋白纯化系统, 美国通用电气公司; PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; HisTrap FF crude 预装柱, 美国通用电气公司; 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 pET-30a(+)-nampt 载体构建及鉴定

从 NCBI 上找到来源 *Meiothermus ruber* 的 Nampt 的氨基酸序列 (GenBank: ADD29592.1), 对编码的基因进行密码子优化, 优化后的基因合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。在基因上下游分别引入 *Nde* I 和 *Not* I 这两个限制性核酸内切酶位点, 基因 N 端引入 6\*His-Tag 标签, 将合成的基因克隆至 pET-30a(+) 的 *Nde* I 和 *Not* I 位点间, 获得的重组质粒命名为 pET-30a(+)-nampt。对重组质粒进行双酶切鉴定及测序再次确定后, 将鉴定后的质粒转入 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 在卡那霉素抗性平板上挑取单菌落培养, 提取质粒并双酶切鉴定, 将验证正确的菌种于 -80 °C 甘油管保藏。

### 1.2.2 目的蛋白的表达、纯化及 SDS-PAGE 分析

挑取活化的重组大肠杆菌 BL21(DE3) /pET30a(+)-nampt 单菌落于 10 mL 含 50 μg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min, 培养 12~15 h。将过夜培养的菌液按 2% 的接种量转接至 100 mL 含 50 μg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6~0.8。加入 1 mol/L IPTG 至终浓度为 0.20 mmol/L, 16 °C, 180 r/min 条件下诱导培养 21 h。

将发酵液 7800 r/min 离心 7 min, 弃上清后, 用蒸馏水将菌体洗涤 1 次后加入 10 mL Buffer A 缓冲液悬浮细胞。在冰浴条件下利用超声波细胞破碎机对重组大肠杆菌进行破碎, 破碎条件: 6 mm 变幅杆, 40 min, 10 mL 菌体悬浮液。对破碎后的悬浮液进行冷冻离心, 10000 r/min, 4 °C, 30 min, 分离上清和沉淀, 4 °C 保存待用。

利用 Ni 亲和层析的方法, 对预处理后的菌体破碎上清进行纯化。安装好 Ni 柱 (His Tag<sup>TM</sup> FF), 用 4 倍柱体积的超纯水冲洗至基线平, 接着用 Buffer B 冲洗至基线平, 再用 Buffer A 清洗至基线平, 然后以恒定 3 mL/min 的流速上样, 最后以一定浓度的 Buffer B (预实验中确定最佳浓度为 80%) 将目的蛋白洗脱并收集。用 5 倍柱体积的超纯水冲洗至基线平, 最后 20% 乙醇冲洗保存柱子和系统, 卸柱, 关闭系统, 卸下的柱子置于 4 °C 冰箱保存。纯化后样品进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.2.3 酶活力测定

采用荧光检测法测定 Nampt 酶活性<sup>[9,10]</sup>。

酶反应体系: 1.5 mL 离心管中加入 3.45 μL 1 mol/L Tris-HCl、1.38 μL 1% BSA、0.83 μL 1 mol/L MgCl<sub>2</sub>、1.38 μL 0.1 mol/L ATP、0.28 μL 0.1 mol/L PRPP、1.38 μL 0.1 mol/L 二硫苏糖醇、58.10 μL 纯水、1.5 μL 稀释一定倍数的纯酶液、0.69 μL 200 μmol/L NAM。在恒温振荡仪中反应, 45 °C, 15 min。设置纯水代替酶液的反应体系为空白对照。

中止酶反应: 将离心管于 95 °C 水浴 1 min 灭活酶。

产物 NMN 衍生物反应: 往离心管中加入 27.7 μL 2 mol/L KOH, 再加入 27.7 μL 20% 苯乙酮, 短暂涡旋混匀后置于冰中充分冰浴 2 min。加入 125 μL 88% 甲酸, 低速短暂离心, 在恒温振荡仪中反应, 37 °C, 10 min。

测定荧光: 吸取离心管中 240 μL 液体至黑色 96 孔板测定孔中, 用 Tecan 多功能酶标仪在激发光 382 nm, 发射光 445 nm 下测定荧光。

标准曲线: 配置若干个 0~1 μmol/L 浓度梯度的 NMN 水溶液, 每个 69 μL。每个离心管中加入 27.7 μL 2 mol/L KOH, 再加入 27.7 μL 20% 苯乙酮, 短暂涡旋混匀后置于冰中充分冰浴 2 min。加入 125 μL 88% 甲酸, 低速短暂离心, 在恒温振荡仪中反应, 37 °C, 10 min。吸取离心管中 240 μL 液体至黑色 96 孔板测定孔中, 用 Tecan 多功能酶标仪在激发光 382 nm, 发射光 445 nm 下测定荧光。以纯水作为空白对照。根据 NMN 浓度和对应的荧光值作标准曲线。

计算: 结合测定荧光值和标准曲线计算酶活。酶活力单位 (1 U) 定义为: 在上述条件下, 每分钟生成 1 μmol 产物 NMN 所需的酶量。

### 1.2.4 Nampt 最适温度、最适 pH、热稳定性研究

为确定温度对酶活的影响, 在 pH 8.0 条件下, 测定不同温度下 (20、25、30、37、40、45、50、60、65、70 °C) Nampt 的酶活力。以超纯水为空白对照, 每个样品平行操作三次, 绘制温度-相对酶活力曲线。为确定 pH 对酶活的影响, 在 45 °C 条件下, 测定在不同 pH 条件下 (5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、9、10) Nampt 的酶活力。以纯水代替酶液的反应体系为空白对照, 每个样品平行操作三次, 绘制 pH-相对酶活力曲线。

为确定该酶的热稳定性, 在 45 °C, pH 6 条件下, 测定相同浓度的酶在不同温度 (45、50 °C) 下保温不同时间 (15、30、60、90、120 min) 的残余酶活力, 以 0 min 未处理的酶液酶活作为 100%, 以相对酶活力

为纵坐标, 每个试验点重复三次测定, 绘制时间-残余酶活曲线。

为确定该酶的 pH 稳定性, 在 45 °C, pH 6 条件下, 测定相同浓度的酶在不同 pH (5.5、6.0、6.5) 下保温不同时间 (15、30、60、90、120 min) 的残余酶活力, 以 0 min 未处理的酶液酶活作为 100%, 以相对酶活力为纵坐标, 每个试验点重复三次测定, 绘制时间-残余酶活曲线。

### 1.2.5 动力学参数测定

为测定烟酰胺 (NAM) 作为底物时 *Nampt* 的动力学参数, 按照“1.2.3”反应体系与方法, 设置若干个不同底物 NAM 浓度 (0.039~20 μmol/L) 的反应体系。以纯水代替酶液的反应体系为空白对照, 使用双倒数作图法, 将酶促反应速度的倒数对底物 NAM 浓度的倒数的作图, 得到  $K_m$  及  $V_{max}$  值。

### 1.2.6 *Nampt* 单酶催化生产 NMN

反应在 2 mL 离心管内进行。反应体系为 1.5 mL, 主要包括终浓度为 50 mmol/L Tris-HCl pH 6、0.1 mmol/L NAM、0.1 mmol/L PRPP、12 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2 mmol/L ATP、一定量的 *Nampt* 酶。45 °C 下反应, 每隔一定时间取样, 根据“1.2.3”方法测定荧光值, 以计算 NMN 的产量。

### 1.2.7 数据统计分析

酶活力测定以及反应合成 NMN 设置三个平行, 数据值为三个平行样品的平均值, 用误差线表示标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒 pET-30a(+)-*nampt* 的构建及鉴定

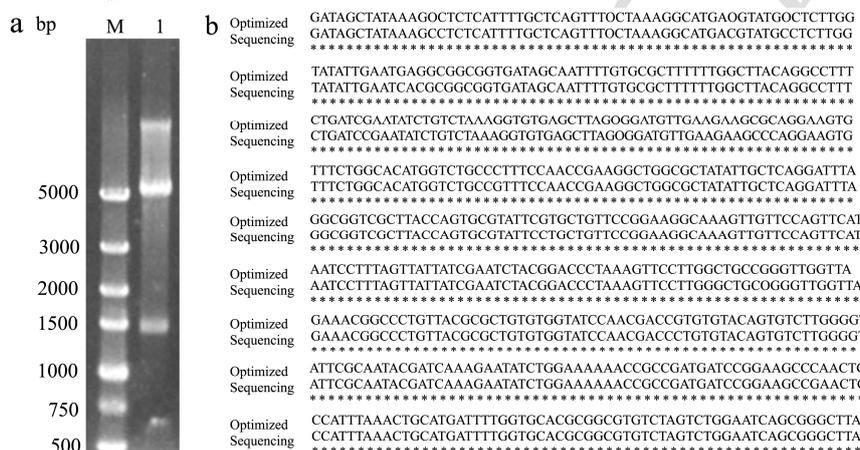


图 2 重组质粒 pET-30a(+)-*nampt* 的双酶切鉴定与序列测定结果

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pET-30a(+)-*nampt* by enzyme digestion and sequence determination results

注: a 为重组质粒双酶切鉴定图; b 为序列测定结果。

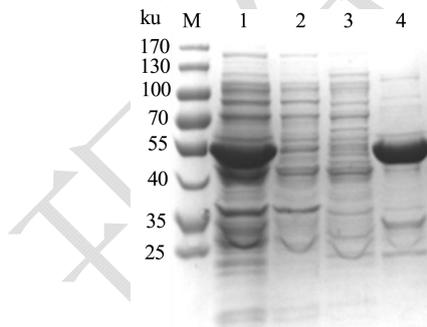


图 3 SDS-PAGE 分析 *Nampt* 表达与纯化

### Fig.3 SDS-PAGE analysis of *Nampt* expression and purification

注: 1 为 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*nampt* 破碎上清; 2 为 BL21(DE3)/pET-30a(+)-破碎上清; 3 为亲和层析流穿液成分; 4 为 80% BufferB 洗脱收集的纯化样品。

将合成的基因克隆至 pET-30a(+)-获得重组质粒, 对构建好的质粒进行双酶切鉴定, 结果如图 2a: 双酶切产物的大小分别有约 5000 bp 及约 1500 bp 的条带,

与预期大小相符。将重组质粒, 送至上海生工生物工程有限公司进行测序, 测序结果与密码子优化的目的基因 *nampt* 比对结果如图 2b 所示, 可以得出结论 pET-30a(+)-*nampt* 构建成功。将鉴定后的质粒转入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞, 在卡那霉素抗性平板上挑取单菌落培养, 提取质粒并双酶切鉴定, 将验证正确的菌种于 -80 °C 甘油管保藏。

### 2.2 目的蛋白的诱导表达、纯化、比酶活测定

根据方法“1.2.2”对 *Nampt* 酶重组菌进行发酵, 重组 BL21(DE3)/pET30a(+)-与 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*nampt* 发酵后离心收集菌体, 经超声破碎仪破碎后, 将细胞破碎液在 10000 r/min, 4 °C 条件下离心 60 min, 并收集离心上清液。上清液利用 AKTA 蛋白纯化系统进行纯化, 其中 80% Buffer B 条件下洗脱的收集液为纯化酶液。分别对粗酶液、Ni 柱纯化样品等进行

SDS-PAGE 蛋白电泳分析, 结果如图 3 所示, 分析可知 SDS-PAGE 电泳胶图中纯化样品在接近 55 ku 处有单一条带, 与目的蛋白预期大小相符。根据方法“1.2.3”, 在 pH 6, 45 °C 下测定 Nampt 纯酶的比酶活为 3.20 U/mg。

### 2.3 Nampt 的最适 pH 和温度、热稳定性研究

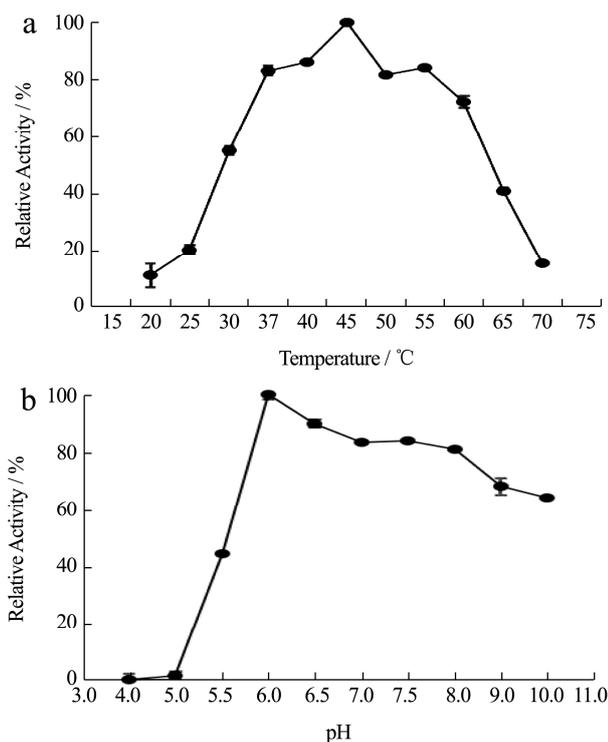


图 4 温度和 pH 对 Nampt 酶活力的影响

Fig.4 Effect of temperature and pH on the activity of Nampt

注: a 表示温度对酶活的影响; b 表示 pH 对酶活的影响。

根据方法“1.2.4”, 测定 pH 和温度对 Nampt 活性的影响, 图 4 a 结果表明: Nampt 在 45 °C 的条件下酶活最高, 且在 37~55 °C 较宽范围内相对酶活力在 80% 以上, 可以保持稳定的酶活力。在 20~25 °C 下 Nampt 的相对酶活力低于 20%, 65~70 °C 下 Nampt 的相对酶活力低于 40%。图 4 b 表明, Nampt 在 pH 6 的条件下酶活最高。在 pH 4~5 几乎检测不到酶活力, 在 pH 6~8 较宽范围内, 可以保持较高的酶活力 (高于 80%)。在较宽范围的温度和 pH 下, 该酶相对酶活力保持较高水平, 有利于此后应用于生产 NMN 时对温度和 pH 波动的适应性。

热稳定性方面, 图 5 结果表明, 在最适反应温度 45 °C 和附近较高的温度 50 °C 下水浴保温处理, 保温不同时间测定的残余酶活显示, 在 120 min 时, Nampt 的残余酶活仍然在 80% 以上, 热稳定性良好, 有利于生产 NMN 过程中酶催化剂能够长时间保持相对稳定。

pH 稳定性方面, 在最适反应 pH 6.0 及附近 pH 5.5 和 6.5 条件下, 于 45 °C 水浴保温处理, 测定保温不同时间的残余酶活。结果如图 6, 在 pH 6.0 和 6.5 条件下, 120 min 时 Nampt 的残余酶活仍然分别在 80% 和 70% 以上, pH 稳定性良好。但是在 pH 5.5 条件下, 15 min 时残余酶活低于 50%, 90 min 以后残余酶活低于 20%。pH 稳定性结果表明, 该 Nampt 在最适 pH 6.0 及略大的 pH 6.5 条件下稳定性良好, 但在略小的 pH 5.5 条件下, 短时间酶活损失较大。该酶对过低的 pH 稳定性较差, 在应用于生产 NMN 时, 应避免反应体系 pH 低于 6.0。

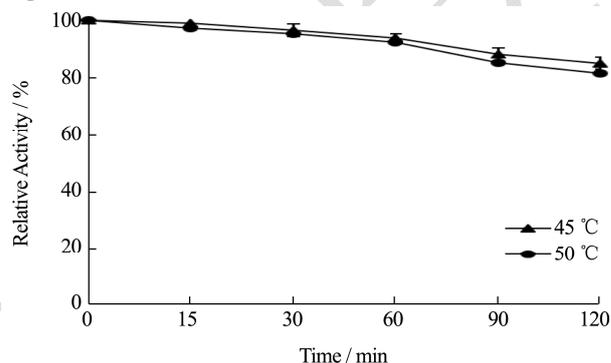


图 5 Nampt 的热稳定性分析

Fig.5 Thermal stability analysis of Nampt

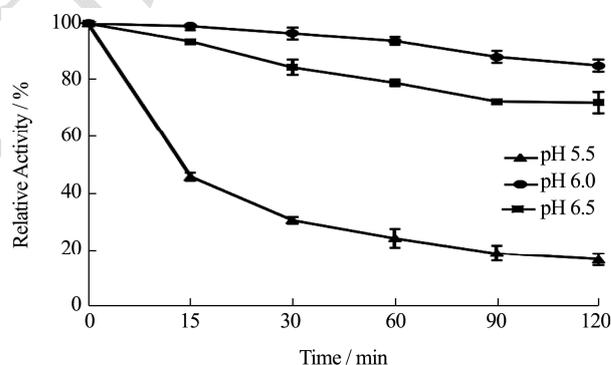


图 6 Nampt 的 pH 稳定性分析

Fig.6 pH stability analysis of Nampt

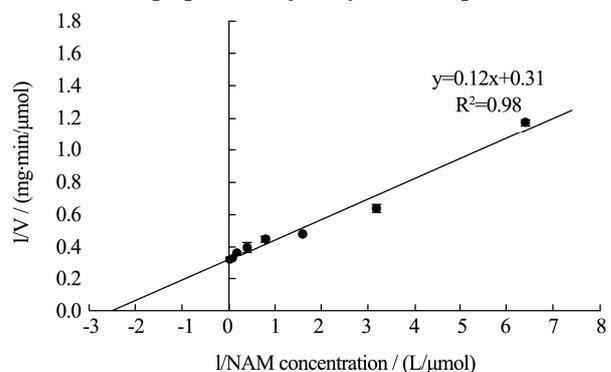


图 7 双倒数曲线法测定 Nampt 的动力学参数

Fig.7 Determination of kinetic parameters of Nampt by double reciprocal curve method

表 1 Nampt 动力学参数比较

Table 1 Comparison of Nampt kinetic parameters from different sources

Source	Substrate	$K_m/(\mu\text{mol/L})$	$V_{\text{max}}/[\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})]$	$k_{\text{cat}}/(1/\text{s})$	$k_{\text{cat}}/K_m(1/\text{Ms})$	
<i>Meiothermus ruber</i>	NAM	0.39±0.07	3.20±0.11	1.39±0.12	$(3.60\pm0.14)\times 10^6$	This work
<i>Homo sapiens</i>	NAM	0.0050	/	0.0077	$1.80\times 10^6$	2008 <sup>[8]</sup>
<i>Homo sapiens</i>	NAM	0.10	/	/	/	2010 <sup>[11]</sup>
<i>Rattus norvegicus</i>	NAM	0.10	/	/	/	1972 <sup>[12]</sup>
<i>Mus musculus</i>	NAM	1.24	/	/	/	2002 <sup>[13]</sup>
<i>Mus musculus</i>	NAM	0.92	/	0.02	$2.20\times 10^4$	2004 <sup>[14]</sup>

注：“/”表示未测定或未公布。

### 2.4 Nampt 动力学参数测定

在最适温度和 pH 下, 设置不同浓度梯度的 NAM 并进行酶活力测定。使用双倒数作图法, 将酶促反应速度的倒数对底物 NAM 浓度的倒数的作图。结果如图 7 所示, 通过拟合的趋势线与横坐标和纵坐标的截距来计算  $K_m$  和  $V_{\text{max}}$  值。以 NAM 为底物, Nampt 的  $K_m$  为  $0.39 \mu\text{mol/L}$ ,  $V_{\text{max}}$  为  $3.20 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ,  $R^2$  为 0.98。与已测定动力学参数来源的 Nampt 比较如表 1 所示。*Homo sapiens* 来源的 Nampt  $K_m$  最小, 对底物 NAM 亲和力最好, 表中两篇报道测定值相差较大可能是由于测定产物 NMN 方法不一样导致<sup>[8,11]</sup>。*Homo sapiens* 与 *Mus musculus* 来源的 Nampt  $k_{\text{cat}}$  值较小, 可能无法满足工业生产 NMN 的要求, George 研究中使用了 *Mus musculus* 来源的 Nampt, 相对于其他两个细菌来源的 Nampt, 相同时间内 *Mus musculus* 来源的 Nampt 在大肠杆菌过表达后生产 NMN 的产量较低<sup>[9]</sup>。本研究表达的 Nampt 的  $K_{\text{cat}}$  值远高于其他来源,  $k_{\text{cat}}/K_m$  为目前已表征的 Nampt 中最高, 更加适用于工业生产 NMN。

### 2.5 NMN 酶法合成及鉴定

测定了 Nampt 的酶学性质以及热稳定性后, 尝试将该酶应用于酶法合成 NMN。根据方法“1.2.6”, 通过改变 Nampt 的添加量, 观察不同 Nampt 的添加量对 NMN 产量的影响。如图 8a 所示, 酶添加量为 0.002、0.008、0.02 g/L 时, NMN 产量达到最高时所需要的反应时间, 随着酶添加量的增加而减少, NMN 的最高产量随着酶添加量的增加而提高。但当酶添加量增加到 0.1 g/L 时, NMN 最高产量几乎和酶添加量为 0.02 g/L 时候一致, 在反应 5 min NMN 产量达到最大值约 15 mg/L, 生产效率为  $3 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。NMN 产量不再

随着酶的添加量增加而提高, 可能是由于底物之一的 PRPP 不稳定, 在  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  或室温解冻和反应过程降解耗导致, 体系中另一底物 NAM 仍未反应完全。为验证此猜想, 在酶添加量为 0.1 g/L 的反应体系中, 待反应至 5 min 时, 补加一次 0.1 mmol/L 的底物 PRPP, 反应结果如图 8b 所示, 反应至 10 min 时 NMN 产量检测到约为 30 mg/L, 生产效率为  $3 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。该实验结果表明通过补加 PRPP 的方法, 提高 NMN 的产量。

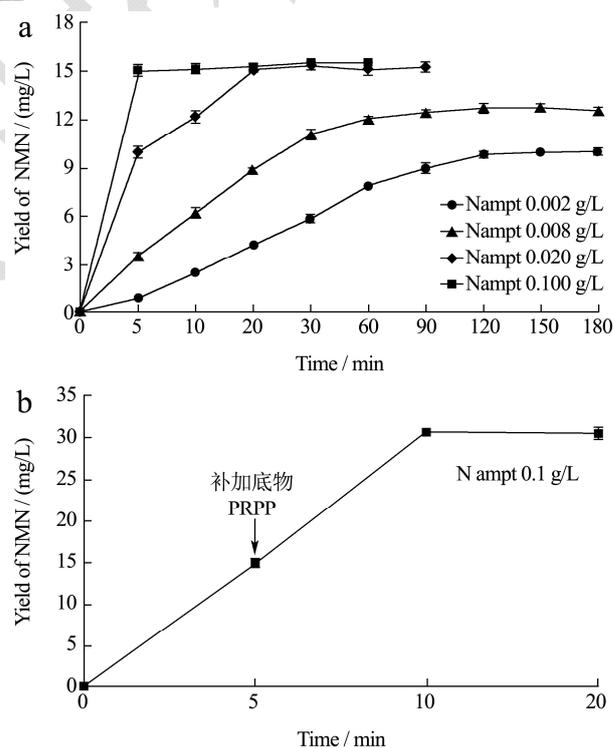


图 8 Nampt 催化生产 NMN

Fig.8 Nampt catalyzes production of NMN

注: a 为 Nampt 添加量对 NMN 产量的影响; b 为当 Nampt 添加量为 0.1 g/L 的情况下, 反应 5 min 补加一次 PRPP 对 NMN 产量的影响。

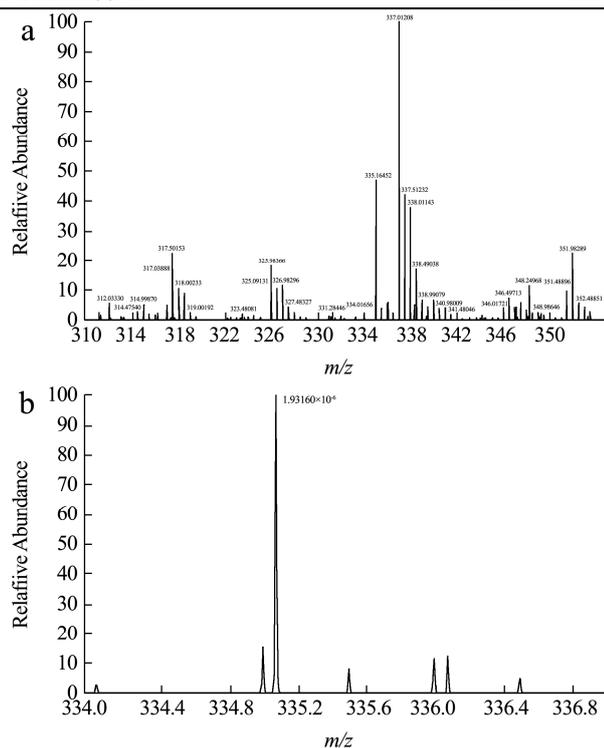


图9 质谱鉴定反应产物

**Fig.9 Identification of reaction products by mass spectrometry**

注: a 为反应液一级质谱图; b 为反应液一级质谱局部放大图; NMN,  $M=C_{11}H_{15}O_8N_2P$ ,  $[M+H]^+$ :335.06338。

**3 结论**

3.1 本文成功在大肠杆菌中活性表达 *Meiothermus ruber* 来源的 Nampt。在最适 pH 6, 最适温度 45 °C 条件下, 该酶  $k_{cat}$  为 0.39  $\mu\text{mol/L}$ ,  $V_{max}$  为 3.20  $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ,  $k_{cat}$  为 1.39 1/s, 与已报道和表征的其他来源 Nampt 相比<sup>[8,11-14]</sup>, 该酶  $k_{cat}/K_m$  最高, 更加工业生产 NMN。该酶在较宽范围的温度和 pH 下, 酶活力在较高水平, 有利于此后应用于生产时对温度和 pH 波动的适应性。在 45 °C 和 50 °C 保温 120 min 后, 该酶酶活残余仍有 80% 以上, 有利于生产 NMN 过程中酶催化剂能够长时间保持相对稳定。在 pH 6.0 和 6.5 条件下, 120 min 时 Nampt 的残余酶活仍然分别在 80% 和 70% 以上, pH 稳定性良好。但是在 pH 5.5 条件下, 短时间酶活损失较大, 在应用于生产 NMN 时, 应避免反应体系 pH 低于 6.0。初步利用该酶进行催化生产 NMN, 酶添加量为 0.1 g/L 的情况下, 反应 5 min 时补加一次 PRPP, NMN 最高产量可达 30 mg/L, NMN 产量已超过 George<sup>[9]</sup>利用大肠杆菌过表达 Nampt 边发酵边生产的方法。本研究为 Nampt 应用于 NMN 的酶法合成提供良好的研究基础。

3.2 本研究虽然成功表达性质较优的 Nampt, 但后续仍然存在许多挑战。例如固定化酶技术的使用会提高

酶元件的稳定性与重复利用率, 进而可以降低生产成本, 但固定化酶可能带来酶催化性质变差的问题, 如底物亲和力和降低等, 因此寻求到合适的固定化酶方法将会大大在降低酶消耗带来的生产成本<sup>[15,16]</sup>。此外单酶法生产 NMN 的底物之一的 PRPP 不稳定且价格较贵, 影响了生产 NMN 的经济效益。后续可以通过使用多酶法, 先从更为廉价稳定的底物出发得到中间产物 PRPP, 例如可以通过核糖激酶 (EC 2.7.1.15), PRPP 合成酶 (EC 2.7.6.1) 代谢途径, 由 ATP 和核糖出发得到 PRPP。

**参考文献**

- [1] Belenky P, Bogan K L, Brenner C. NAD (+) metabolism in health and disease [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2007, 32(1): 12-19
- [2] Yoshino J, Mills K, Yoon M, et al. 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
- [3] Braidy N, Poljak A, Grant R, et al. Mapping NAD (+) metabolism in the brain of ageing wistar rats: potential targets for influencing brain senescence [J]. Biogerontology, 2014, 15(2): 177-198
- [4] Frederick D, Loro E, Liu L, et al. Loss of NAD homeostasis leads to progressive and reversible degeneration of skeletal muscle [J]. Cell Metabolism, 2016, 24(2): 269-282
- [5] Guan Y, Wang S R, Huang X Z, et al. 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, 2017, 28(8): 2337-2352
- [6] Mills K, Yoshida S, Stein L, et al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice [J]. Cell Metabolism, 2016, 24(6): 795-806
- [7] 赵娟,张健,余志坚,等.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 Juan, ZHANG Jian, YU Zhi-jian, et al. Progress on research and application of nicotinamide mononucleotides [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(4): 257-262
- [8] Emmanuel S, Burgos, Vern L, Schramm. Weak coupling of ATP hydrolysis to the chemical equilibrium of human nicotinamide phosphoribosyltransferase [J]. Biochemistry, 2008, 47(42): 11086-11096

(下转第 182 页)