

# 一锅法全细胞催化合成烟酰胺单核苷酸的研究

施玲慧, 王宇晓, 任宇红\*

(华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** 对以腺苷酸 (Adenosine monophosphate, AMP) 为底物合成  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸 ( $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide,  $\beta$ -NMN) 的途径进行了研究。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中构建 AMP 核苷酶 (AMN) 与磷酸核糖焦磷酸合成酶 (PRS) 的共表达及融合表达体系, 其中, 融合菌株 PRS-L4-AMN 与烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 构成的双菌催化体系具有较高的催化效率, 是三菌混合催化体系的 2.42 倍。进一步对全细胞催化合成 NMN 的反应体系进行优化, 包括 pH、温度、缓冲液、金属离子及菌粉投加量等。结果表明, 在优化条件下, 反应 2 h 时 NMN 产量达到最高, 为 23.7 mmol/L, 总收率达 33.4%, 实现了 NMN 的一锅法生物合成。

**关键词:** 烟酰胺单核苷酸; 全细胞催化; 一锅法合成; 融合表达; 共表达

中图分类号: Q819

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2023)07-0182-06

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.07.034

## One-pot whole-cell catalytic synthesis of nicotinamide mononucleotides

SHI Ling-hui, WANG Yu-xiao, REN Yu-hong\*

(The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** The pathway for the synthesis of  $\beta$ -nicotinamide mononucleotide ( $\beta$ -NMN) using adenosine monophosphate (AMP) as a substrate is investigated. The co-expression and fusion expression systems for AMP nucleosidase AMN and ribose-phosphate pyrophosphokinase (PRS) are constructed within *Escherichia coli* BL21 (DE3). Of which, the dual bacterial catalytic system composing of fusion strain PRS-L4-AMN and nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) shows a high catalytic efficiency, which is 2.42 times that of the mixed three-bacterial catalytic system. The reaction system for the whole-cell catalytic synthesis of NMN is further optimized, including pH, temperature, buffer, metal ions and bacterial powder dosage, etc. Under the optimized conditions, the highest NMN production, 23.7 mmol·L<sup>-1</sup>, is obtained when the reaction has performed for 2 h with a total yield of 33.4%, which realizes the one-pot biosynthesis of NMN.

**Key words:** nicotinamide mononucleotide; whole-cell catalysis; one-pot synthesis; fusion expression; co-expression

$\beta$ -烟酰胺单核苷酸 ( $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide,  $\beta$ -NMN) 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) 的前体, 由于其具备独特的抗衰老活性被称为“不老神药”<sup>[1-2]</sup>。近年来, 随着对 NMN 研究的深入, 发现其对多种疾病如阿尔兹海默症<sup>[3]</sup>、心血管疾病<sup>[4]</sup>、2 型糖尿病<sup>[5-6]</sup> 及新冠肺炎<sup>[7]</sup> 等都具有预防和治疗作用。基于此, 目前市场上出现了多种以 NMN 为主要成分的保健产品, 如莱特维健、美国森萃、基因港 NMN 等。2022 年 1 月, 我国首次批准 NMN 作为化妆品新原料, 进一步开拓了 NMN 在国内的应用市场。

早期 NMN 主要由化学法合成, 产物具有 2 种构型且存在分离纯化困难、环境不友好等问题。发酵法制备 NMN 产量较低、不利于工业化生产<sup>[8-9]</sup>。酶催化法是一个较为理想的方法, 可分为一步酶法和

全酶法<sup>[10]</sup>。前者以烟酰胺核糖为底物通过一步酶催化反应生成 NMN, 合成途径较短, 但原料需化学法合成<sup>[11]</sup>; 后者则涉及不同的底物和酶。竺伟等<sup>[12]</sup> 以 5-磷酸核糖 (Ribose-5-phosphate, R5P)、腺苷三磷酸 (Adenosine triphosphate, ATP)、烟酰胺 (Nicotinamide, NAM) 为底物, 通过固定化含有磷酸核糖焦磷酸合成酶和烟酰胺磷酸核糖转移酶的全细胞催化制备 NMN; 李钊等<sup>[13]</sup> 以 5-磷酸核糖-1-焦磷酸 (5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, PRPP) 和 NAM 为底物, 利用烟酰胺磷酸核糖转移酶突变体, 实现了 NMN 的高效催化合成。然而这些方法均存在原料性质不稳定且来源有限等问题<sup>[14]</sup>。

目前, 利用核糖<sup>[15]</sup>、次黄苷酸<sup>[16]</sup>、腺苷酸 (Adenosine monophosphate, AMP) 等相对易得的原料, 通过“一锅法”级联催化合成 NMN 更具工业化

收稿日期: 2022-07-17; 修回日期: 2023-05-10

作者简介: 施玲慧 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物催化, 623927531@qq.com; 任宇红 (1967-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为生物催化与生物过程工程, 通讯联系人, yhren@ecust.edu.cn。

价值和前景。相比传统的逐步法,“一锅法”可以避免中间体的分离纯化,从而减少废弃物的产生<sup>[17]</sup>;同时减少底物的转运,缩短反应时间,提高整体合成效率。通过设计合理的合成路径,“一锅法”可以实现从低价值的底物出发合成具有高附加值的目标产物,降低生产成本。

笔者利用构建的 AMP 核苷酶 AMN、磷酸核糖

焦磷酸合成酶 PRS、烟酰胺磷酸核糖转移酶 NAMPT 为全细胞催化剂,成功建立了从 AMP 出发制备 NMN 的生物合成途径。在大肠杆菌中对 AMN 和 PRS 进行共表达及融合表达设计,提高整体催化效率,并对 NMN 的全细胞催化条件进行优化,最终实现 NMN 的一锅法生物合成,其合成路径如图 1 所示。

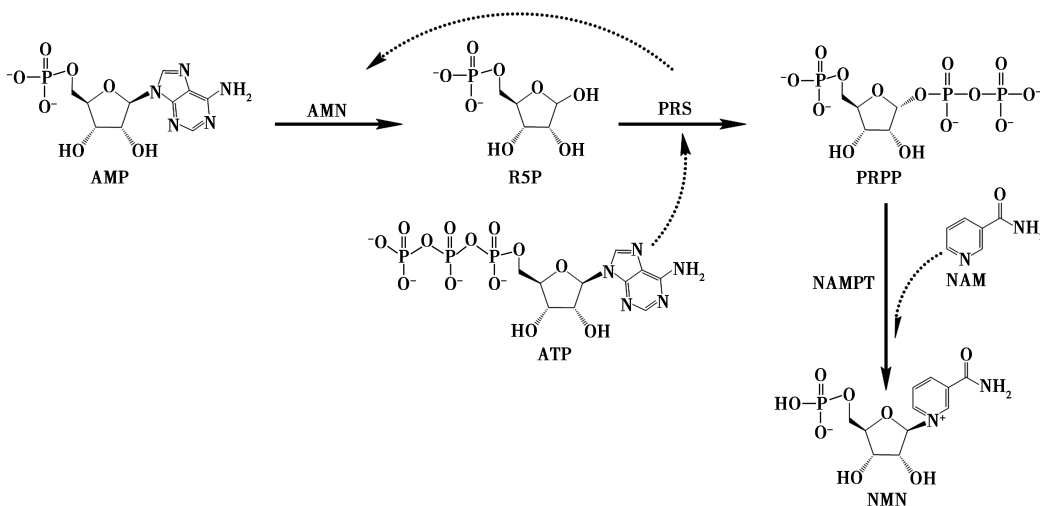


图 1 从 AMP 出发生产 NMN 的体外合成路径

## 1 材料与试剂

### 1.1 质粒与菌株

用于基因克隆的菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、用于蛋白表达的菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 及质粒 pET28a 均来自于本实验室。表达 AMN、PRS 和 NAMPT 三个酶的质粒由本实验室构建。

### 1.2 主要试剂

AMP、ATP、R5P、NAM, Sigma-Aldrich (中国上海) 生产;其他化学品均由国药集团化学试剂有限公司(中国)生产;质粒抽提、凝胶回收、纯化回收试剂盒,美国 Omega 公司生产;PrimeSTAR Max DNA Polymerase,日本 Takara 公司生产;T4 连接酶、内切酶,赛默飞世尔科技公司生产。

## 2 实验方法

### 2.1 重组菌株的构建

#### 2.1.1 AMN 与 PRS 共表达菌株的构建

共表达菌株的构建参考文献[18]。

#### 2.1.2 AMN 与 PRS 融合表达菌株的构建

融合表达菌株的构建参考文献[19]。

### 2.2 重组蛋白的诱导表达

重组大肠杆菌的培养方法见文献[20]。获得

的菌体用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液重悬,在冰浴条件下超声破碎,并对全细胞、上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

### 2.3 冻干菌粉的制备

将收集在 50 mL 离心管中的菌体预冻后放入预冷好的真空冷冻干燥机中冻干 12 h,取出常温保存(样品预冻温度为 -20 $^{\circ}$ C;样品预冻时间为 12 h;干燥室压力为 10~100 Pa)。

### 2.4 全细胞催化合成 NMN 反应体系的建立

反应体系(1 mL): 95 mmol/L ATP、5 mmol/L AMP、95 mmol/L NAM、95 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。菌粉投加量:5 mg/mL 的 AMN、PRS、NAMPT 或 10 mg/mL AMN-PRS 重组菌及 5 mg/mL NAMPT。反应条件:  $T = 37^{\circ}$ C, pH = 7.5。反应 1 h 取样,加入 0.6 mol/L 的盐酸终止反应,高效液相色谱(HPLC)检测 NMN 的含量。

### 2.5 全细胞催化合成 NMN 反应条件的优化

在反应温度为 30、37、40、50 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C,反应 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 时,考察最适温度和最适 pH。在最适温度和 pH 下,分别在反应液中加入 FeCl<sub>3</sub>、MgCl<sub>2</sub>、CuCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub> 及 CaCl<sub>2</sub>,使之终浓度为 5 mmol/L 及 20 mmol/L,并在(5~100)mmol/L 范围内探究金属离子的最适浓度。

此外,考察不同缓冲液对全细胞催化合成 NMN 的影响,包括 20 mmol/L Tris-HCl、PB、HEPES 缓冲液 (pH=8.5),并进一步确定其最适浓度(20~100 mmol/L)。最后,在优化的条件下,确定各菌粉在反应体系中的最适投加量,以获得最高的收率。以收率最高的为 100%,计算其他条件下的相对收率。

### 2.6 分析方法的建立

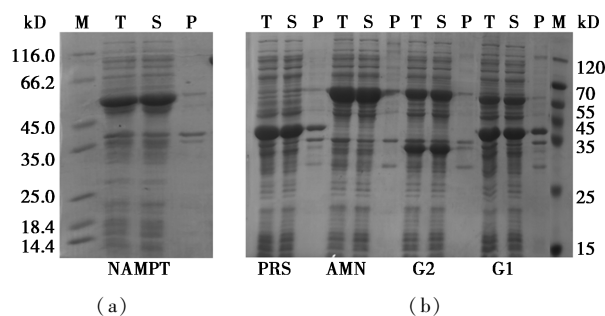
HPLC 检测条件为:色谱柱选用 Zorbax SB-Aq 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 50 mmol/L 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液(pH=6.0):甲醇(V/V)=94:6,紫外检测波长为 254 nm,流速为 1 mL/min,进样体积 10 μL。

$$\text{总收率}(\%) = \{c(\text{NMN})/[c(\text{ATP}) + c(\text{AMP})]\} \times 100\%$$

## 3 结果与分析

### 3.1 AMN、PRS、NAMPT 催化性能测试

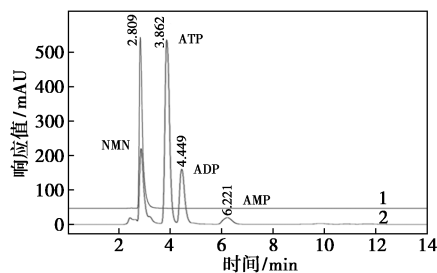
依照 2.2 中所述方法对 AMN、PRS、NAMPT 进行诱导表达,SDS-PAGE 凝胶电泳(图 2)验证结果表明,3 个重组蛋白的条带大小与理论值相符且均为可溶性表达。



T—全细胞;S—上清;P—沉淀;M—标准蛋白分子质量

图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析图

全细胞催化剂具有操作简单、成本低、稳定性高等优势,因此,使用冻干菌粉作为催化剂。为了验证其催化性能,参照 2.4 所述方法配置反应体系并分别投入 5 mg 的 AMN、PRS、NAMPT 菌粉启动反应,通过 HPLC 检测产物的生成,如图 3 所示。从图 3



1—NMN 标准品;2—NMN 反应液

图 3 NMN 标准品和反应液的 HPLC 分析图

中可以看出,AMN、PRS、NAMPT 联合催化能够合成 NMN。为简化合成步骤、提高催化效率,在 *E. coli* BL21(DE3)中构建了 AMN 与 PRS 基因共表达及融合表达体系,并验证其对全细胞催化合成 NMN 的影响。

### 3.2 重组菌株的构建与蛋白表达

#### 3.2.1 共表达菌株的构建与蛋白表达

构建了 2 株共表达菌株 BL21-pET28a-prs-amn-co(G1)和 BL21-pET28a-amn-prs-co(G2)。G1 和 G2 均为上清表达,且对比其蛋白表达量发现,插入位置在前的基因共表达后蛋白表达量损失较少,说明基因在质粒上顺序的前后不同会影响其蛋白的表达量。

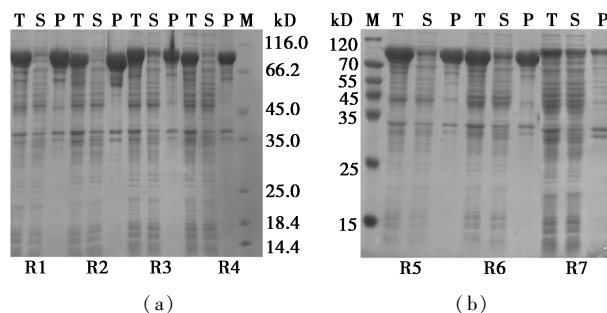
#### 3.2.2 融合表达菌株的构建与蛋白表达

考虑到基因插入顺序及 Linker 的性质(刚性或柔性,见表 1)对融合蛋白性质的影响,构建了如下 7 种融合菌株 PRS-L1-AMN(R1)、AMN-L1-PRS(R2)、PRS-L4-AMN(R3)、AMN-L4-PRS(R4)、PRS-L2-AMN(R5)、PRS-L3-AMN(R6)、PRS-L5-AMN(R7),其蛋白表达情况如图 4 所示。从图 4 中可以看出,在 98 kD 左右的位置有明显的蛋白条带,且与融合后的理论大小一致。值得注意的是,2 个

表 1 连接短肽列表

编号	氨基酸序列	碱基数/ bp
L1	(GGGS) <sub>2</sub>	30
L2	(GGGS) <sub>3</sub>	45
L3	(EEEEKKK) <sub>2</sub>	48
L4 <sup>[21]</sup>	EAKLKEEEERKQREEEERIKRLEELAKRKEEERK	102
L5 <sup>[22]</sup>	EEEEKKKQEEEAERLRRIQEEMEKERKRREED EERRRKEEEERRMKLEMEAKRKQEEERKKRE DDEKRRKK	219

注:L1~L2 为柔性连接肽 (GGGS)<sub>2-3</sub>;L3~L5 为刚性连接肽 ER/K(L4 为 5 nm,L5 为 10 nm)。



T—全细胞;S—上清;P—沉淀;M—标准蛋白分子质量

图 4 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析图

原本呈可溶性表达状态的蛋白在融合以后变得不可溶,蛋白几乎都存在于沉淀中,说明基因融合这种方式对于 AMN 和 PRS 的结构影响较大,导致包涵体的形成。总体来看,刚性 Linker 的可溶表达量略高于柔性 Linker,且 R7 的可溶性蛋白最多,结果说明 PRS 与 AMN 的距离越远,越有利于蛋白的正确折叠,可溶性表达蛋白越多。

### 3.3 全细胞催化效率的比较

#### 3.3.1 融合蛋白催化活性的验证

由于融合蛋白为包涵体表达,将融合蛋白 R3 (50 mg/mL) 菌体超声破碎后,分别取 400  $\mu$ L 上清和沉淀与 5 mg 的 NAMPT 冻干菌粉投入反应体系中进行活性验证,反应体系的配置参照 2.4。结果发现,上清没有催化活性,而沉淀具备催化能力,2 h 可催化生成 2.5 mmol/L 的 NMN,如图 5 所示。说明双酶融合后构象发生了改变,推测其可能以活性包涵体的形式在大肠杆菌中表达,这与李彬春等<sup>[23]</sup>的研究相似。

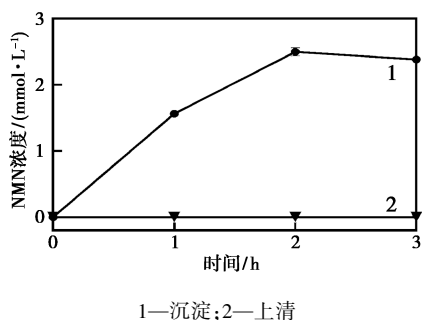


图5 融合蛋白 R3 细胞裂解物上清和沉淀分别参与催化生成 NMN 的浓度

#### 3.3.2 全细胞催化效率的比较

为提高整体催化效率,参照 2.4 的反应体系,取等量的冻干菌粉投入反应,通过 HPLC 检测 NMN 的产量,结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出,G1、G2、R1、R3、R5、R6、R7 参与催化生成 NMN 分别是对照组(三菌混合催化)的 2.18、2.20、2.40、2.43、2.25、2.40、1.81 倍。原因是因为共表达的策略使得底物传输距离缩短,提高了反应效率<sup>[24]</sup>;而多酶融合的策略则可在空间上将两酶的距离拉近,产生临近效应,从而提高催化效率<sup>[25]</sup>。R2 及 R4 相比对照组未得到提高甚至下降,表明 AMN 的 C 端和/或 PRS 的 N 端对维持其构象和功能至关重要。由上述结果可知,R3 与 NAMPT 构成的双菌催化体系催化效率最高,在此基础上构建了 2 株 R3 与 NAMPT 共表达菌株,结果发现整体催化效率分别下降了 13% 及 18%,表明 R3 与 NAMPT 的共表达对 NAMPT

酶的表达产生了影响,因此选择分别投加 R3 与 NAMPT 的策略用于后续反应。

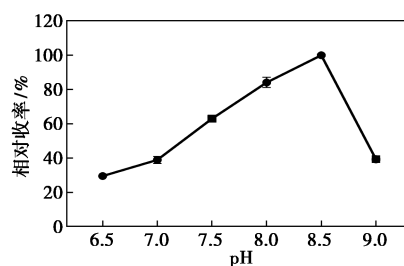
表 2 全细胞催化生成 NMN 的产量

重组菌	NMN 浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )	重组菌	NMN 浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )
对照组	4.76±0.04	R3	11.55±0.07
G1	10.36±0.02	R4	4.67±0.04
G2	10.47±0.07	R5	10.69±0.04
R1	11.40±0.55	R6	11.40±0.26
R2	4.88±0.04	R7	8.62±0.22

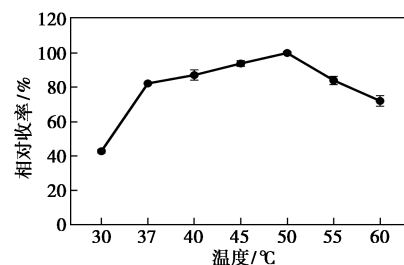
### 3.4 全细胞催化条件的优化

#### 3.4.1 反应 pH 和温度对全细胞催化合成 NMN 的影响

由于反应体系中各个酶的最适 pH 及最适温度不同,因此需要对反应体系的 pH 和温度进行优化,以提高整体催化效率。pH 和温度对全细胞催化合成 NMN 的影响如图 6 所示。从图 6(a)中可以看出,在酸性条件下,产物收率较低;当反应体系 pH 为 8.5 时,收率达到最高。从图 6(b)中可以看出,当反应温度为 50℃ 时催化效果最好,收率最高,低于 37℃ 时收率显著降低,说明低温影响了酶的活性。



(a) pH 的影响



(b) 反应温度的影响

图 6 pH 和温度对全细胞催化合成 NMN 的影响

#### 3.4.2 缓冲液对全细胞催化合成 NMN 的影响

在最优温度和 pH 条件下,考察了缓冲液对产物收率的影响,结果如表 3、表 4 所示。从表 3、表 4 中可以看出,在 HEPES 缓冲液中产物收率较高,在 PB 缓冲液中收率较低,这是由于磷酸盐是 AMN 的

抑制剂<sup>[26]</sup>,对其酶活产生了一定的抑制作用。随着缓冲液浓度的提高,产物收率也随之提高,这是由于缓冲能力越强,反应体系的 pH 越稳定,全细胞催化效率就越高。

表 3 不同缓冲液对全细胞催化合成 NMN 反应的影响

缓冲液	相对收率/%
PB	92.31±0.72
Tris-HCl	98.32±2.52
HEPES	100.00±0.31

表 4 HEPES 浓度对全细胞催化合成 NMN 反应的影响

HEPES 浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )	相对收率/%
20	100.00±0.31
50	107.75±1.15
100	113.41±5.66

### 3.4.3 金属离子对全细胞催化合成 NMN 的影响

AMP 核苷酶受到 MgATP<sup>2-</sup> 及 MnATP<sup>2-</sup> 的变构激活作用<sup>[26]</sup>;磷酸核糖焦磷酸合成酶受到 Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 的激活作用<sup>[27]</sup>;烟酰胺磷酸核糖转移酶的活性依赖于 Mg<sup>2+</sup> 等,因此测试了反应体系中不同的金属离子对全细胞催化合成 NMN 的影响,结果如表 5 所示。从表 5 中可以看出,在 5 mmol/L 的浓度下,Mg<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 对全细胞催化反应具有正向作用,产物收率分别是空白组(未添加金属离子)的 2.46、2.41、2.24、2.08、1.63 倍,而 Fe<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 的添加会产生抑制效果,使得收率降低。当把各金属离子浓度提高至 20 mmol/L 时,Mg<sup>2+</sup> 的激活作用相较于其他金属离子最为显著。对 Mg<sup>2+</sup> 的添加浓度进行进一步的研究,结果如表 6 所

表 5 金属离子对全细胞催化合成 NMN 的影响

金属离子	相对收率/%	
	离子浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )	
	5	20
Mg <sup>2+</sup>	100.00±0.36	100.00±1.46
Co <sup>2+</sup>	97.86±1.46	82.89±3.11
Mn <sup>2+</sup>	91.13±1.44	68.27±0.09
Zn <sup>2+</sup>	84.55±8.28	43.06±1.27
Ni <sup>2+</sup>	66.30±1.59	49.43±2.67
空白	40.62±0.62	
Fe <sup>3+</sup>	35.15±1.23	
Ca <sup>2+</sup>	11.54±0.25	
Cu <sup>2+</sup>	10.37±0.37	

表 6 Mg<sup>2+</sup> 浓度对全细胞催化合成 NMN 的影响

Mg <sup>2+</sup> 浓度/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	相对收率/ %	Mg <sup>2+</sup> 浓度/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	相对收率/ %
5	36.20±1.42	60	99.97±4.85
20	72.87±2.09	80	97.69±3.22
40	100.00±2.28	100	95.76±2.19

示。从表 6 中可以看出,随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度的提高,产物收率也随之提高,其在 40 mmol/L 时的收率分别为 5、20 mmol/L 的 2.76、1.37 倍。当浓度高于 40 mmol/L 时,收率不再提高,因此,40 mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup> 浓度已满足催化需求。

### 3.4.4 菌粉质量浓度对全细胞催化合成 NMN 的影响

菌粉的质量浓度也是影响产物最终产量高低的重要因素。因此,考察了反应体系中菌粉质量浓度对全细胞催化合成 NMN 的影响,如表 7 所示。首先设定 R3 的质量浓度为 6~14 mg/mL 不等,发现 R3 的质量浓度增加至 10 mg/mL 后,NMN 的产量不再增加反而下降,这是由于菌粉质量浓度过高,增加了传质阻力,不利于底物输入和产物输出。保持 R3 的质量浓度为 10 mg/mL,分别投加 3、5、7、9 mg/mL NAMPT,结果发现,当 NAMPT 的投加量增加至 5 mg/mL 时,产量最高为 20.67 mmol/L。因此选择投加 10 mg/mL R3 及 5 mg/mL NAMPT 进行后续的反应。

表 7 菌粉质量浓度对全细胞催化合成 NMN 的影响

R3 质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	NAMPT 质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	NMN 浓度/ (mmol·L <sup>-1</sup> )
6	5	20.12
8	5	20.61
10	5	20.67
12	5	18.77
14	5	18.38
10	3	14.96
10	7	20.38
10	9	19.55

### 3.4.5 菌粉的可重复利用性

全细胞催化剂具有可重复使用的优势,可实现多批次催化制备 NMN,从而简化生产工艺、降低生产成本。在初次反应结束后将菌粉进行回收处理,用缓冲液洗涤 2 次后投入反应液中,经 HPLC 检测

多批次反应液中 NMN 的产量,结果如表 8 所示。从表 8 中可以看出,产物收率随着菌粉使用次数的增多而下降,菌粉在第 5 次使用时收率仍能达到初次使用时的 69.2%,说明其具备较好的操作稳定性和可重复利用性。

表 8 全细胞催化剂的可重复利用性

使用次数	相对收率/%	使用次数	相对收率/%
1	100.00±0.15	4	77.90±1.37
2	85.97±1.83	5	69.24±1.22
3	80.64±1.07		

### 3.5 一锅法全细胞催化合成 NMN

在优化的反应条件下,将 10 mg R3 和 5 mg NAMPT 投入含 95 mmol/L ATP、5 mmol/L AMP、95 mmol/L NAM 及 40 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 的 100 mmol/L HEPES 缓冲液(pH=8.5)中,在 50℃ 摇床反应,每隔 1 h 取样,通过 HPLC 检测 NMN 的浓度,结果如图 7 所示。从图 7 中可以看出,在 0~0.5 h 内,反应速率较快,可生成 18.6 mmol/L NMN。反应 2 h 后 ATP 消耗完全,反应趋于平缓,NMN 的浓度最高达到 23.7 mmol/L,总收率为 33.4%。

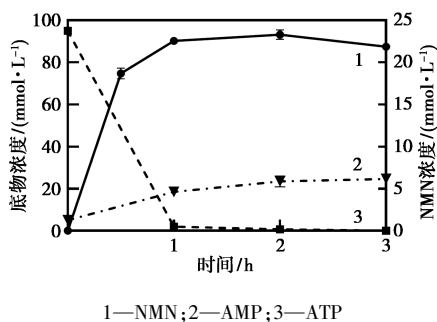


图 7 一锅法全细胞催化 AMP 合成 NMN

## 4 结论

以 AMP、ATP、NAM 为底物,在 *E. coli* BL21 (DE3) 中构建了 AMN 与 PRS 的共表达及融合表达体系,其中融合菌株 PRS-L4-AMN 与 NAMPT 构成的双菌催化体系效率最高,是三菌混合催化反应体系的 2.42 倍。在此基础上,对全细胞催化合成 NMN 的反应条件(反应 pH、反应温度、缓冲液、金属离子和菌体投加量)进行优化,结果表明,反应 2 h 时 NMN 产量达到最高,为 23.7 mmol/L,总收率达 33.4%,实现了 NMN 的一锅法生物合成。但距离工业化生产还有一定距离:一是产物收率低,这是由于

酶催化活性不足导致中间产物的累积,特别是 NAMPT 的 NMN 合成活性还不高,导致 PRPP 的转化率偏低。后续可对各个酶的酶学性质进行分析,明确多酶途径的限制因素,从而指导酶的筛选,提高催化效率和收率。同时,可以对底物的添加比例进行优化以提高底物转化率;二是生产成本较高,NMN 的合成路线往往需要大量的 ATP 参与反应,因此可通过建立 ATP 的再生系统以减少 ATP 的使用量,从而提高工业生产的经济性。

## 参考文献

- [1] Yoshino J, Baur J A, Imai S I. NAD<sup>+</sup> intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR [J]. *Cell Metabolism*, 2018, 27(3): 513-528.
- [2] Nadeeshani H, Li J, Ying T, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product-promises and safety concerns [J]. *Journal of Advanced Research*, 2022, 37: 267-278.
- [3] Long A N, Owens K, Schlappal A E, et al. Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an alzheimer's disease-relevant murine model [J]. *BMC Neurology*, 2015, 15: 19-33.
- [4] Hsu C P, Zhai P Y, Yamamoto T, et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 2010, 122(21): 2170-2193.
- [5] Yoshino J, Mills K F, Yoon M J, et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD<sup>+</sup> intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice [J]. *Cell Metabolism*, 2011, 14(4): 528-536.
- [6] Mills K F, Yoshida S, Stein L R, et al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice [J]. *Cell Metabolism*, 2016, 24(6): 795-806.
- [7] Jiang Y S, Deng Y Q, Pang H H, et al. Treatment of SARS-CoV-2-induced pneumonia with NAD<sup>+</sup> and NMN in two mouse models [J]. *Cell Discovery*, 2022, 8(1): 38-55.
- [8] 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.
- [9] Shoji S, Yamaji T, Makino H, et al. Metabolic design for selective production of nicotinamide mononucleotide from glucose and nicotinamide [J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 65: 167-177.
- [10] 任丽梅, 王晓茹, 祁永浩, 等. 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.
- [11] 祝俊, 李斌, 徐飞, 等. 一种烟酰胺核糖激酶突变体及其应用: CN201910723177.7 [P]. 2019-10-25.
- [12] 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.
- [13] 李钊. 烟酰胺磷酸核糖转移酶突变体及其应用: CN202110351515.6 [P]. 2021-07-13.

(下转第 192 页)

度先增大后减小,最高为 101.0%,最低为 92.9%,表明 NCO 质量分数对 PU 混合料稳定度影响不大。

(2) PU 混合料的冻融前后的劈裂强度受 NCO 质量分数的影响较大,随着 NCO 质量分数的增加,冻融前劈裂强度由 0.51 MPa 增大至 0.80 MPa,而冻融后劈裂强度及冻融劈裂强度比则先增加后减小,最大值分别为 0.60 MPa 和 94.1%。

(3) 随着 NCO 质量分数的增加,马歇尔试块标准飞散损失率和浸水飞散损失率呈先减小后增大的变化趋势,当 NCO 质量分数为 11% 时,标准飞散损失率和浸水飞散损失率最小,均不超过 5%,而且二者相差仅 0.7%。综合来看,NCO 质量分数为 11% 时,PU 混合料的抗水损害性能最好。

### 参考文献

- [1] 朱俊.聚氨酯胶粘剂主要应用领域现状及发展趋势[J].化学工业,2013,31(11):34-38.
- [2] 韩红青.聚氨酯胶粘剂的研究及改性现状[J].聚氨酯工业,2012,27(6):5-8.
- [3] 郭安儒,张赛,宋体杰,等.国内聚氨酯胶黏剂的应用与研究展望[J].化学与黏合,2019,41(2):129-132.
- [4] 陆波,胡佳伟,王鑫宇.单组分封闭型聚氨酯胶黏剂的制备及性能研究[J].化工新型材料,2021,49(S1):192-195.
- [5] Li X R, Li J, Wang J Y, *et al.* Recent applications and developments of polyurethane materials in pavement engineering[J]. Construction and Building Materials, 2021, 304: 124639.
- [6] Chen J, Yin X J, Wang H, *et al.* Evaluation of durability and functional performance of porous polyurethane mixture in porous pavement[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 188: 12-19.
- [7] 王火明,李汝凯,王秀,等.多孔聚氨酯碎石混合料强度及路用性能[J].中国公路学报,2014,27(10):24-31.
- [8] 孙铭鑫.聚氨酯空隙弹性路面混合料的性能研究[D].南京:东南大学,2016.
- [9] Cong L, Wang T J, Tan L, *et al.* Laboratory evaluation on performance of porous polyurethane mixtures and OGFC[J]. Construction and Building Materials, 2018, 169: 436-442.
- [10] Sun M, Bi Y F, Zheng M L, *et al.* Evaluation of a cold-mixed high-performance polyurethane mixture [J]. Advances in Materials Science and Engineering, 2019, 2019: 1-12.
- [11] 李卫凡,邓锋杰,徐少华,等.聚氨酯的研究进展[J].江西化工,2007(3):46-48.
- [12] 张乐乐.聚氨酯改性沥青混合料性能试验研究[J].北方交通,2022(6):55-58.
- [13] 魏柳荷,武金笔,吴林志.单组份聚氨酯密封胶用预聚体的合成及影响因素分析[C].中国聚氨酯工业协会第十七次年会论文集.2014:396-403.
- [14] 樊永伟.反应型聚氨酯胶黏剂的合成及应用[D].大连:大连工业大学,2015.
- [15] 中华人民共和国交通部.JTG F40—2004 公路沥青路面施工技术规范[S].北京:人民交通出版社,2004-09-04:35-36.
- [16] 刘凯,姚明,魏欣,等.异氰酸酯指数对水性聚氨酯弹性膜性能的影响[J].现代化工,2020,40(12):177-180.
- [17] 黎小顺.聚氨酯混合料与沥青混合料路用性能评价对比[J].中外公路,2021,41(3):304-309. ■
- [18] 潘鑫茹,刘均忠,张宏娟,等.共表达 PPK 和 GMAS 全细胞催化合成 L-茶氨酸[J].精细化工,2019,36(9):1827-1832.
- [19] 刘微,姚杨,马萧萧,等.融合表达载体 pET22b-SUMO-FGFR4 的构建及其在大肠杆菌中表达条件的优化[J].吉林大学学报(医学版),2016,42(4):642-647.
- [20] Li Z J, Li F, Cai L, *et al.* One-pot multienzyme synthesis of rare ketoses from glycerol[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(5): 1347-1353.
- [21] Sivaramakrishnan S, Sung J, Ali M, *et al.* Combining single-molecule optical trapping and small-angle X-ray scattering measurements to compute the persistence length of a protein ER/K alpha-helix[J]. Biophysical Journal, 2009, 97(11): 2993-2999.
- [22] Sivaramakrishnan S, Spudich J A. Systematic control of protein interaction using a modular ER/K alpha-helix linker[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(51): 20467-20472.
- [23] 李彬春,张甜,吉亚茹,等. $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶以催化活性包涵体形式异源表达及其酶学性质[J].食品科学,2018,39(14):79-84.
- [24] Gourinchas G, Busto E, Killinger M, *et al.* A synthetic biology approach for the transformation of L- $\alpha$ -amino acids to the corresponding enantiopure (R)- or (S)- $\alpha$ -hydroxy acids [J]. Chemical Communications, 2015, 51(14): 2828-2831.
- [25] Zhang Y H P. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications [J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 715-725.
- [26] Dewolf W E, Fullin F A, Schramm V L. The catalytic site of AMP nucleosidase. Substrate specificity and pH effects with AMP and formycin 5'-PO<sub>4</sub> [J]. Journal of Biological Chemistry, 1979, 254(21): 10868-10875.
- [27] Kadziola A, Jepsen C H, Johansson E, *et al.* Novel class III phosphoribosyl diphosphate synthase: Structure and properties of the tetrameric, phosphate-activated, non-allosterically inhibited enzyme from *Methanocaldococcus jannaschii* [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 354(4): 815-828. ■

(上接第 187 页)