

基于双菌耦合发酵策略的烟酰胺单核苷酸合成

孙 婷¹, 张洪涛^{1*}, 杨 峰², 柴文刚³, 薛皓阳⁴, 谭淑引⁴

(1.江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2.海军军医大学药理学系无机化学教研室, 上海 200433; 3.伦敦帝国理工学院医学院, 糖科学实验室, 英国 伦敦 HA13UJ; 4.江南大学化工学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 本研究构建了分别含有烟酰胺核苷激酶 (nicotinamide riboside kinase, NRK) 和多聚磷酸酶 (polyphosphate kinase, PPK) 的双菌耦合发酵体系, 实现了基于PPK的ATP再生系统在烟酰胺单核苷酸 (nicotinamide mononucleotide, NMN) 生产中的应用。首先分别构建表达NRK1和NRK2的工程菌株, 筛选得到高活性的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)-pET28a-NRK1, NMN产量5.17 g/L, 产率77.4%; 然后对NRK1的诱导表达条件进行优化, 发现低温16 °C、异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷0.7 mmol/L、接种量3%、诱导时长22 h更利于蛋白的可溶性表达; 进一步对*E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-NRK1合成NMN的最优体系进行探索, 发现在菌体质量浓度100 g/L、温度18 °C、时间12 h、ATP与烟酰胺核糖 (nicotinamide riboside, NR) 浓度比1:1.5时, NMN产量最高为5.73 g/L, 产率85.78%; 最后, 通过对*E. coli* BL21 (DE3) pET28a-PPK和*E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-NRK1耦合发酵系统进行优化, 得到最优体系为ATP与NR浓度比1:3.5、菌体质量浓度比1:2、发酵时间16 h, NMN产量达11.81 g/L。本研究所建立的高密度双菌耦合发酵产NMN工艺为高效、低成本的大规模发酵生产NMN开辟了新途径。

关键词: 烟酰胺单核苷酸; 烟酰胺核苷激酶; 多聚磷酸酶; ATP再生; 耦合发酵

A Dual-Bacterial Coupled Fermentation Strategy for Nicotinamide Mononucleotide Synthesis

SUN Ting¹, ZHANG Hongtao^{1*}, YANG Feng², CHAI Wengang³, XUE Haoyang⁴, TAN Shuyin⁴

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Glycosciences Laboratory, Faculty of Medicine, Imperial College London, London HA13UJ, UK; 4. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, a dual-bacterial coupled fermentation system containing nicotinamide nucleoside kinase (NRK) and polyphosphatase (PPK) was constructed, and the application of PPK-based ATP regeneration system in NMN production was achieved. First, engineering strains expressing NRK1 and NRK2 were constructed, and the highly active *Escherichia coli* BL21 (DE3)-pET28a-NRK1 was selected, with NMN yield and productivity of 5.17 g/L and 77.4%, respectively. Then, the induced expression conditions of NRK1 were optimized, and a low temperature of 16 °C, an isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration of 0.7 mmol/L, an inoculation amount of 3% and an induction duration of 22 h were found to be optimal the soluble expression of NRK1 protein. The optimal synthesis conditions of NMN by *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-NRK1 were explored. It was found that after 12 h culture at 18 °C at an initial cell concentration of 100 g/L and a ratio of ATP to NR of 1:1.5, the highest yield of NMN of 5.73 g/L was obtained with a productivity of 85.78%. Finally, the optimal conditions that provided maximal NMN production (11.81 g/L) by coupled fermentation with *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-PPK and *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-NRK1 were determined as 1:3.5, 1:2 and 16 h for ATP to NR ratio, initial cell concentration and fermentation time, respectively. The high-density dual-bacterial coupled

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 解放军后勤保障部开放课题 (ZZCWS21J2001)

第一作者简介: 孙婷 (1998—) (ORCID: 0009-0002-4797-8375), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。

E-mail: sting725@163.com

*通信作者简介: 张洪涛 (1979—) (ORCID: 0000-0002-5896-6487), 男, 副教授, 博士, 研究方向为发酵法规模化合成功能寡糖链及糖链功能的挖掘。E-mail: htzhang@jiangnan.edu.cn

fermentation strategy established in this study opens up a new pathway for high-efficiency, low-cost and large-scale production of NMN.

Keywords: nicotinamide mononucleotide; nicotinamide nucleoside kinase; polyphosphate kinase; ATP regeneration; coupled fermentation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230321-203

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 24-0201-10

引文格式:

孙婷, 张洪涛, 杨峰, 等. 基于双菌耦合发酵策略的烟酰胺单核苷酸合成[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 201-210.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230321-203. <http://www.spkx.net.cn>

SUN Ting, ZHANG Hongtao, YANG Feng, et al. A dual-bacterial coupled fermentation strategy for nicotinamide mononucleotide synthesis[J]. Food Science, 2023, 44(24): 201-210. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230321-203. <http://www.spkx.net.cn>

烟酰胺单核苷酸 (nicotinamide mononucleotide, NMN) 是一种自然存在的生物活性核苷酸^[1], 它广泛分布在人体的所有细胞内, 是细胞内完成生命活动必不可少的辅因子^[2]。研究发现NMN在改善老年血管的血流量^[3]、减少脑出血后脑损伤^[4]、提高胰岛素敏感性、促进肌肉重塑^[5]等方面发挥着重要作用, 值得一提的是NMN可以通过减少DNA损伤防治新冠、加速新冠患者的康复^[6-7]。2020年, 日本厚生劳动省将NMN列入“非医疗清单”, 允许其在食品生产中使用。NMN已成为食品、医学、保健品领域的研究热点^[8]。

目前, NMN的合成方法主要有化学合成、酶法合成和生物合成3种途径^[9]。化学合成NMN需要先合成烟酰胺核苷, 通常从核糖衍生物和烟酸衍生物开始, 成本高、环境污染严重^[10]; 酶法合成效率较高, 但存在操作复杂、成本高等缺陷^[11]; 生物发酵法是利用细胞将底物转化为特定产物的过程^[12], 由于减少了传统酶催化细胞裂解和蛋白质浓缩等步骤^[13], 因此具有选择性高、催化活性强、成本效益高等独特优势^[14]。据2021年研究报道, 以烟酰胺和葡萄糖为底物, 发酵法生产NMN最高产量为

6.79 g/L^[15]。目前发酵液中NMN产品浓度较低, 严重阻碍了发酵法合成NMN技术的产业化。因此, 亟需开发一种更高效的NMN生物合成工艺。

细胞内NMN的合成路线主要有两条途径: 1) 以烟酰胺核糖 (nicotinamide riboside, NR) 为底物, ATP作为辅因子, 通过烟酰胺核苷激酶 (nicotinamide riboside kinase, NRK) 催化直接实现NMN合成^[16]; 2) 以核糖和ATP为底物, 先在核糖磷酸焦磷酸激酶 (phosphoribosylpyro phosphate, PRPP) 催化下生成5-磷酸核糖-1 α -焦磷酸, 后者在烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT) 催化下与烟酰胺合成NMN^[17]。第2条途径为多酶催化体系, 需要酶的种类较多, 中间产物多, 总体收率低^[18], 而第1条途径只需要一步酶催化即可完成, 且能够避免使用价格较高、来源受限的PRPP^[19]。因此, 本研究建立以NR和ATP为底物, 通过NRK一步法直接转化为NMN的全细胞合成体系。考虑到该反应需要由ATP提供一个磷酸基供体, 而单纯外源添加造成生产成本高^[20-21], 因此构建ATP再生系统是提高生物合成反应经济性的一个有效措施^[22]。

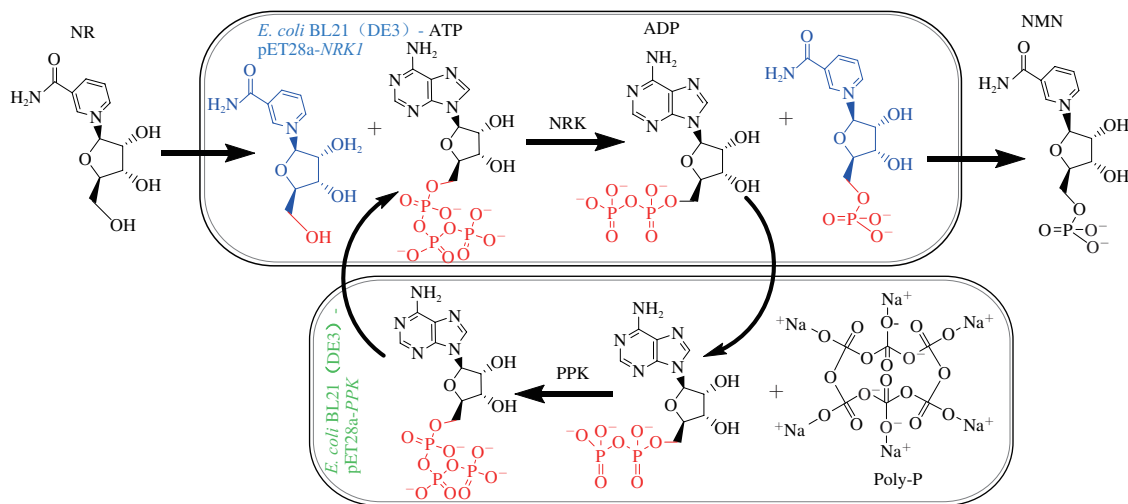


图1 双菌株耦合发酵合成NMN路线

Fig. 1 Synthesis route of NMN by coupled fermentation with two strains

由于多聚磷酸酶 (polyphosphate kinase, PPK) 可催化无机多聚磷酸盐 (inorganic polyphosphate, Poly-P) 和ATP之间的磷酸盐可逆转化, 实现ATP的循环再生^[23], 故将该系统引入NMN的合成体系, 用以实现ADP到ATP再生。

本研究构建基于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) -pET28a-NRK、*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK的全细胞双菌耦合发酵体系 (图1), 实现基于工程菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK的ATP再生系统在*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK合成NMN中的应用。构建的双菌耦合发酵系统可以通过ATP再生实现ATP持续供给, 降低整个发酵体系的生产成本, 实现NR到NMN的连续化合成。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

E. coli BL21 (DE3) 天根生化科技 (北京) 有限公司; 表达载体pET28a质粒由本实验室保藏。

1.1.2 培养基

LB培养基: 胰蛋白胨10.0 g/L, 酵母粉5.0 g/L, 氯化钠10.0 g/L, 调节pH 7.0, 121 °C灭菌20 min; 固体培养基添加琼脂粉2%。将工程菌接种到LB琼脂平板上, 37 °C培养12 h。

1.1.3 试剂

卡那霉素 (kanamycin, Kan)、DNA Marker及蛋白Marker 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 质粒提取试剂盒、限制性内切酶、*Taq*酶、T4 DNA连接酶 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; NMN标准品 海军军医大学赵庆杰教授赠送; NR、ADP、ATP标准品 杭州铠朋生物技术有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 北京伊诺凯科技有限公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES) 北京百灵威科技有限公司。

1.2 仪器与设备

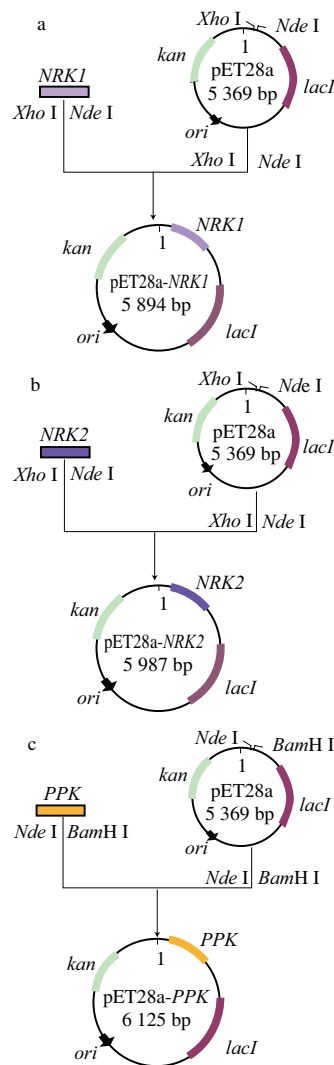
C1000 Touch™聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪、Mini-PROTEAN Tetra蛋白电泳仪 美国Bio-Rad公司; 高效液相色谱仪 日本岛津公司; 高速冷冻离心机 美国Sigma公司; 三重四极杆液相色谱-质谱联用仪 赛默飞科技有限公司; 超声波破碎机 宁波新芝生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 工程菌株的构建

将编码NRK1基因序列 (Gene ID: 54981)、NRK2基因序列 (Gene ID: 6787)、PPK基因序列 (Gene ID: VLKR01000001.1) 进行大肠杆菌偏好性密码子优化, 由

天霖生物公司合成, 获得重组质粒pET28a-NRK1 (图2a)、pET28a-NRK2 (图2b) 和pET28a-PPK (图2c), 然后分别转化到*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 并利用Kan选择性培养基, 37 °C培养12 h, 筛选出阳性克隆。设计引物NRK1-F、NRK1-R, NRK2-F、NRK2-R和PPK-F、PPK-R (表1), 挑取单菌落进行菌落PCR验证, 由天霖生物公司对条带大小正确的转化子进行测序验证。



a. NRK1重组质粒构建; b. NRK2重组质粒构建; c. PPK重组质粒构建。

图2 重组质粒构建

Fig. 2 Recombinant plasmid construction

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR in this study

引物名称	引物序列 (5'-3')
NRK1-F	GGTGGTGCCTCGAGTTTAAGCGGTT
NRK1-R	CGCGGCAGCCATATGAAGACGTTT
NRK2-F	GTGGTGGTGCCTCGAGTTTACATGCTA
NRK2-R	CGCGGCAGCCATATGAAACTGATT
PPK-F	CTCGAATTCGGATCCCTTACGGAGCAA
PPK-R	GCGCGGCAGCCATATGGCGAAACAG

注: 下划线为酶切位点。

1.3.2 重组蛋白的表达

分别挑取工程菌株*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1、*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK2和*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK的单菌落接入10 mL含有20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan的LB液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min摇瓶培养12 h。再以2%接种量转接到150 mL LB液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min摇瓶培养至 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 约为0.7后加入终浓度0.1 mmol/L的IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min条件下过夜诱导培养后, 8 000 r/min离心5 min, 收集菌体备用, 并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测蛋白表达情况。

1.3.3 NMN的生物合成及结构鉴定

NMN合成体系: 20 mmol/L HEPES (pH 7.2)、5 mmol/L β -巯基乙醇、5 mmol/L MgCl_2 、100 mmol/L NaCl、20 mmol/L NR、40 mmol/L ATP、NRK菌体质量浓度100 g/L, 18 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min反应12 h。

薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)检测: 展开剂1,4-二氧环烷:水:氨水:异丙醇=4:2.5:3:2 (V/V), 254 nm波长紫外照射显色。

液相色谱-质谱检测条件: 大气压电喷雾电离源H-ESI II probe; 色谱柱Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 液相流速0.2 mL/min; 柱温35 $^{\circ}\text{C}$; 吸收波长254 nm。流动相A为甲醇, 流动相B为0.1%甲酸, 程序: 0~2 min, 0% A、100% B; 2~6 min, 0%~90% A、100%~10% B; 6~7.5 min, 90% A、10% B; 7.5~8 min, 90%~0% A、10%~100% B; 8~11 min, 0% A、100% B。

1.3.4 NMN的定量分析

配制6组NMN标准溶液1、2、3、4、5、6 mg/mL, 通过高效液相色谱对NMN标准溶液进行定量分析, 以NMN标准品的浓度为横轴, 色谱中相应的峰面积为纵轴, 对液相色谱结果进行线性回归分析, 绘制NMN的标准曲线, 根据标准曲线计算得到相应样品质量浓度。

高效液相色谱条件: 色谱柱为Unitary C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相为0.1%高氯酸溶液; 流速0.6 mL/min; 进样量10 μL ; 紫外检测波长257 nm; 柱温30 $^{\circ}\text{C}$; 洗脱时间20 min。

1.3.5 ATP的生物合成及鉴定

ATP的合成体系: 20 mmol/L HEPES (pH 7.2)、5 mmol/L β -巯基乙醇、5 mmol/L MgCl_2 、100 mmol/L NaCl、20 mmol/L ADP、20 mmol/L Poly-P、PPK菌体质量浓度100 g/L, 18 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min反应12 h。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪对合成的ATP进行鉴定: 采用反射阴离子模式, 2,5-二羟基苯甲酸作为辅助基质, 扫描分子质量范围为470~600 Da。

1.3.6 单菌合成体系的优化

1.3.6.1 *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1的诱导表达条件优化

在摇瓶发酵培养过程中, 设置不同接种量(1%、2%、3%、4%、5%、6%)、诱导时长(8、10、12、14、16、18、20、22、24 h)、诱导温度(16、20、25、28、30、37 $^{\circ}\text{C}$)和诱导剂IPTG终浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1 mmol/L)依次进行梯度实验, 以期获得更多的目的蛋白。

1.3.6.2 *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1生物合成NMN的条件优化

对单一工程菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1生物合成NMN过程中的菌体质量浓度(25、50、75、100、125、150 g/L)、时长(8、10、12、14、16、18、20 h)、温度(18、30、37 $^{\circ}\text{C}$)、底物ATP (20 mmol/L)与NR浓度比(1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5、1:2)进行优化。

1.3.7 双菌耦合发酵体系的建立及优化

构建工程菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1及工程菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK的全细胞双菌耦合发酵体系: 20 mmol/L HEPES (pH 7.2)、5 mmol/L β -巯基乙醇、5 mmol/L MgCl_2 、100 mmol/L NaCl、30 mmol/L NR、20 mmol/L ATP、40 mmol/L Poly-P、100 g/L *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1、100 g/L *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK, 18 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min反应12 h。

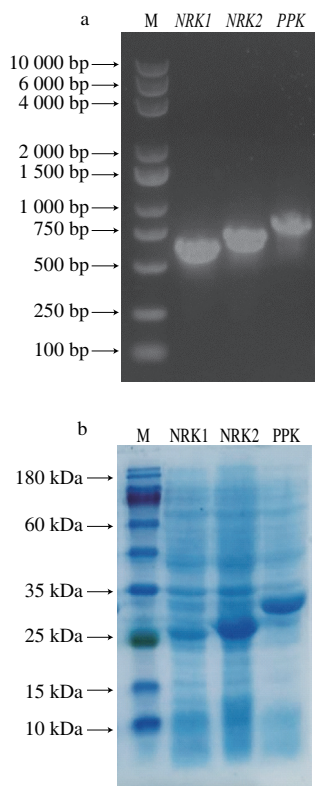
对双菌耦合发酵体系从ATP与NR浓度比(1:1.5、1:2.5、1:3.5、1:4.5、1:5.5)、菌体质量浓度比(1:0、1:2、1:1、1:0.67、1:0.5)及发酵时长(6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h)进行优化, 获得耦合发酵的最适条件。

2 结果与分析

2.1 工程菌的构建及诱导表达

重组表达质粒pET28a-NRK1经过PCR验证结果见图3a泳道1, 得到的片段长度与目的基因NRK1 (610 bp)大小一致; 重组质粒pET28a-NRK2的PCR验证结果见图3a泳道2, 得到的片段长度与目的基因NRK2 (703 bp)大小相同; 对重组质粒pET28a-PPK进行PCR验证, 结果如见图3a泳道3, 得到的片段长度与目的基因PPK (801 bp)大小一致。经测序验证正确, 得到重组质粒pET28a-NRK1、pET28a-NRK2和pET28a-PPK。将重组质粒分别导入*E. coli* BL21 (DE3)中, 对得到的工程菌株*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1、*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK2、*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-

PPK进行SDS-PAGE分析,结果如图3b所示,诱导20 h的全细胞在25~35 kDa均有明显的表达条带,与NRK1目标蛋白(26 kDa)^[24]、NRK2目标蛋白(26 kDa)^[24]、PPK目标蛋白(29.7 kDa)^[25]大小一致,成功构建工程菌*E. coli* BL21(DE3)-pET28a-NRK1、*E. coli* BL21(DE3)-pET28a-NRK2和*E. coli* BL21(DE3)-pET28a-PPK。



a.重组质粒PCR扩增图: M. 10000 DNA Marker; b.重组质粒SDS-PAGE图: M.蛋白Marker(诱导20 h的全细胞)。

图3 重组质粒电泳图

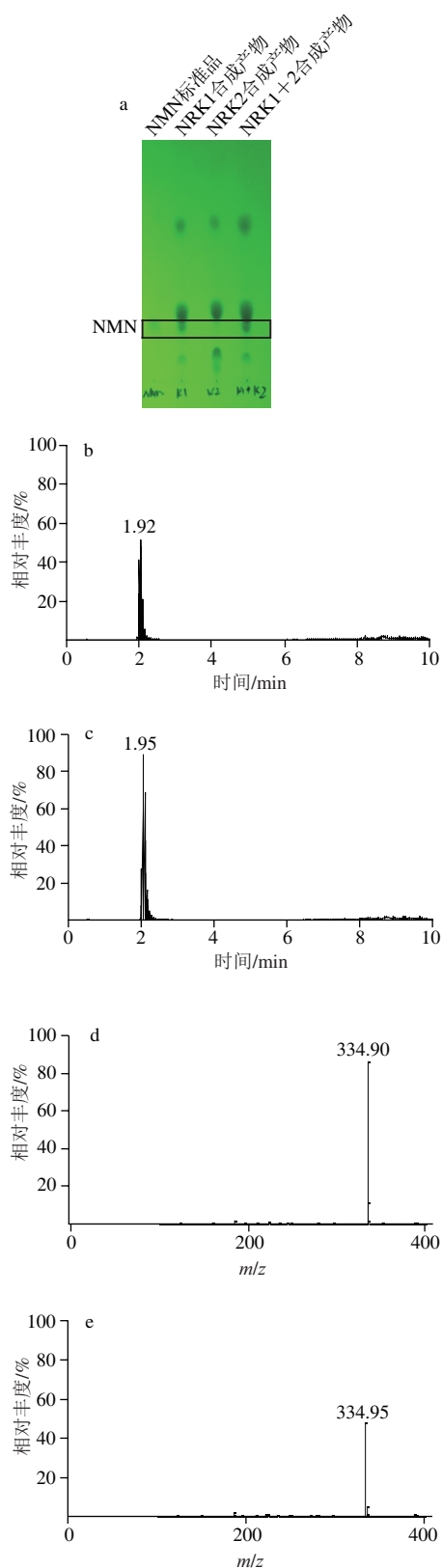
Fig. 3 Electrophoretograms of recombinant plasmids

2.2 单菌法合成产物NMN的鉴定

2.2.1 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a-NRK生物合成产物NMN的分析鉴定

人体细胞内的NRK1和NRK2均具有催化NR和ATP合成NMN能力,构建了*E. coli* BL21(DE3)-pET28a-NRK1和*E. coli* BL21(DE3)-pET28a-NRK2工程菌株,进行NMN的全细胞合成。用TLC法对发酵液进行检测,结果见图4a,发现样品中有与NMN标准品相同 R_f 值的产物生成,初步判断有产物NMN生成。

为进一步验证产物,对产物进行刮板回收,进行液相色谱-质谱分析,从图4c总离子流图可以看出样品只有一个离子化峰,出峰时间为1.95 min,进一步分析该峰显示 m/z 334.95,均与NMN标准品相同。通过液相色谱-质谱分析可以判断生成的产物为NMN,因此认为*E. coli* BL21(DE3)-pET28a-NRK具有合成NMN的活性。



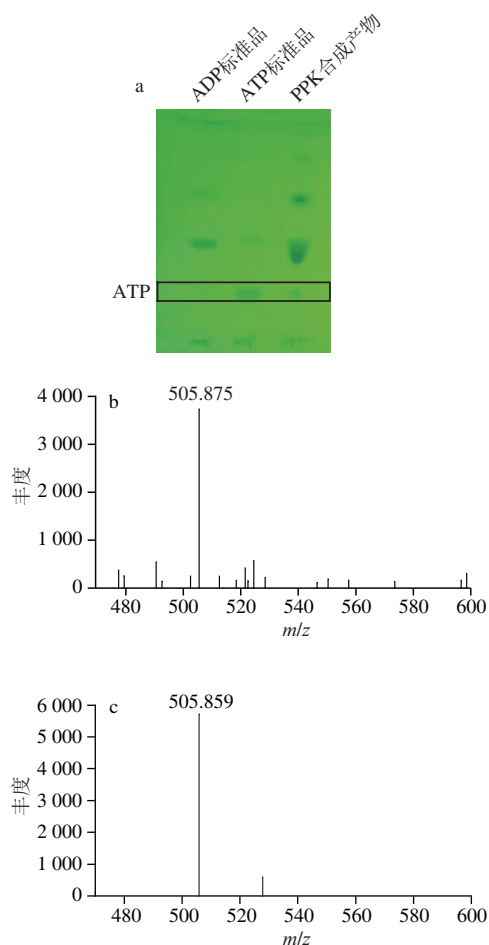
a. TLC检测图; b. NMN标准品液相色谱-质谱分析总离子流图; c. NMN样品液相色谱-质谱分析总离子流图; d. NMN标准品质谱图谱; e. NMN样品质谱图谱。

图4 NRK合成NMN的产物分析

Fig. 4 Product identification of NMN synthesis by NRK

2.2.2 *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK再生产物ATP的分析鉴定

以ADP、Poly-P为底物,在*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK的作用下合成ATP, TLC检测结果如图5a所示,样品的 R_f 值与ATP标准品相同。对产物进行刮板回收,进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测,结果如图5b、c所示,生成的ATP样品与ATP标准品分子质量相同,说明*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK可以实现ATP的再生。



a. TLC检测图; b. ATP样品质谱图; c. ATP标准品质谱图。

图5 PPK合成ATP的产物分析

Fig. 5 Product identification of ATP synthesis by PPK

2.3 单菌诱导及生物合成NMN条件优化

2.3.1 NMN标准曲线的建立

NMN标准品溶液经高效液相色谱检测(图6),以NMN浓度为横坐标,液相色谱图中对应的峰面积为纵坐标,绘制NMN的标准曲线,经线性回归后得到标准曲线方程的 $R^2=0.9954$,说明NMN浓度和液相色谱图中的峰面积有良好线性关系。

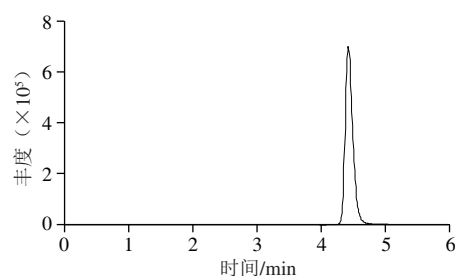


图6 NMN标准品液相出峰时间

Fig. 6 Chromatographic peak time of NMN standard

2.3.2 *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK高活性工程菌株的筛选

在哺乳动物体内存在两种NRK酶NRK1和NRK2,分别由*Nmrk1*和*Nmrk2*两种基因编码。NRK亚型的表达分析表明NRK1无所不在,而NRK2主要存在于骨骼肌中,两种酶均具有催化NR反应生成NMN的能力。为从两者中筛选出高产NMN的工程菌株,进行3组NMN的全细胞合成。对产物进行高效液相色谱定量分析,如图7所示,3组均可以合成NMN,其中*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1反应液中NMN产量最高为5.17 g/L,产率77.4%,*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK2反应液中仅为1.12 g/L,*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1与*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK2菌株混合反应液中产量为4.09 g/L。因此选取工程菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1为最优合成NMN的工程菌株,用于后续双菌耦合发酵系统的构建与优化探索。

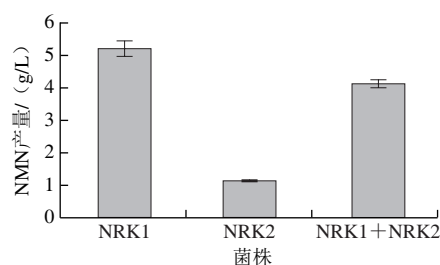


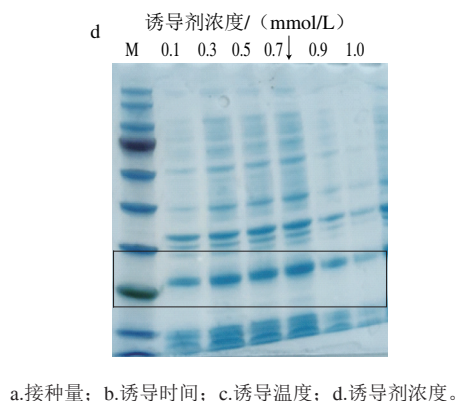
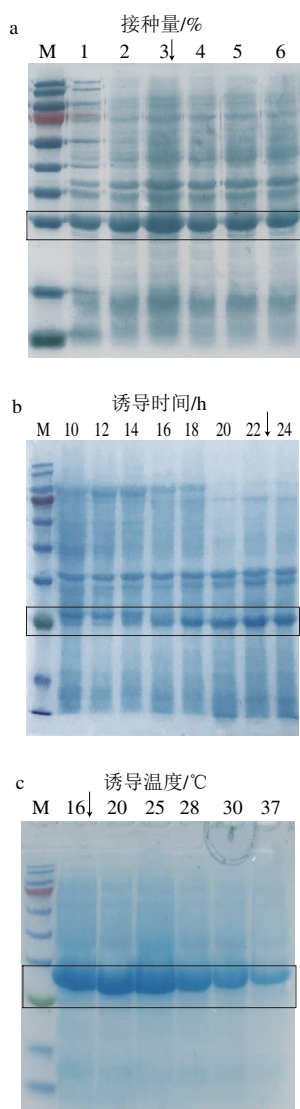
图7 不同工程菌对NMN产量的影响

Fig. 7 Effects of different engineered bacteria on NMN yield

2.3.3 *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1诱导表达NRK1条件优化

相同细胞浓度下工程菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1的生物转化效果明显优于*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK2,但蛋白电泳图比较发现(图3),在同等诱导表达条件下,*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1的蛋白表达量明显少于*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK2。因此为提高工程菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1诱导表达NRK1酶的蛋白表达量,从接种量、诱导时间、诱导温度和诱导剂浓度等角度进行NRK1诱导表达条件的优化。

接种量过大易产生代谢副产物,影响产物合成;接种量过小则会使细胞浓度增殖减缓,进而造成目标产物产量降低。因此,首先从接种量对蛋白表达的影响进行探索,当接种量为3%时,NRK1的蛋白表达量明显高于其他条件(图8a)。为了选择最佳诱导时间,研究了8个不同诱导时间对蛋白表达的影响,随着诱导时间的延长,蛋白的表达量逐渐增加,诱导时间22 h与诱导时间24 h的蛋白表达量相当,因此选择22 h作为最佳的诱导表达时间(图8b);由于温度较高时会使表达蛋白形成包涵体,导致酶活性降低,当诱导温度为16 °C时,NRK1蛋白表达量最高(图8c);诱导剂IPTG有细胞毒性,过高会造成细胞死亡导致酶表达终止,而IPTG过低则又会导导致酶的诱导表达受阻,因此探索了IPTG对NRK1表达的影响,当IPTG终浓度为0.7 mmol/L时,NRK1的蛋白表达量最高(图8d)。因此,确定*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1的最优诱导表达条件为:接种量3%、诱导时间22 h、诱导温度16 °C、IPTG 0.7 mmol/L。



a.接种量; b.诱导时间; c.诱导温度; d.诱导剂浓度。

图8 不同诱导条件对诱导效果的影响

Fig. 8 Influence of different induction conditions on protein expression

2.3.4 *E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1生物转化NMN的条件优化

由于*E. coli*底盘细胞壁上没有NMN由细胞内向细胞外分泌的外排蛋白,为使细胞内合成的NMN可以高效外排到细胞外,探索了细胞壁通透性处理对促进NMN外排的影响。菌体细胞在反复冻融过程中细胞内部会形成冰晶,导致剩余液体中盐浓度的增高造成细胞被膜结构的破坏,从而提高细胞膜通透性^[12]。因此,在反应前对细胞进行反复冻融处理,NMN细胞外排结果如图9所示,可以看出,未冻融细胞NMN产量仅为0.79 g/L,与未冻融细胞相比,经反复冻融的细胞NMN产量为5.33 g/L,产率80.19%。因此,在后续合成反应中需要对细胞进行反复冻融处理,使细胞膜通透性增加。

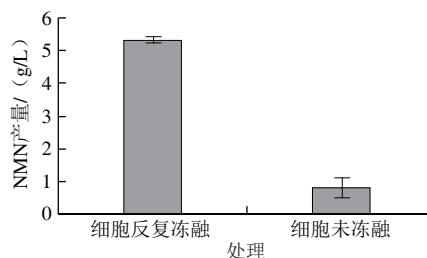
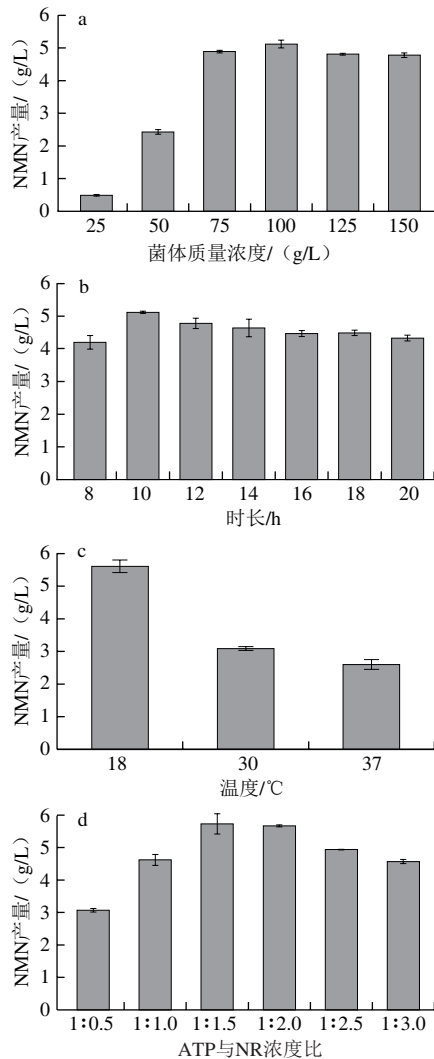


图9 通透性处理对NMN产量的影响

Fig. 9 Effect of permeability treatment on NMN yield

为进一步探索单菌*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1合成NMN的最优体系,从单细胞菌体质量浓度、反应时长、反应温度和底物ATP与NR比例进行探索。由图10a可知,当菌体质量浓度为100 g/L时,NMN产量明显高于其他菌体质量浓度,因此选取菌体质量浓度100 g/L为后续实验的最适菌体质量浓度;图10b说明,当时长为10 h时,NMN产量最高,选取10 h为合成体系的最适时长;温度对产物得率的影响如图10c所示,温度越高,产量明显减少,当温度为18 °C时,NMN产量最高,因此选取18 °C为最佳的反应温度;在确定最佳菌体质量浓度、时间、温度的基础上,研究ATP与NR比例对产

物合成的影响,如图10d所示,ATP与NR比例为1:1.5时(20 mmol/L ATP、30 mmol/L NR),NMN产量最高为5.73 g/L,转化率为85.78%。因此,单菌合成NMN的最优体系为菌体质量浓度100 g/L、反应时长10 h、反应温度18 ℃、ATP与NR比例1:1.5。



a. 菌体质量浓度; b. 时长; c. 温度; d. ATP与NR浓度比。

图10 不同因素对NMN产量的影响

Fig. 10 Influence of culture conditions on NMN yield from *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-NRK1

2.4 双菌耦合发酵产NMN体系的建立及优化

2.4.1 双菌耦合发酵体系的建立

为降低合成NMN的成本,在以NR和ATP为底物,*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1单菌合成NMN优化体系的基础上,引入ADP到ATP的循环再生菌株*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK,用于实现以NR、ATP和Poly-P为底物,通过双工程菌株耦合发酵来合成NMN,结果如图11所示。双菌株耦合发酵体系中当ATP添加量为12 mmol/L(单菌体系的60%),NMN产量与单菌体系持平为5.7 g/L。随着ATP的继续添加,NMN的产

量也逐渐增加,最终NMN产量为6.45 g/L。这表明,在发酵体系中添加*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK菌株可以实现ATP的循环再生,不仅减少了外源供应ATP的需求,而且使NMN的产量增加。

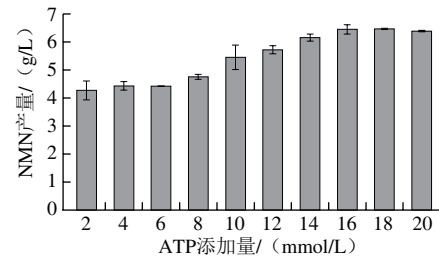
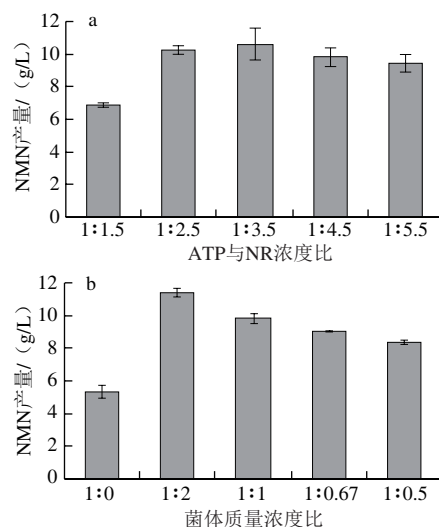


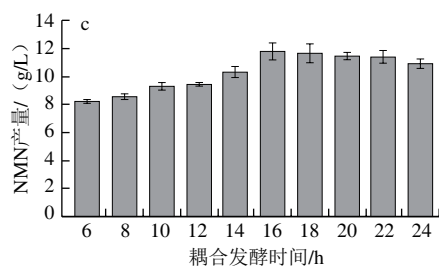
图11 耦合发酵对NMN产量的影响

Fig. 11 Effect of coupling fermentation on NMN yield

2.4.2 双菌耦合发酵体系的优化

为进一步提高双菌耦合发酵生成NMN的产量,从最适ATP与NR浓度比、菌体质量浓度比及发酵时间角度对发酵条件进行优化。在耦合发酵体系中,底物ATP与NR初始浓度比对NMN合成影响较大,由图12a可知,在ATP与NR浓度比为1:3.5时,NMN的产量最高,因此,选取1:3.5为耦合发酵的最佳底物浓度比;在此浓度比的基础上,研究了菌体质量浓度比对产物合成的影响,控制菌株*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1的菌体质量浓度为100 g/L,改变*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK的菌体质量浓度,由图12b发现,当菌体质量浓度比为1:2时,NMN的产量最高;在最佳底物浓度比与菌体质量浓度比的基础上,又进一步研究耦合发酵时间对反应体系的影响,从图12c可以看出,随着发酵时间的延长,NMN产量逐渐上升,发酵时间为16 h,NMN产量最高为11.81 g/L,随着时间的继续增加,NMN产量逐渐趋于平缓下降,因此选取16 h为最佳发酵时间。综上可得,双菌株耦合发酵合成NMN最佳生产工艺为ATP与NR浓度比1:3.5、菌体质量浓度比1:2、耦合发酵时长16 h。





a. ATP与NR浓度比; b. K1与PPK质量浓度比; c. 耦合发酵时间。

图12 不同因素对耦合发酵产NMN的影响

Fig. 12 Influence of culture conditions on NMN production by coupled fermentation

3 讨论

近年来, 不仅NMN的生理活性及功能受到了广泛的研究和关注, NMN的合成工艺也成为了合成生物学领域的研究热点。目前, NMN虽然可以通过不同途径、不同原料转化而成, 但其产率和生产成本仍有改善的空间。在生物法合成NMN方面, 廖一波等^[26]经过同源建模和底物烟酰胺 (nicotinamide, NAM) 分子对接等方式评估后, 选择在*E. coli*中过表达红色稍栖热菌 (*Meiothermus ruber*) 来源的Nampt, 以PRPP和NAM为底物进行酶催化反应10 min, NMN产量可达34 mg/L, 生产效率约为3 mg/(L·min); 吴旻晖等^[27]建立了细胞外酶法合成技术体系: 在*E. coli*系统成功实现了NMN合成途径酶的分泌表达, 但表达所得酶量较低, NMN产量为5.50 μmol/L, 且合成NMN所需要的ATP完全依赖于外源ATP添加量, 使得成本较高。在本研究中, 通过引入基于PPK的ATP再生系统, 构建了全细胞双菌耦合发酵体系, 不仅减少了传统酶催化过程破碎、提取、纯化等步骤所需要的成本, 而且用更便宜的材料Poly-P将ADP磷酸化为ATP, 实现ATP的循环, 减少了对外源ATP的需求量, 使生产成本大大降低, 且双菌株优化后的NMN发酵产量达11.81 g/L, 这是目前耦合发酵法合成NMN的最高产量报道。与2021年日本报道的6.79 g/L高出了73.93%^[15]。

本研究构建了基于*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-NRK1、*E. coli* BL21 (DE3) -pET28a-PPK的全细胞双菌耦合发酵体系, 不仅具有即插即用的优点, 而且可以根据每个批次全细胞的酶活性不同, 针对性地对细胞添加量进行调整, 从而实现整个发酵体系的最优, 对NMN的高效、低成本合成具有重要意义。目前双菌耦合发酵体系属于高密度发酵, 与酶法相比, 产量仍相对较低, 这可能与产物在细胞壁分泌受阻相关。另外, 细胞内NMN的一小部分将被消耗以合成NAD⁺用于细菌生长, 这对NMN的积累不利^[28]。Shoji等^[15]发现pnuC转运蛋白可以有效地将NMN从细胞内转移到细胞外。因此, 在后续

完善NMN合成时将从以下3个方面进行优化: 1) 从菌株构建角度进行, 通过引入产物NMN外排出细胞的“膜蛋白 (pnuC)”, 构建出产物可以快速外排的“细胞门道蛋白”工程菌; 2) 阻断NMN生成NAD⁺的合成通路, 实现NMN的积累^[29]; 3) 从发酵工艺优化角度, 探索分批发酵和连续流加模式对NMN产量的影响。

参考文献:

- [1] NADEESHANI H, LI J Y, YING T L, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product: promises and safety concerns[J]. Journal of Advanced Research, 2022, 37: 267-278. DOI:10.1016/j.jare.2021.08.003.
- [2] PAN F, KANG S F, ZHAO Y F, et al. Effect of β-nicotinamide mononucleotide on tumor formation and growth in a lung cancer mouse model[J]. Materials Chemistry Frontiers, 2021, 5(2): 995-1002. DOI:10.1039/D0QM00897D.
- [3] BONKOWSKI M S, DAS A, SCHULTZ M B, et al. Impairment of an endothelial NAD⁺-H2S signaling network is a reversible cause of vascular aging[J]. Cell, 2018, 173(1): 74-89. DOI:10.1016/j.cell.2018.02.008.
- [4] WEI C C, KONG Y Y, LI G Q, et al. Nicotinamide mononucleotide attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 717. DOI:10.1038/s41598-017-00851-z.
- [5] KLENIN S, YOSHINO M. Response to comment on “Nicotinamide mononucleotide increases muscle insulin sensitivity in prediabetic women”[J]. Science, 2021, 373: eabj7375. DOI:10.1126/science.abj7375.
- [6] JIN R, NIU C, WU F Y, et al. DNA damage contributes to age-associated differences in SARS-CoV-2 infection[J]. Aging Cell, 2022, 21(12): e13729. DOI:10.21203/rs.3.rs-301544/v1.
- [7] ALTAY O, ARIF M, LI X, et al. Combined metabolic activators accelerates recovery in mild-to-moderate COVID-19[J]. Advanced Science, 2021, 8(17): 2101222. DOI:10.1002/advs.202101222.
- [8] 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(2): 516-536. DOI:10.13345/j.cjb.220880.
- [9] 张颖, 蒋雨馨, 朱逸浩, 等. β-烟酰胺单核苷酸合成技术研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 236-240. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2020.10.038.
- [10] QIAN X L, DAI Y S, LI C X, et al. Enzymatic synthesis of high-titer nicotinamide mononucleotide with a new nicotinamide riboside kinase and an efficient ATP regeneration system[J]. Bioprocessing and Biorefining, 2022, 9(1): 26. DOI:10.1002/advs.202101222.
- [11] 廖一波. 烟酰胺单核苷酸的生物酶法合成[D]. 广州: 华南理工大学, 2020. DOI:10.27151/d.cnki.ghnl.2020.003920.
- [12] 王艺颖, 董钰漫, 尹伟, 等. 全细胞生物催化过程强化的研究进展[J]. 化学通报, 2020, 83(10): 875-882. DOI:10.14159/j.cnki.0441-3776.2020.10.002.
- [13] LIN B X, TAO Y. Whole-cell biocatalysts by design[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16: 1-12. DOI:10.1186/s12934-017-0724-7.
- [14] YUAN S, JIN M M, XU C, et al. Self-sufficient whole-cell biocatalysis for 3-(aminomethyl)pyridine synthesis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 183: 108457. DOI:10.1016/j.bej.2022.108457.
- [15] 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. DOI:10.1016/j.ymben.2020.11.008.

- [16] TEMPEL W, RABEH W M, BOGAN K L, et al. Nicotinamide riboside kinase structures reveal new pathways to NAD⁺[J]. *PLoS Biology*, 2007, 5(10): e263. DOI:10.1371/journal.pbio.0050263.
- [17] MAHARJAN A, SINGHVI M, KIM B S. Biosynthesis of a therapeutically important nicotinamide mononucleotide through a phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 and 2 engineered strain of *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(11): 3055-3065. DOI:10.1021/acssynbio.1c00333.
- [18] BIEGANOWSKI P, BRENNER C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans[J]. *Cell*, 2004, 117(4): 495-502. DOI:10.1016/S0092-8674(04)00416-7.
- [19] 史海波, 赵海, 周春松, 等. β -烟酰胺核苷酸制备研究进展[J]. *精细化工中间体*, 2020, 50(4): 1-5. DOI:10.19342/j.cnki.issn.1009-9212.2020.04.001.
- [20] 宋卓琳, 黄明珠, 陈雪岚. 三磷酸腺苷供应优化促进谷氨酸棒杆菌产氨基酸的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(3): 311-316. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027751.
- [21] 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. DOI:10.13345/j.cjb.160218.
- [22] SHEN Q, ZHANG S J, XUE Y Z, et al. Biological synthesis of nicotinamide mononucleotide[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(12): 2199-2208. DOI:10.1007/s10529-021-03191-1.
- [23] CAO H, LI C C, ZHAO J, et al. Enzymatic production of glutathione coupling with an ATP regeneration system based on polyphosphate kinase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 185: 385-395. DOI:10.1007/s12010-017-2664-4.
- [24] SASIAK K, SAUNDERS P P. Purification and properties of a human nicotinamide ribonucleoside kinase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 333(2): 414-418. DOI:10.1006/abbi.1996.0409.
- [25] 黄欣, 李益民, 杜聪, 等. 来源于泗阳鞘氨醇杆菌的聚磷酸激酶的克隆表达及在ATP再生系统中的应用[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(12): 4669-4680. DOI:10.13345/j.cjb.220320.
- [26] 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核苷酸[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(2): 87-93. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0239.
- [27] 吴旻晖, 梁书利, 林影. 大肠杆菌分泌表达烟酰胺核苷酸合成途径酶及催化体系优化[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(3): 75-86. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0496.
- [28] HUANG Z S, LI N, YU S Q, et al. Systematic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of nicotinamide mononucleotide from nicotinamide[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(9): 2979-2988. DOI:10.1021/acssynbio.2c00100.
- [29] YANG L Y, MU X Q, NIE Y, et al. Improving the production of NAD⁺ via multi-strategy metabolic engineering in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 122-133. DOI:10.1016/j.ymben.2021.01.012.