DOI:10.12441/spyswjs.20240103001 [文章编号] 1673-1689(2025)08-0139-09

β-烟酰胺单核苷酸制备用酶的共表达及其应用

刘杰虎[1,2,3] 宿玲恰[1,2,3] 付慧娴[1,2,3] 吴 敬[1,2,3*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】降低生产β-烟酰胺单核苷酸(β-NMN)的成本,并简化其酶催化法的生产流程。**【方法】**在作者所在课题组前期建立的6种酶催化合成β-NMN体系的基础上,将这6种酶基因进行两两组合,构建双酶共表达重组菌;采用共表达获得的粗酶液进行多酶级联催化反应,以合成β-NMN。**【结果】**当底物*D*-核糖浓度为10 mmol/L时,β-NMN的产率达72.90%;各双酶共表达重组菌的最佳发酵条件均为诱导温度25 ℃、IPTG诱导浓度0 mmol/L;确定了对5-磷酸核糖-1-焦磷酸合成酶(*Ec*Prs)储存稳定性有显著提升作用的盐离子和多羟基化合物,且发现Mn^{2+}、乳糖和山梨醇对β-NMN产率基本无影响。**【结论】**该研究建立的双酶共表达体系下多酶级联催化反应制备β-NMN的方法,以及对*Ec*Prs储存稳定性的优化策略,为酶催化法合成β-NMN提供了新思路。

关键词:β-烟酰胺单核苷酸;双酶共表达重组菌;多酶级联催化反应;储存稳定性

Co-expression and Application of Enzymes for Preparation of β-Nicotinamide Mononucleotide

LIU Jiehu[1,2,3] *SU Lingqia*[1,2,3] *FU Huixian*[1,2,3] *WU Jing*[1,2,3*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to reduce the cost and simplify the production process of β-nicotinamide mononucleotide (β-NMN) by the enzyme catalytic method. [**Method**] On the basis of the previously established β-NMN synthesis system with six enzymes, the six enzyme genes were combined in pairs to construct double-enzyme co-expression recombinant strains. Each crude enzyme solution obtained by co-expression was used for multi-enzyme catalytic cascade reaction to synthesize β-NMN. [**Result**] The yield of β-NMN was as high as 72.90% when the concentration of the substrate *D*-ribose was 10 mmol/L. The optimal temperature and IPTG induction concentration for inducing the enzyme expression of the recombinant strains were 25 ℃ and 0 mmol/L, respectively. Finally, the salt ions and polyhydroxy compounds that significantly improved the storage stability of 5-phosphate ribose-1-pyrophosphate synthase (*Ec*Prs) were identified. Mn^{2+}, lactose, and sorbitol basically had no effect on the yield of β-NMN. [**Conclusion**] The multi-enzyme catalytic cascade reaction for the preparation of β-NMN under dual-enzyme co-expression system and the optimization for *Ec*Prs storage stability provide a new idea for the enzyme catalytic synthesis of β-NMN.

Keywords: β-nicotinamide mononucleotide; recombinant strains for dual-enzyme co-expression; multi-enzyme catalytic cascade reaction; storage stability

---

基金项目:中央高校基本科研业务费项目(5812050205226750)。

通信作者:吴敬(1969—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶工程和发酵工程研究。Email:jingwu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-01-03 **修回日期:**2024-03-09

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）作为氧化还原反应的重要辅酶，是能量代谢的关键组成部分，其转化过程对中心碳代谢至关重要[1-5]。β-NMN是人体合成NAD的关键前体及有效增强剂[6]，可在细胞内高效转化为NAD。在提高NAD水平的同时，β-NMN还能发挥多种生理功能，包括调节细胞代谢与能量产生、减少细胞凋亡、维持氧化还原稳态等[7-9]。有研究表明，提高β-NMN水平对心脑血管疾病和神经退行性疾病等均有良好的改善作用[10]。近年来，随着人们生活水平的提高及人口老龄化问题的日益加剧，β-NMN凭借其优异的生物学特性，在营养保健品、医药、化妆品等领域备受关注，且拥有巨大的市场潜力。

当前β-NMN的高效合成方式不断被发掘和优化，主要分为化学合成法和生物合成法两大类。在化学合成过程中，有机溶剂的使用不可避免，不仅存在化学残留风险，还会造成环境污染；同时，反应中生成的手性异构体副产物会导致产物分离纯化难度增加[11]。而生物合成法凭借绿色安全、反应条件温和、底物特异性强等优势，已成为合成β-NMN的主流方法[12-14]。生物合成法进一步分为生物发酵法和酶催化法。生物发酵法涉及工程菌自身的代谢调控，不仅菌株代谢通路的改造较为复杂，其代谢还会受细胞生长的影响，且细胞生理活性也会受到β-NMN干扰[15]；此外，菌株产生的中间代谢副产物较多，导致产物分离纯化难度较大[16]。相比之下，酶催化法不涉及菌株的代谢调控，且生产方式更为多元。在酶催化法中，酶的添加量可按需精确调节，反应过程易于控制，底物特异性高且副产物少，更利于实现工业化生产[17]。

采用酶催化法合成β-NMN时，以烟酰胺核糖（NR）为底物的制备路线虽产率较高，但市售NR价格昂贵且大多通过化学方法制备，存在化学残留风险[18]。以5-磷酸核糖-1-焦磷酸（PRPP）为关键底物，与烟酰胺（NAM）在烟酰胺磷酸核糖转移酶（Nampt，EC 5.1.2.4）催化下生成β-NMN的反应中，价格高昂且无法稳定存在的PRPP可通过廉价底物经多酶级联催化反应合成[19]。Li等[20]构建了8酶级联催化反应体系用于合成β-NMN，当NAM添加量为9.21 mmol/L时，β-NMN产率达55.40%。Ngivprom等[21]组建了5酶级联催化反应体系用于β-NMN的合成，当底物*D*-核糖添加量为10 mmol/L时，β-NMN产率仅为25.00%。此外，其他相关报道也采用了纯酶参与级联催化反应，但普遍呈现β-NMN产率随底物添加量增加而降低的现象。同时，重组酶还可能表现出耐受性差、易失活、不易储存等问题，显著影响了级联催化反应的产物产率。目前提高酶稳定性的方法较多，其中添加稳定剂是成本较低且操作简便的方法之一。

作者所在课题组的前期研究中，通过在大肠杆菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）BL21（DE3）中敲除与β-NMN分解相关的基因*nadR*、*ushA*和*pncC*，构建了6酶级联催化反应体系。该体系以*D*-核糖和NAM为底物，加入核糖激酶（*Ec*Rbk）、*Ec*Prs、烟酰胺磷酸核糖转移酶（*Cp*Nampt）、无机焦磷酸水解酶（*Ec*PPase）进行催化，同时引入*Sinorhizobium meliloti*来源的*Sm* 01248 PPK2和*Deinococcus radiodurans*来源的*Dr* 0132 PPK2，组成双酶催化的ATP再生体系，以降低生产成本。此外，为降低底物多聚磷酸盐对*Ec*Prs活性的抑制作用，进一步构建了模块化粗酶级联催化反应体系。在该体系中，当*D*-核糖添加量为10 mmol/L时，β-NMN产率达78.40%，此产率为当前以PRPP为核心的β-NMN合成路径中的最高产率[22]。然而，在反应路径中存在酶种类繁多的问题，导致酶液制备与应用过程操作烦琐且发酵液成本过高。因此，在前期研究的基础上，作者将各酶基因按不同方式进行两两组合，构建双酶共表达重组菌，将其表达的粗酶液用于级联催化反应，并通过优化各酶添加量及筛选体系，选取最优体系合成β-NMN，以达到降低发酵液成本与简化操作的目的。此外，*Ec*Prs还存在储存稳定性较差，易出现蛋白质聚集沉淀的问题，对此作者筛选了适用于*Ec*Prs的稳定剂以提升其储存稳定性，并在此基础上进一步探究了稳定剂对反应体系中产物产率的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

E. coli JM109作为克隆宿主，用于质粒构建；*E. coli* BL21（DE3）中*ushA*、*pncC*和*nadR*基因敲除后的菌株L001：作者所在实验室前期构建。高保

真PCR酶：诺唯赞生物科技（南京）有限公司；质粒抽提试剂盒：天根生物科技（北京）有限公司；SDS-PAGE：碧云天生物科技（上海）有限公司；*D*-核糖、NAM、六偏磷酸钠和NMN标准品：阿拉丁生化科技（上海）股份有限公司；其余试剂：国药集团化学试剂（上海）有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒与菌株的构建

*E. coli*内源蛋白质*Ec*Rbk、*Ec*Prs与*Ec*PPase的编码基因，以*E. coli* MG1655基因组DNA为模板经PCR扩增获得；需表达的异源蛋白质*Cp*Nampt、*Sm* 02148 PPK2与*Dr* 0132 PPK2的编码基因，均基于*E. coli*密码子优化后由金唯智（苏州）生命科技有限公司合成。所有酶的编码基因均构建至表达载体pETDuet-1中，该载体含2个多克隆位点，可在*E. coli*中实现2个外源基因的共表达[23]，有2种构建方案。

方案一中，将*Ec*Rbk与*Dr* 0132 PPK2、*Ec*Prs与*Ec*PPase、*Cp*Nampt与*Sm* 02148 PPK2的编码基因分别进行两两组合，再将每组基因连接至pETDuet-1载体2个T7启动子下游的MCSI和MCSⅡ区域，最终构建得到3个双基因共表达质粒。方案二中，将*Sm* 02148 PPK2与*Ec*Rbk、*Ec*Prs与*Cp*Nampt、*Dr* 0132 PPK2与*Ec*PPase的编码基因分别进行两两组合，再将每组基因连接至pETDuet-1载体2个T7启动子下游的MCSI和MCSⅡ区域，最终构建得到3个双基因共表达质粒。

将获得的重组质粒分别转化至L001感受态细胞中，获得重组菌L001/pETDuet-1-*Ec*Rbk&*Dr* 0132 PPK2、L001/pETDuet-1-*Cp*Nampt&*Sm* 02148 PPK2、L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Ec*PPase、L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk、L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt、L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase。将各重组菌在含50 μg/mL氨苄霉素的LB培养基中培养，待培养完成后向菌液中加入质量浓度为15 g/dL的甘油，混匀后于−80 ℃保存。

1.2.2 菌株培养与重组蛋白表达

LB培养基：5.0 g/L酵母粉、10.0 g/L蛋白胨和10.0 g/L NaCl；在LB液体培养基的基础上，加入质量分数为2%的琼脂粉制成固体培养基。

TB液体培养基：5.0 g/L甘油、24.0 g/L酵母粉、12.0 g/L蛋白胨、16.4 g/L K_2HPO_4、2.3 g/L KH_2PO_4。

将20 μL菌液接入10 mL的LB液体培养基（含40 μg/mL的氨苄青霉素）中，于37 ℃、200 r/min条件下培养10 h。按接种体积分数5%转接至TB液体培养基（含40 μg/mL的氨苄青霉素）中，继续在37 ℃、200 r/min条件下培养至菌液OD_{600}值约为1。随后加入IPTG，使其终浓度为0.5 mmol/L，再将培养温度调至25 ℃，继续培养24 h。培养结束后，将发酵液于4 ℃、8 000 r/min离心15 min，收集菌体沉淀，用等体积pH 7.5、50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液（含150 mmol/L NaCl）重悬菌体沉淀，通过高压匀浆机破碎细胞后，再于4 ℃、8 000 r/min离心25 min，所得上清液即为粗酶液。

在SDS-PAGE试验中，蛋白质样品的制备方法为：各菌株发酵结束后，取OD_{600}值为5的菌液，经超声破壁处理后离心，取上清液中的蛋白质作为待测样品。

1.2.3 酶活力测定

各酶的酶活力均在30 ℃条件下进行测定。

1）*Cp*Nampt酶活力测定：在pH 7.5、50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液（含150 mmol/L NaCl）中，依次加入10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L K_3PO_4、1 mmol/L ATP、1 mmol/L NAM及0.5 mmol/L PRPP，孵育5 min；随后加入适量*Ec*Prs&*Cp*Nampt重组酶和2.5 μmol/L *Ec*PPase精确反应10 min，然后用体积分数6%的三氟乙酸终止反应。通过检测产物β-NMN浓度来确定酶活力，*Cp*Nampt的单位酶活力定义为：每分钟生成1 μmol/L β-NMN所需的酶量。

2）*Ec*Rbk酶活力测定：在pH 7.5、50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液（含150 mmol/L NaCl）中，依次加入10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L K_3PO_4、1 mmol/L *D*-核糖及1 mmol/L ATP，孵育5 min；随后加入适量*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk重组酶精确反应10 min，然后用体积分数6%的三氟乙酸终止反应。通过检测产物ADP浓度来确定酶活力，*Ec*Rbk的单位酶活力定义为：每分钟生成1 μmol/L ADP所需的酶量。

3）*Ec*Prs酶活力测定：在pH 7.5、50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液（含150 mmol/L NaCl）中，依次加入10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L K_3PO_4、1 mmol/L R5P

及 1 mmol/L ATP，孵育 5 min；随后加入适量 *Ec*Prs&*Cp*Nampt 重组酶精确反应 10 min，然后用体积分数 6% 的三氟乙酸终止反应。通过检测产物 AMP 浓度来确定酶活力，*Ec*Prs 的单位酶活力定义为：每分钟生成 1 μmol/L AMP 所需的酶量。

4）聚磷酸激酶 PPK2 类（*Sm* 02148 PPK2 及 *Dr* 0132 PPK2）酶活力测定：在 pH 7.5、50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（含 150 mmol/L NaCl）中，依次加入 10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L K_3PO_4、1 mmol/L ADP/AMP 及 2 mmol/L 六偏磷酸钠，孵育 5 min；随后加入适量 *Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk/*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase 重组酶精确反应 3 min，然后用体积分数 6% 的三氟乙酸终止反应。通过检测底物 ADP/AMP 消耗的浓度来确定酶活力，*Sm* 02148 PPK2/*Dr* 0132 PPK2 的单位酶活力定义为：每分钟消耗 1 μmol/L ADP/AMP 所需的酶量。

5）*Ec*PPase 酶活力测定：参照尹恒等[24]的方法，配制浓度分别为 0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、3.00 mmol/L 的 Na_2HPO_4 溶液，各取 200 μL 分别加入 2 mL AAM，AAM 由 H_2O、正钼酸铵（20 mmol/L）、硫酸（2 mmol/L）与丙酮溶液按体积比 0.12∶0.5∶1.25∶2 配制而成，静置显色 5 min，然后于 420 nm 波长下测定吸光度，以 Na_2HPO_4 浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。总反应体系为 450 μL，在 pH 7.5、50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（含 150 mmol/L NaCl）中，依次加入 5 mmol/L $MgCl_2$ 及 2 mmol/L 焦磷酸钠，孵育 5 min；随后加入适量 *Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase 重组酶精确反应 20 min，然后用 50 μL 的 1 mol/L 柠檬酸终止反应；取 200 μL 反应液，加入 1 800 μL AAM 静置显色，然后于 420 nm 波长下测定吸光度。*Ec*PPase 的单位酶活力定义为：每分钟生成 1 μmol/L 无机磷酸盐（Pi）所需的酶量。

1.2.4 *Ec*Prs 储存稳定性测定

将 *Cp*Nampt&*Ec*Prs 重组酶液与添加了盐离子及多羟基化合物的 *Cp*Nampt&*Ec*Prs 重组酶液同时置于 30 ℃水浴中处理 5 h，随后立即转移至冰上冷却 10 min。按照 1.2.3 中 *Ec*Prs 酶活力测定方法，分别测定 2 种重组酶热处理前后的酶活力，通过计算残余酶活力确定重组酶中 *Ec*Prs 的储存稳定性。

1.2.5 *β*-NMN 合成体系的构建

1）双酶共表达体系下多酶级联催化反应中加酶量的优化：在 pH 7.5、50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（含 150 mmol/L NaCl）中，依次加入 1 mmol/L *D*-核糖、1 mmol/L ATP、2 mmol/L NAM、2 mmol/L 六偏磷酸钠、10 mmol/L $MgCl_2$ 及 10 mmol/L K_3PO_4，各粗酶的最优添加量分别为 1.0 μmol/L *Ec*Rbk、10.0 μmol/L *Ec*Prs、5.0 μmol/L *Cp*Nampt、10.0 μmol/L *Ec*PPase、0.5 μmol/L *Sm* 02148 PPK2、1.0 μmol/L *Dr* 0132 PPK2。将该体系置于 30 ℃、150 r/min 的水浴摇床中反应。

2）底物浓度为 10 mmol/L 时的多酶级联催化反应体系：在 pH 7.5、50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（含 150 mmol/L NaCl）中，依次加入 10 mmol/L *D*-核糖、10 mmol/L ATP、20 mmol/L NAM、20 mmol/L 六偏磷酸钠、10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L K_3PO_4，各粗酶添加量分别为 10.0 μmol/L（或 20.0 μmol/L）*Ec*Rbk、1.0 μmol/L（或 2.0 μmol/L）*Sm* 02148 PPK2、10.0 μmol/L *Dr* 0132 PPK2 以及 25.0 μmol/L *Ec*PPase，反应 30 min 后再加入 61.0 μmol/L *Cp*Nampt 和 100.0 μmol/L *Ec*Prs。将该体系置于 30 ℃、150 r/min 的水浴摇床中反应。

1.2.6 各指标检测方法

β-NMN 的产率为生成 *β*-NMN 的物质的量与加入底物 *D*-核糖的物质的量的比值。待测样品的预处理步骤为：取 500 μL 反应液，加入质量分数 6% 的三氟乙酸终止反应，静置 15 min 后，于 12 000 r/min 条件下离心 5 min，取上清液并过膜处理。

采用配备 Athena C18-WP 色谱柱（5 μm×4.6 mm×250 mm）的高效液相色谱仪进行 *β*-NMN 的检测。检测条件为：紫外检测器检测波长 260 nm，柱温 25 ℃，进样量 5 μL，流量 0.6 mL/min。流动相 A 为 $V_{水}$∶$V_{四丁基氢氧化铵}$∶$V_{乙酸}$∶$V_{甲醇}$=997∶1.5∶1.5∶30 的溶液，流动相 B 为甲醇。梯度洗脱程序为：0~15 min 时，流动相 A 体积分数为 100%；15~30 min 时，流动相 A 体积分数为 30%；30~37 min 时，流动相 A 体积分数为 100%。

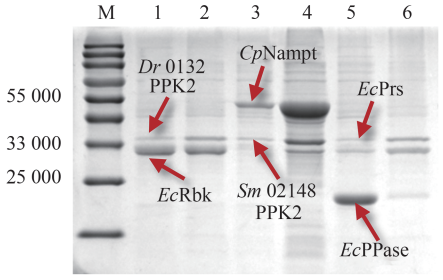
ATP、ADP 及 AMP 的浓度均采用高效液相色谱仪测定，具体检测条件参照温俊婷等[25]的研究。

2 结果与讨论

2.1 重组菌的构建和双酶共表达结果

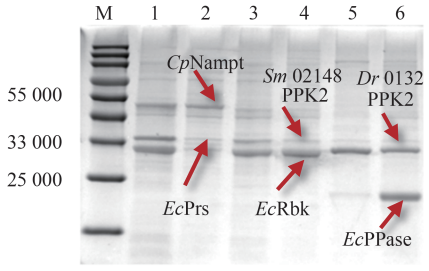
用于各酶共表达的质粒构建完成后，将其转化至宿主菌 L001 中进行摇瓶发酵。对各重组菌表达

产物进行SDS-PAGE分析，见图1。结果显示，所有目标蛋白质均成功表达。其中，*Ec*Rbk与*Ec*Prs表达产物的相对分子质量约为33 000；*Sm* 02148 PPK2、*Dr* 0132 PPK2、*Cp*Nampt、*Ec*PPase表达产物的相对分子质量分别约为37 000、32 000、54 000、22 000，且均与各自的理论相对分子质量相符。



M—蛋白质Marker；
1~2—L001/pETDuet-1-*Ec*Rbk&*Dr* 0132 PPK2破碎上清液和破碎沉淀；
3~4—L001/pETDuet-1-*Cp*Nampt&*Sm* 02148 PPK2破碎上清液和破碎沉淀；
5~6—L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Ec*PPase破碎上清液和破碎沉淀。

(a) 方案一共表达体系下的重组菌株表达产物的SDS-PAGE分析



M—蛋白质Marker；
1~2—L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt破碎上清液和破碎沉淀；
3~4—L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk破碎上清液和破碎沉淀；
5~6—L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase破碎上清液和破碎沉淀。

(b) 方案二共表达体系下的重组菌株表达产物的SDS-PAGE分析

图1　双酶共表达重组菌表达产物的SDS-PAGE分析

Fig. 1　SDS-PAGE analysis of the products of the recombinant strains expressing double enzymes

2.2　多酶级联催化反应制备β-NMN

在底物*D*-核糖添加量为1 mmol/L的条件下，采用双酶共表达体系构建多酶级联催化反应体系，以合成β-NMN。在此过程中，对2种方案中各酶的添加量进行优化，以获得最优共表达体系对应的最佳酶添加量。

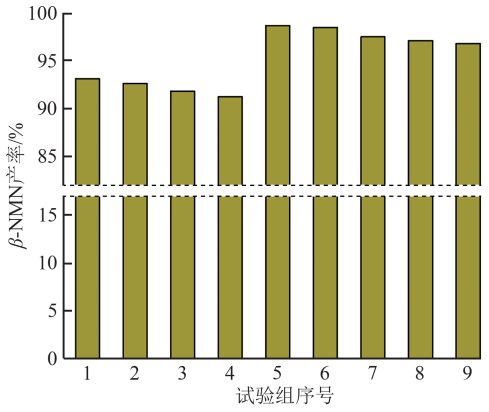
作者所在实验室前期研究已确定，在*D*-核糖浓度为1 mmol/L时的多酶级联催化反应体系中，*Ec*Rbk、*Ec*Prs、*Cp*Nampt、*Ec*PPase、*Dr* 0132 PPK2、*Sm* 02148 PPK2的最优添加量分别为1.0、10.0、5.0、2.5、1.0、0.5 μmol/L。作者以此为基础，对2种方案的共表达体系进行酶添加量的优化与筛选。

根据各重组菌中蛋白质的表达情况。方案一体系中，*Ec*Rbk和*Dr* 0132 PPK2的蛋白质表达量相近，两者最终添加量分别设定为1.1、0.9 μmol/L。在*Ec*Prs和*Ec*PPase中，*Ec*Prs的蛋白质表达量远低于*Ec*PPase，由于底物多聚磷酸盐及中间产物ADP易对*Ec*Prs活性产生抑制作用[20-21]，因此*Ec*Prs在反应中的需求量不可降低；此外，Ngivprom等[21]研究表明，过量添加*Ec*PPase不会对产物产率产生影响，故最终按照*Ec*Prs的最优添加量进行添加，两者添加量分别为10.0、34.5 μmol/L。在*Cp*Nampt和*Sm* 02148 PPK2中，当*Cp*Nampt添加量为5.0 μmol/L时，*Sm* 02148 PPK2添加量为0.8 μmol/L；当*Cp*Nampt添加量为3.1 μmol/L时，*Sm* 02148 PPK2添加量为0.5 μmol/L。由于*Cp*Nampt是反应体系中的关键酶，作者所在实验室前期探索已证实，其添加量低于5.0 μmol/L时会导致产物产率下降，且*Sm* 02148 PPK2添加量过高同样会降低产物产率，因此需对两者的添加量进行优化。

方案二体系中，*Ec*Prs与*Cp*Nampt的添加量分别为10.0、6.1 μmol/L。*Dr* 0132 PPK2和*Ec*PPase的蛋白质表达量相近，两者添加量分别为1.0、2.5 μmol/L。而*Ec*Rbk和*Sm* 02148 PPK2的蛋白质表达量相差较大，当*Ec*Rbk添加量为1.0 μmol/L时，*Sm* 02148 PPK2添加量为0.09 μmol/L；当*Sm* 02148 PPK2添加量为0.5 μmol/L时，*Ec*Rbk添加量为5.2 μmol/L。因此需对两者的添加量进行优化。

不同共表达体系下的β-NMN产率见图2。方案一共表达体系中β-NMN产率整体低于方案二。在方案二中，当*Sm* 02148 PPK2添加量为0.1、0.2 μmol/L时，β-NMN产率分别为98.60%、98.40%；随着*Sm* 02148 PPK2添加量的进一步增加，β-NMN产率呈略微下降的趋势。

因此，将方案二中β-NMN产率最高的2个体系的酶浓度比确定为最优酶浓度比。为提高生产效率，将底物浓度提升至10 mmol/L，同时将2个最优酶浓度比体系中各酶的添加量提高10倍，通过模块化粗酶级联催化反应进行验证，结果显示两者的β-NMN产率分别为70.00%和72.90%。



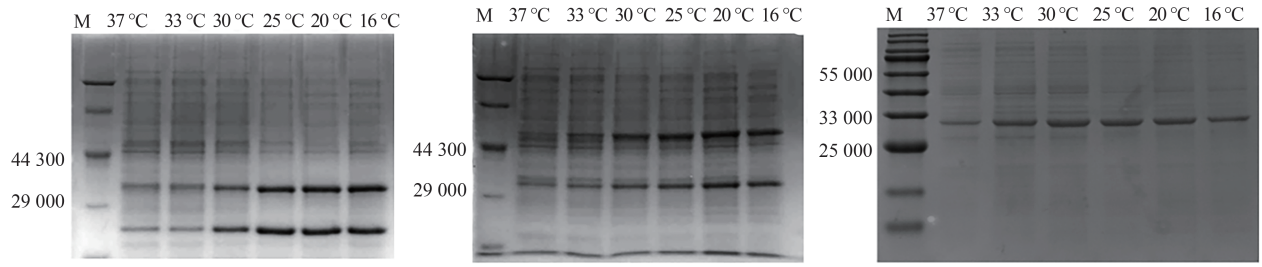
1~5为方案一体系中不同酶的添加量组合，
6~9为方案二体系中不同酶的添加量组合。
1—*Cp*Nampt 5.0 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.8 μmol/L；
2—*Cp*Nampt 4.3 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.7 μmol/L；
3—*Cp*Nampt 3.6 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.6 μmol/L；
4—*Cp*Nampt 3.1 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.5 μmol/L；
5—*Ec*Rbk 1.0 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.1 μmol/L；
6—*Ec*Rbk 2.0 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.2 μmol/L；
7—*Ec*Rbk 3.0 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.3 μmol/L；
8—*Ec*Rbk 4.0 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.4 μmol/L；
9—*Ec*Rbk 5.0 μmol/L、*Sm* 02148 PPK2 0.5 μmol/L。

图 2　不同共表达体系下的 β-NMN 产率

Fig. 2　Yields of β-NMN in different co-expression systems

2.3　双酶共表达重组菌的发酵条件优化结果

为进一步提高各蛋白质的表达量，对方案二共表达体系中的重组菌进行发酵条件优化。诱导温度是影响重组蛋白表达量及正确折叠的重要因素之一。为探究诱导温度对各蛋白质在 L001 菌株中分泌表达的影响，将双酶共表达重组菌分别置于 37、33、30、25、20、16 ℃的诱导温度下进行诱导表达，蛋白质表达结果见图 3，菌株生长情况见图 4。可以看出，对于菌株 L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase，当诱导温度为 16~30 ℃时，各蛋白质表达量相近；当温度进一步升高时，蛋白质表达量迅速降低；且当诱导温度为 25 ℃时，该菌株生长状态最佳，OD_{600} 值为 21.04。对于菌株 L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt，当诱导温度为 16~30 ℃时，各蛋白质表达量相近，其中 25 ℃诱导时菌株生长状态最佳，OD_{600} 值为 17.76。对于菌株 L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk，当诱导温度为 25 ℃时，*Sm* 02148 PPK2 可检测到明显的蛋白质条带，同时 OD_{600} 值较高，为 10.05。综上所述，各双酶共表达重组菌的最适诱导温度均为 25 ℃。

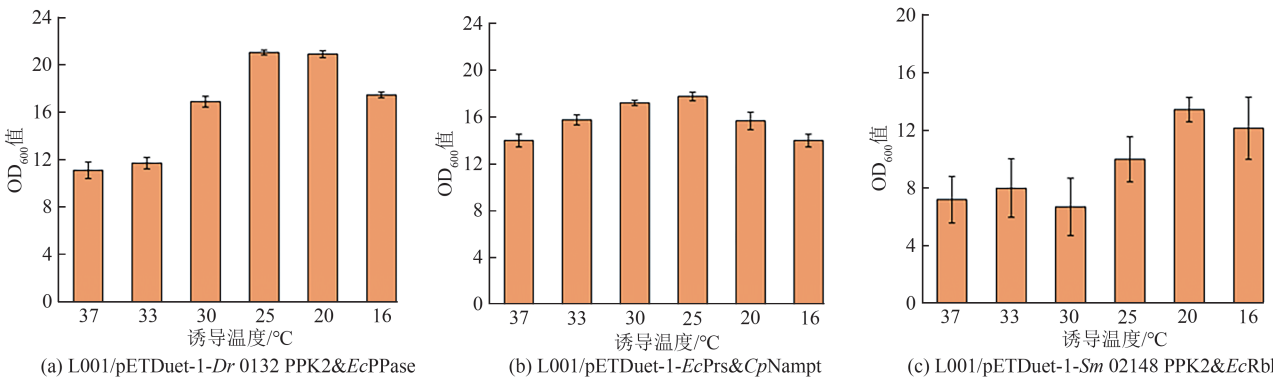


(a) L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase　(b) L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt　(c) L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk

M—蛋白质Marker。

图 3　诱导温度对双酶共表达重组菌蛋白质表达量的影响

Fig. 3　Effects of induction temperature on the protein expression level of the recombinant strains expressing double enzymes

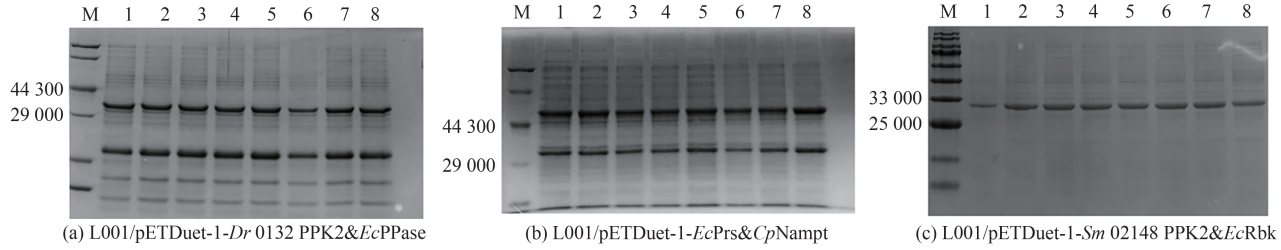


(a) L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase　(b) L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt　(c) L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk

图 4　诱导温度对双酶共表达重组菌生长的影响

Fig. 4　Effects of induction temperature on the growth of the recombinant strains expressing double enzymes

在最佳诱导温度（25 ℃）下，进一步对各重组菌的IPTG诱导浓度进行优化。采用0~3.0 mmol/L的IPTG诱导重组菌，考察IPTG诱导浓度对各双酶共表达重组菌蛋白质表达和菌株生长情况的影响，分别见图5和图6。IPTG诱导浓度对双酶共表达重组菌L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt和L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase的蛋白质表达量无显著影响；反而在不添加IPTG时，2株重组菌的OD_{600}值达到最高，分别为20.74、21.88，且在此条件下各酶的酶活力均达到最高，*Cp*Nampt、*Ec*Prs、*Dr* 0132 PPK2和*Ec*PPase的酶活力分别为1.83、0.19、1.41、1.40 U/mL。对于L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk，不添加IPTG时虽蛋白质表达量略低，但其生长状态最佳；酶活力测定结果显示，此条件下*Sm* 02148 PPK2和*Ec*Rbk的酶活力均达到最高，分别为0.78、1.04 U/mL。综上所述，各双酶共表达重组菌的最佳IPTG诱导浓度为0 mmol/L。

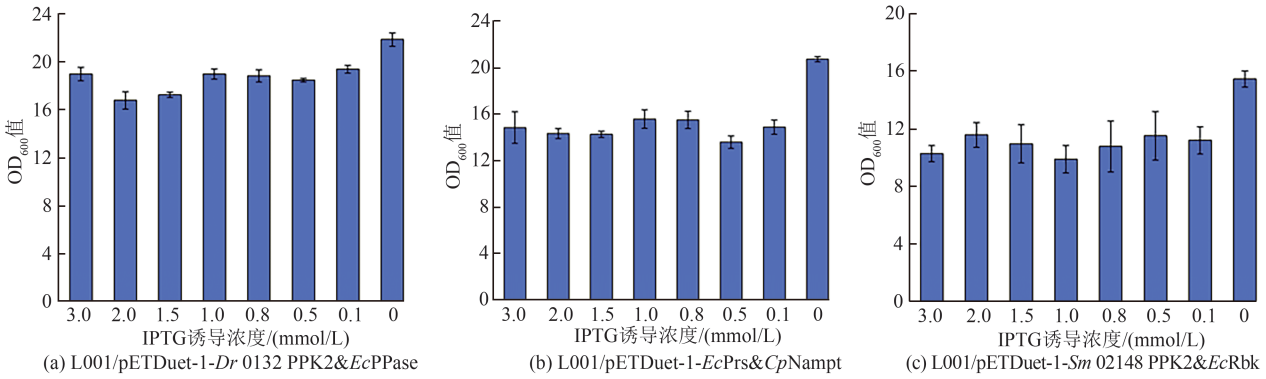


(a) L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase　(b) L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt　(c) L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk

M—蛋白质Marker；1~8—IPTG诱导浓度分别为3.0、2.0、1.5、1.0、0.8、0.5、0.1、0 mmol/L。

图5　IPTG诱导浓度对双酶共表达重组菌蛋白质表达量的影响

Fig. 5　Effects of IPTG concentration on the protein expression level of the recombinant strains expressing double enzymes



(a) L001/pETDuet-1-*Dr* 0132 PPK2&*Ec*PPase　(b) L001/pETDuet-1-*Ec*Prs&*Cp*Nampt　(c) L001/pETDuet-1-*Sm* 02148 PPK2&*Ec*Rbk

图6　IPTG诱导浓度对双酶共表达重组菌生长的影响

Fig. 6　Effects of induction IPTG concentration on the growth of the recombinant strains expressing double enzymes

2.4　盐离子和多羟基化合物对*Ec*Prs储存稳定性的影响

在作者所在实验室前期单酶表达及本研究双酶共表达试验中，所获得的各酶中*Ec*Prs在储存过程中的稳定性较差，易出现蛋白质聚集沉淀现象。经检测，该酶在30 ℃放置5 h后，剩余酶活力仅为初始酶活力的8.43%。为提升重组酶*Ec*Prs的储存稳定性，作者在*Cp*Nampt&*Ec*Prs粗酶液中添加多羟基化合物与盐离子这2类稳定剂，*Ec*Prs相对酶活力结果见图7。

在考察盐离子对*Ec*Prs储存稳定性的影响时，各盐离子的添加浓度均为1 mmol/L。向*Ec*Prs中分别加入Mg^{2+}、Ca^{2+}、K^{+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}，其相对酶活力分别为2.14%、10.27%、10.15%、62.05%、86.05%，分别约为对照组的25%、122%、120%、734%、1 020%。结果表明，Mg^{2+}对*Ec*Prs酶活力有抑制作用，Ca^{2+}和K^{+}对*Ec*Prs酶活力基本无影响，而Cu^{2+}和Mn^{2+}则能在一定程度上提高*Ec*Prs的储存稳定性。

在考察多羟基化合物对*Ec*Prs储存稳定性的影响时，乳糖、甘露糖、甘油、海藻糖、山梨醇、PEG200的添加质量浓度均为50 g/L。与对照组相比，添加的所有多羟基化合物均能提高*Ec*Prs的

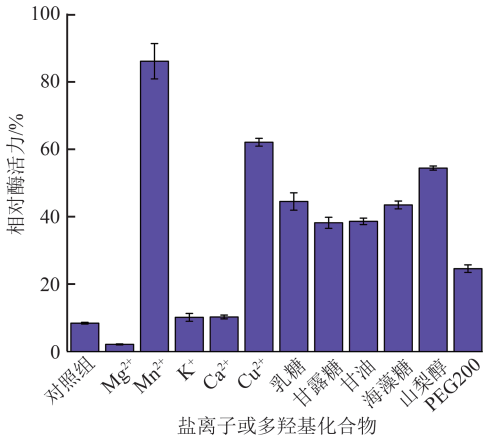


图 7 盐离子和多羟基化合物对 *Ec*Prs 储存稳定性的影响

Fig. 7 Effects of salt ions and polyhydroxy compounds on the storage stability of *Ec*Prs

储存稳定性，其中山梨醇和乳糖对 *Ec*Prs 相对酶活力的提升效果更为显著。经乳糖、甘露糖、甘油、海藻糖、山梨醇、PEG200 处理后，*Ec*Prs 的相对酶活力分别为 44.48%、38.18%、38.60%、43.47%、54.39%、24.58%，分别为对照组的 527%、453%、458%、515%、647% 和 293%。

综上所述，Cu^{2+}、Mn^{2+}以及乳糖、山梨醇等多羟基化合物均能显著提高 *Ec*Prs 的储存稳定性，这将有助于 *Ec*Prs 在储存过程中更好地保持其活性。

为考察稳定剂对粗酶级联催化反应中 β-NMN 产率的影响，作者将对 *Ec*Prs 储存稳定性有显著提升作用的 Mn^{2+}、Cu^{2+}、山梨醇和乳糖加入反应体系中进行研究。结果显示，Mn^{2+}、乳糖及山梨醇加入反应体系后，β-NMN 产率基本不受影响；而 Cu^{2+}的加入导致反应体系中几乎无 β-NMN 生成，这可能是由于 Cu^{2+}使反应路径中其他酶失活所致。

3 结论

在前期研究的基础上，该研究以各酶表达量、反应体系添加量及模块化反应方式为依据构建了 2 种双酶共表达重组菌体系。结果表明，在最优反应体系下，当 *D*-核糖浓度为 10 mmol/L 时，β-NMN 产率为 72.90%。各双酶共表达重组菌的最佳诱导温度为 25 ℃、IPTG 诱导浓度为 0 mmol/L。*Ec*Prs 的储存稳定性结果表明，Cu^{2+}、Mn^{2+}及山梨醇和乳糖等多羟基化合物均能显著提高 *Ec*Prs 的储存稳定性，为 *Ec*Prs 储存方式提供了有效方案。此外，在考察稳定剂对酶催化制备 β-NMN 产率的影响时发现，Mn^{2+}、乳糖和山梨醇的添加基本不影响 β-NMN 产率，而 Cu^{2+}的添加则极大抑制了反应的进行。综上，该研究通过双酶共表达体系级联催化反应制备 β-NMN，为 β-NMN 的合成提供了新策略。

参考文献

[1] CANTÓ C，MENZIES K J，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.

[2] CUENOUD B，IPEK Ö，SHEVLYAKOVA M，et al. Brain NAD is associated with ATP energy production and membrane phospholipid turnover in humans[J]. Frontiers in Aging Neuroscience，2020，12：609517.

[3] LIN H N. Nicotinamide adenine dinucleotide：beyond a redox coenzyme[J]. Organic & Biomolecular Chemistry，2007，5(16)：2541.

[4] RAJMAN L，CHWALEK K，SINCLAIR D A. Therapeutic potential of NAD-boosting molecules：the *in vivo* evidence[J]. Cell Metabolism，2018，27(3)：529-547.

[5] WALKER M A，TIAN R. NAD(H) in mitochondrial energy transduction：implications for health and disease[J]. Current Opinion in Physiology，2018，3：101-109.

[6] ZHOU Y J，WANG L，YANG F，et al. Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD^{+}-auxotrophic mutant[J]. Applied and Environmental Microbiology，2011，77(17)：6133-6140.

[7] ALANO C C，YING W H，SWANSON R A. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD^{+} depletion and mitochondrial permeability transition[J]. Journal of Biological Chemistry，2004，279(18)：18895-18902.

[8] BELENKY P，BOGAN K L，BRENNER C. NAD^{+} metabolism in health and disease[J]. Trends in Biochemical Sciences，2007，32(1)：12-19.

[9] WANG X N，HU X J，YANG Y，et al. Nicotinamide mononucleotide protects against β-amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death[J]. Brain Research，2016，1643：1-9.

[10] PARK J H，LONG A，OWENS K，et al. Nicotinamide mononucleotide inhibits post-ischemic NAD^{+} degradation and dramatically ameliorates brain damage following global cerebral ischemia[J]. Neurobiology of Disease，2016，95：102-110.

[11] LEE J，CHURCHIL H，CHOI W B，et al. A chemical synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^{+})[J]. Chemical Communications，1999(8)：729-730.

[12] SCHÜÜRMANN J，QUEHL P，FESTEL G，et al. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes：toward industrial application [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2014，98(19)：8031-8046.

[13] WU S K，SNAJDROVA R，MOORE J C，et al. Biocatalysis：enzymatic synthesis for industrial applications [J]. Angewandte Chemie International Edition，2021，60(1)：88-119.

[14] YI D，BAYER T，BADENHORST C P S，et al. Recent trends in biocatalysis [J]. Chemical Society Reviews，2021，50(14)：8003-8049.

[15] BLACK W B，ZHANG L Y，MAK W S，et al. Engineering a nicotinamide mononucleotide redox cofactor system for biocatalysis [J]. Nature Chemical Biology，2020，16(1)：87-94.

[16] 曾伟主，石选平，黄忠实，等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成NMN[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(9)：28-35.
ZENG W Z，SHI X P，HUANG Z S，et al. NMN production by whole-cell catalysis of recombinant *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(9)：28-35.(in Chinese)

[17] YOU C，PERCIVAL ZHANG Y H. Biomanufacturing by *in vitro* biosystems containing complex enzyme mixtures [J]. Process Biochemistry，2017，52：106-114.

[18] 陈宇娴，周楚然，黄建忠，等. 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 Y X，ZHOU C R，HUANG J Z，et al. Advances in physiological activities and synthesis of β-nicotinamide mononucleotide[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2023，39(2)：516-536.(in Chinese)

[19] SHEN Q，ZHANG S J，XUE Y Z，et al. Biological synthesis of nicotinamide mononucleotide [J]. Biotechnology Letters，2021，43(12)：2199-2208.

[20] LI Q Z，MENG D D，YOU C. An artificial multi-enzyme cascade biocatalysis for biomanufacturing of nicotinamide mononucleotide from starch and nicotinamide in one-pot [J]. Enzyme and Microbial Technology，2023，162：110122.

[21] NGIVPROM U，LASIN P，KHUNNONKWAO P，et al. Synthesis of nicotinamide mononucleotide from xylose *via* coupling engineered *Escherichia coli* and a biocatalytic cascade[J]. ChemBioChem，2022，23(11)：e202200071.

[22] LIU J H，HUO R T，SU L Q，et al. High-efficient preparation of β-nicotinamide mononucleotides by crude enzymes cascade catalytic reaction [J]. Enzyme and Microbial Technology，2024，180：110482.

[23] 李祝，段绪果，宿玲恰，等. 基于角质酶共表达策略的大肠杆菌胞外生产耐高温α-淀粉酶及其发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(11)：9-17.
LI Z，DUAN X G，SU L Q，et al. Enhancing extracellular production of recombinant α-amylase in *Escherichia coli* through co-expression with cutinase and optimizing fermentation conditions[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(11)：9-17.(in Chinese)

[24] 尹恒，傅子卓，杨晓霞，等. 茶尺蠖无机焦磷酸酶*Eo*PPase672的表达与功能研究[J]. 昆虫学报，2022，65(4)：427-436.
YIN H，FU Z Z，YANG X X，et al. Expression and functional analysis of inorganic pyrophosphatase *Eo*PPase672 from *Ectropis obliqua* (Lepidoptera：Geometridae)[J]. Acta Entomologica Sinica，2022，65(4)：427-436.(in Chinese)

[25] 温俊婷，李子杰，高晓冬. *L*-鼠李树胶糖激酶在*D*-阿洛酮糖合成中的应用[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(12)：49-56.
WEN J T，LI Z J，GAO X D. Application of *L*-rhamnulose kinase on production of *D*-psicose [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(12)：49-56.(in Chinese)

（责任编辑：刘冬梅）