

## 天然高产 NMN 菌株的筛选及 Nampt 生物合成 NMN

李超<sup>1,2,3#</sup>, 邹国珑<sup>1#</sup>, 张海潮<sup>1#</sup>, 林玉惠<sup>4</sup>, 赵丽青<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 深圳大学化学与环境工程学院食品科学与技术系, 深圳 518060

<sup>2</sup> 深圳大学物理与光电工程学院, 深圳 518060

<sup>3</sup> 韩山师范学院, 广东潮州 521041

<sup>4</sup> 汕头市天悦科技创新研究院有限公司 广东汕头 515000

# 这些作者对这项工作做出了同等贡献

\*通讯作者: 赵丽青, Email: lqzhao@szu.edu.cn

**摘要:** 烟酰胺单核苷酸(NMN)是一种人体内源性物质, 具有较高的安全性和热稳定性, 其在化妆品、医药健康、功能食品等方面的应用受到广泛关注。然而, NMN 的合成过程存在成本高、耗时长、收率低等问题, 在一定程度上限制了 NMN 的大规模工业化应用。烟酰胺磷酸核糖转移酶(Nampt)是 NMN 生物合成技术路线中的关键酶, 可催化烟酰胺(NAM)和焦磷酸核糖(PRPP)合成 NMN。筛选和表达具有优良酶学性质和稳定性的 Nampt 是该方法合成 NMN 的关键。目前, Nampt 生产 NMN 的技术路线存在的主要问题是 Nampt 的催化活性低。而 Nampt 的来源少且有限, 因此我们分离出高产 NMN 的微生物成都肠杆菌 2021T4.7, 并优化了其发酵条件。NMN 的产量高达 67.66  $\mu\text{M}$ 。此外, 我们还合成了 Nampt 并构建了相关的重组高产工程菌。我们半理性设计了源自小鼠的 Nampt 结构, 获得了突变体 mNampt-V365L, NMN 产量高达 135.99  $\mu\text{M}$ , 比野生型提高了 62%。在此, 我们筛选出高产 NMN 天然菌株, 通过 Nampt 酶的半理性设计优化得到高产菌株, 为 NMN 的转化率提供了新的底盘微生物和新思路。

**关键词:** 烟酰胺单核苷酸; 发酵条件优化; 半理性设计

---

收稿日期: 2023-05-17

发表日期: 2023-06-20

English edition of this article is available online at <https://cae.usp-pl.com/index.php/fnc/article/view/7>

## 引言

烟酰胺单核苷酸(NMN)的分子式为C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P,与许多疾病问题相关,近年来作为营养保健品备受关注<sup>[1]</sup>。在人体内,NMN会转化为NAD<sup>+</sup>,这是一种存在于所有活细胞中的辅酶。NAD<sup>+</sup>的代谢还与各种生理状况有关,在人体各种代谢反应中必不可少<sup>[2]</sup>。研究表明,可以通过膳食中补充NAD<sup>+</sup>前体NMN和NR的方法提高肌肉中NAD<sup>+</sup>含量<sup>[3]</sup>。在NAD<sup>+</sup>前体中,NMN在口服管饲小鼠实验中改善细胞内NAD<sup>+</sup>方面效果最好,NMN在30分钟内被迅速吸收转化为代谢组织中的NAD<sup>+</sup>,因此适合作为NAD<sup>+</sup>补充剂<sup>[4,5]</sup>。2016年,Uddin等人<sup>[6]</sup>发现:相当于人类年龄70岁的小鼠服用NMN一周后恢复到20岁状态,并且寿命延长20%。近年来,随着对NMN研究的不断深入,人们逐渐认识到NMN的生物活性对生命健康的重要性。NMN在化妆品、营养保健、功能食品等领域有着特

殊的应用<sup>[7-9]</sup>。它还与衰老退行性疾病、神经退行性疾病、内分泌系统平衡、胰岛素分泌、糖尿病和肥胖有关<sup>[10-15]</sup>。

生物合成NMN途径包括烟酰胺核苷(NR)磷酸化途径和烟酰胺(NAM)补救途径(图1)。生物合成NMN生产工艺简单,生产过程环保无污染。NMN的价格偏高,而且NMN的原料大部分是通过化学合成制备的。尽管如此,生产过程中使用的有机溶剂具有毒性,生产的NMN经常存在有机溶剂残留、手性等问题。2018年,George等人<sup>[16]</sup>发明了微生物发酵制备NMN的方法,构建烟酰胺磷酸核糖转移酶(Nampt)重组大肠杆菌(*E.coli*)工程菌,加入底物烟酰胺(NAM)和乳糖发酵生产NMN,其NMN产量为15.4mg/L。目标产物NMN采用分子筛色谱分离,色谱分析表明许多底物NAM没有完全反应生成NMN<sup>[17]</sup>。可以考虑对工程菌进行高密度发酵以提高NMN转化率。

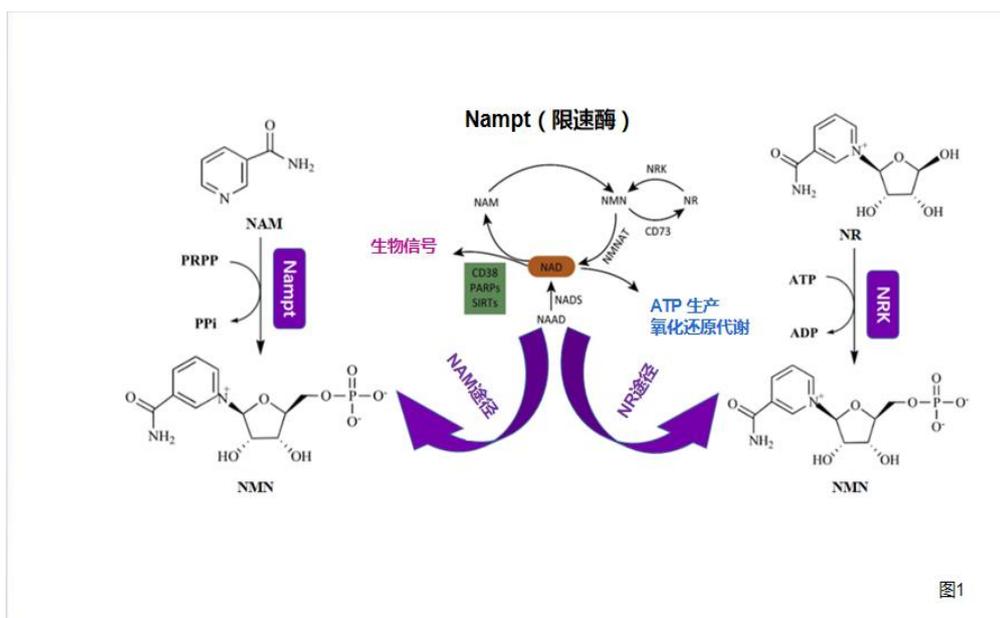


图1. NMN的生物合成途径和NMN在哺乳动物体内的补救途径

Nampt 是机体各种生命活动和能量代谢的重要分子, 敲除该基因的小鼠无法存活<sup>[13,18-19]</sup>。Nampt 是 NMN 生物合成中必不可少的酶, 催化 NAM 和焦磷酸核糖(PRPP)合成 NMN。目前, 很少有关于 Nampt 起源的报道。研究表明, 在 ATP 水解与 NMN 合成的弱耦合作用下, 人 Nampt 合成 NMN 体系的催化效率可提高 1100 倍, 对底物 NAM 的亲合力也大大提高<sup>[20]</sup>。近年来也有将 Nampt 表达应用于 NMN 生产的研究报道。乔治等人<sup>[16]</sup>分别过度表达来源于大肠杆菌中的 *Mus musculus*, *Shewanella oneidensis*, 和 *Haemophilus ducreyi* 的 Nampt, 并通过在发酵过程中添加底物 NAM 产生 NMN。其中, 大肠杆菌表达的源自杜克雷嗜血杆菌的 Nampt 的 NMN 产量可达 14.33mg/L。

筛选和表达具有优异酶学特性和稳定性的 Nampt 已成为 NMN 生物合成的关键。定向蛋白质进化技术在合成生物学和代谢工程中发挥了重要作用, 并被广泛用于酶分子工程<sup>[21]</sup>。酶可以在温和条件下催化生物体内复杂的生化反应。大多数酶可以从生物体中分离出来, 但由于受到外界环境温度、压力、盐分、pH 等因素的影响, 这些自然界中天然存在的酶在酶活性、稳定性、专一性等方面往往不能满足应用需求<sup>[22,23]</sup>。蛋白质的定向进化有效地解决了上述问题<sup>[24]</sup>。蛋白质定向进化的本质<sup>[25]</sup>是构建蛋白质分子多样性的文库, 并从文库中筛选出性状发生正向改变的突变体。半理性设计(SM)基于生物信息学中开发的一系列算法和程序<sup>[26]</sup>。通过模拟设计确定目的基因的突变位点, 有针对性地对蛋白

进行优化修饰, 构建高质量的筛选文库。简单地说, 半理性设计是在人为选择的位置或区域中的随机突变。许多文章报道了使用半理性设计方法来提高酶的催化活性、稳定性、底物特异性等<sup>[27-29]</sup>。

本研究从土壤中筛选出高产 NMN 天然菌株, 并对其发酵条件进行了优化。另外, 我们对 Nampt 酶进行了半理性设计优化, 显著提高了 NMN 的转化率, 为低成本生产 NMN 提供了新的候选菌株和新的 Nampt 酶序列。

## 1. 高产 NMN 菌株发酵条件的筛选与优化

### 1.1 从土壤中筛选 NMN 高产菌株

通过对邦泰生物工程有限公司排污口附近土壤微生物的富集筛选, 分离到 396 株。将菌株接种于 96 孔细胞板中, 对应于细胞板中的各菌株在与酶板相同的位置进行酶转化反应。然后, 通过荧光法测量产生的 NMN 的量。根据每孔检测到的荧光值确定 NMN 含量, 初步筛选出烟酰胺转化为 NMN 能力较强的菌株。我们初步获得了 29 株荧光值高(4000 以上)的菌株来进行进一步的重筛实验 (图 S1)。初筛后的 29 株菌株首先接种于不含烟酰胺的 LB 培养基中。经过酶反应体系测定(含缓冲液、底物、粗酶液), 最终筛选出 7 株高产 NMN 菌株, 其中 4-7 株产 NMN 的最高浓度为 44.7 $\mu$ M (图 2)。对 NMN 产量最高的三株菌株 1-2、3-4 和 4-7 进行革兰氏染色后在显微镜下拍照, 发现 1-2 为革兰氏阳性, 3-4 和 4-7 为革兰氏阴性细菌 (图 S2)。三株菌株送

至爱济生物进行 16SrDNA 测序鉴定。结果发现 1-2 属于芽孢杆菌属，而菌株 3-4 和 4-7 属于肠杆菌科。我们将 4-7 命名为

*Enterobacterchengduensis* 2021T4.7 (成都肠杆菌 2021T4.7)，并将菌株送至中国微生物菌种保藏中心保藏，菌种保藏号为 CGMCC No.21695。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3627	3829	3503	4560	2787	4927	2682	3928	2232	2544	2656	2586
B	4030	1850	2386	1499	1067	1203	1800	1304	1826	4667	1911	1799
C	4995	1866	1830	1007	2935	2643	1315	1917	2952	1599	1633	1884
D	1449	1219	2897	2829	1732	1821	2892	1628	2978	1165	1251	1267
E	1439	1939	1836	2957	2866	1012	2874	2806	1807	1386	1358	1370
F	1894	2870	1622	1009	2712	1638	1987	1976	1838	1136	1777	1838
G	1995	2609	1115	1619	1766	1551	1771	1865	1851	1846	1761	1761
H	1015	1759	1826	1917	1378	1761	4998	2583	1856	2981	1893	1872

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2420	1232	1635	2339	3939	4015	2572	4006	4667	1794	2205	3062
B	2140	2047	2130	1877	3908	1733	1653	2303	1824	1739	1801	1547
C	1639	1030	1904	1783	1575	1715	1658	3545	2501	1990	4974	1469
D	1733	1877	1992	1588	3084	1827	2579	1750	5454	1753	1622	1589
E	1686	1039	2001	1747	3244	2439	2386	1978	1718	1241	4711	1343
F	1605	1612	1783	1825	1315	1589	1699	4968	2383	1375	1394	1037
G	1355	1633	1939	2037	1438	1841	1942	1245	1147	1545	1951	1645
H	1825	1931	1735	3337	1638	1738	1839	1542	1448	1846	1751	2342

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4762	1432	3603	4619	4315	3045	2804	3289	3189	3257	2603	3331
B	4440	2194	3513	3713	3722	3483	2242	3188	2309	2448	2050	2405
C	3670	1891	2820	3059	2787	2904	2272	2541	2287	2383	2621	2430
D	3534	1960	2659	2710	2739	3164	1984	2314	2299	2472	2222	2141
E	3310	2619	3393	2823	2533	2480	1929	2237	2011	2081	2880	2219
F	4435	2198	2672	3040	2809	2525	1809	2381	2604	2657	2159	2276
G	3709	1966	2173	2896	3349	3109	2572	2756	2663	2919	2111	3331
H	3367	1909	3901	2658	2062	4405	2581	2625	4581	2471	2001	3999

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3784	3056	3097	2686	1972	4076	1882	2785	1997	3482	1237	3092
B	3381	3603	3230	5161	1971	2689	1385	1970	2265	2000	1454	1348
C	3617	5002	3125	2738	1200	3602	2051	2829	1312	3422	2263	1887
D	2543	2521	1863	3543	1914	2524	1958	3052	1898	1906	1926	1770
E	3061	5652	3371	2605	1721	3204	1695	2711	1627	5115	1377	2543
F	3317	2553	1915	2355	1792	2822	3151	3989	1719	4306	2449	2056
G	2448	2604	4456	2264	1000	5877	1691	2308	1955	3262	2246	4537
H	1551	1365	1210	1422	1245	1395	2247	2417	2332	3456	1372	1257

图 S1. NMN 含量测定(荧光值数据)

注：红色标记的数字是高于 4000 的荧光值

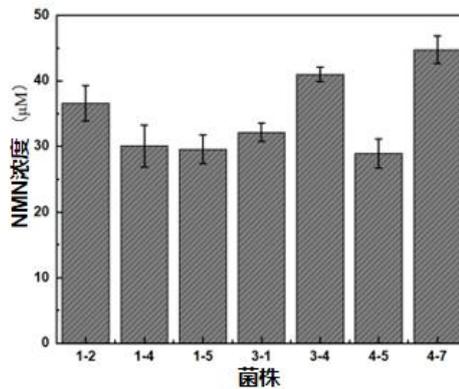


图 2. 菌株产生的 NMN 产量



图 S2. 革兰氏染色结果

左：1-2，中：3-4，右：4-7，比例尺适用于所有面板

## 1.2 菌株成都肠杆菌 2021T4.7 发酵培养基优化

### 1.2.1 发酵培养基碳源优化

首先，我们测试了七种常见碳源对成都肠杆菌 2021T4.7 生长和 NMN 产生的影响。在统一加入 1%碳源的情况下，通过测定 OD<sub>600</sub> 值判断细菌的生长情况，通过荧光法测定 NMN 的产生量。对于成都肠杆菌 2021T4.7 菌株的生长，结果表明最佳碳源为鼠李糖，其次为葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖和麦芽糖。对于成都肠杆菌 2021T4.7 的 NMN 生产能力，最好的碳源是葡萄糖，其次是可溶性淀粉和鼠李糖(图 3A)。考虑到本研究的主要目的是提高成都肠杆菌 2021T4.7 菌株的 NMN 生产能力，我们选择葡萄糖作为后续优化的碳源。随后，我们使用葡萄糖作为碳源来检测不同葡萄糖含量对 NMN 生产的影响。可以看出，葡萄糖含量越高，越有利于成都肠杆菌 2021T4.7 的生长，但变化幅度很小(图 3B)。对于成都肠杆菌 2021T4.7 产生 NMN 的能力，当添加 1%葡萄糖时，NMN 产量最高，为 47.36 $\mu$ M。因此，后续研究在发酵培养

基中加入 1%的葡萄糖作为碳源。

### 1.2.2 发酵培养基氮源优化

无机氮的常见来源包括铵盐和硝酸盐，而有机氮的常见来源主要是胰蛋白胨、大豆蛋白胨和酵母提取物。在本文中，研究了五种常见的氮源。菌株在含有 1%氮源的培养基中进行，以探索不同氮源类型对成都肠杆菌 2021T4.7 生长和产生 NMN 的影响。从图 3C 可以看出，成都肠杆菌 2021T4.7 生长最好的氮源是胰蛋白酶，其次是酵母提取物和大豆蛋白胨。对于成都肠杆菌 2021T4.7 产生 NMN 的能力，最好的氮源是胰蛋白胨，NMN 产量为 54.83 $\mu$ M，其次是酵母提取物和 NH<sub>4</sub>Cl。因此，在接下来的研究中，选择胰蛋白胨作为发酵培养基的氮源。我们进一步研究了不同胰蛋白胨含量对成都肠杆菌 2021T4.7 产生的 NMN 量的影响。从图 3D 可以看出，随着胰蛋白胨浓度的增加，成都肠杆菌 2021T4.7 的密度先升高后降低。当加入 1%胰蛋白胨时，对生长最有利。同样，对于成都肠杆菌 2021T4.7 产生 NMN 的能力，当添加 1.25%胰蛋白胨时，NMN 产量最高，为 55.67 $\mu$ M。

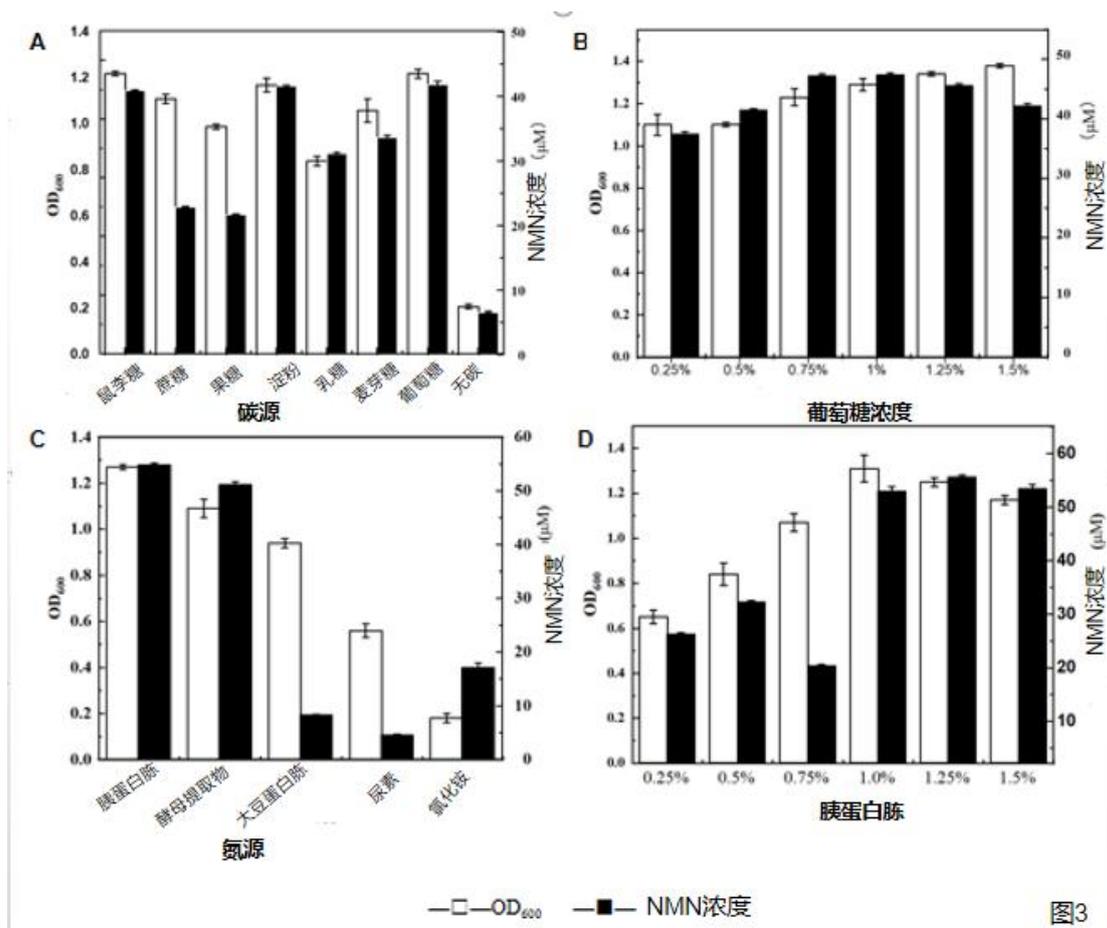


图 3. 碳源和氮源对成都肠杆菌 2021T4.7 细胞生长和 NMN 产生的影响 (A) 不同的碳源, (B) 不同的葡萄糖浓度, (C) 不同的氮源, (D) 不同的胰蛋白胨浓度

### 1.2.3 发酵培养基矿物优化

矿质元素是微生物细胞结构的重要组成部分, 是微生物生长必需的营养物质。其中, 磷是微生物生长必需的元素之一, 需要与碳、氮平衡。磷过多或不足都会影响微生物的生长和能量合成, 从而影响细胞的生长和代谢活动。我们研究了不同水平的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对成都肠杆菌 2021T4.7 菌株的生长及其 NMN 生产能力的影响。添加 0.25%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  最有利于细胞生长, 但当添加 0.75%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  时, NMN 产量最高, 为  $56.35\mu\text{M}$ (图 4A)。因此, 后续实验在发酵培养基中加入 0.75% 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。

在微生物所需的矿质元素中, 镁是细胞内某些酶的活性基团。镁在调节细胞质膜通透性、控制细胞质胶体状态和细胞代谢活动方面发挥作用。我们研究了  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  含量对成都肠杆菌 2021T4.7 生长和产生 NMN 能力的影响。如图 4B 所示, 含 0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  的发酵培养基 NMN 产生能力最好, NMN 产量为  $57.24\mu\text{M}$ 。

### 1.2.4 诱导剂 NAM 对成都肠杆菌 2021T4.7 产生 NMN 的影响

微生物细胞中的酶可分为两类: 诱导酶和组成酶。环境中存在诱导剂(通常是反应底物)是产生诱导型酶所必需的。诱导酶的合成依赖

于环境中的诱导物和基因控制。构成酶存在于细胞本身中，其合成仅受遗传物质控制。图 4C 显示，当培养基不含 NAM 时，成都肠杆菌 2021T4.7 菌株可以产生 NMN。然而，随着培养基中 NAM 诱导剂含量的增加，NMN 的产量也

随之增加，说明底物 NAM 诱导培养可以提高成都肠杆菌 2021T4.7 产生 NMN 的能力。当 NAM 添加量为 1% 时，菌株生长和 NMN 产量最佳，NMN 产量达到 57.67 $\mu$ M(图 4C)。因此，在后续实验中，发酵培养基中加入了 1% 的 NAM。

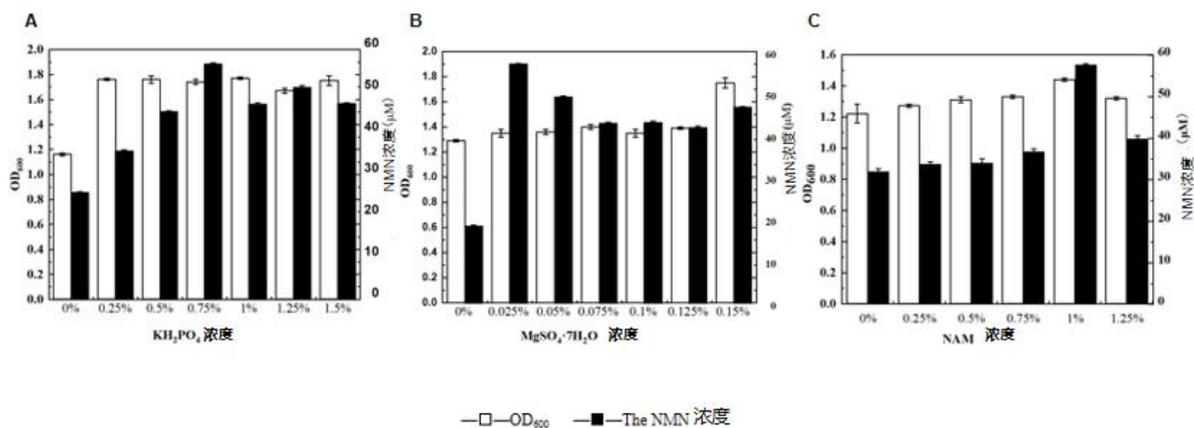


图4

图 4. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (A)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(B)和 NAM (C)对成都肠杆菌 2021T4.7 细胞生长和 NMN 产生的影响

### 1.3 成都肠杆菌 2021T4.7 生产 NMN 的发酵条件优化

#### 1.3.1 初始发酵 pH 优化

通常，微生物只能在特定的 pH 范围内生长，不同的微生物对 pH 条件的要求也不同。PH 过高或过低都不利于它们的生长和新陈代谢。pH 范围的宽度反映了微生物适应环境的能力，生长 pH 或酶产生的最佳 pH 范围通常很窄。因此，优化发酵培养基的初始 pH 值是必要的。从图 5A 可以看出，成都肠杆菌 2021T4.7 对环境的适应性很强，可以在 pH5.0-9.0 之间生长。当初始 pH 为 7.0 时，细菌的生长最好。当 pH 为 10.0 时，

细菌停止生长。但 NMN 产能随 pH 值先升高后降低，且幅度较大。NMN 的产量在培养基的初始 pH 值为 7.0 时最为强劲，最高可达 58.85 $\mu$ M(图 5A)。因此，后续实验中发酵培养基的初始 pH 为 7.0。

#### 1.3.2 发酵培养物接种的优化

接种量影响微生物细胞倍增率和生长迟缓期的长短。图 5B 显示接种量为 1% 时菌株生长最好，接种量为 1.5% 时菌株产生的 NMN 量最高，达到 59.63 $\mu$ M。因此，在后续研究中，发酵培养基以 1.5% 的接种量接种。

### 1.3.3 发酵温度的优化

发酵环境温度对细菌生长的影响表现在以下几个方面：(1)影响物质的溶解度。(2)影响细胞对营养物质的吸收和代谢产物的分泌。(3)影响酶活性。图 5C 表明，当温度在 25℃~37℃温度范围内时，菌株的生长没有产生明显的波动。当温度为 40℃时，细菌的生长受到抑制。NMN 在 37℃ 时产量最高，为 62.36μM。因此，在后续研究中发酵培养基的接种温度为 37℃。

### 1.3.4 发酵时间的优化

不同的发酵时间也会具体影响细菌的生长和代谢。本实验研究了不同发酵和培养时间对成都肠杆菌 2021T4.7 生长和 NMN 生产能力的影 响。随着孵育时间的增加，细菌密度和 NMN 产量先增加后减少(图 5D)。培养时间为 18h 时，细菌密度最大。当培养达到 20h 时，产生 NMN 的能力最强，NMN 的最大产量为 67.66μM(图 5D)。

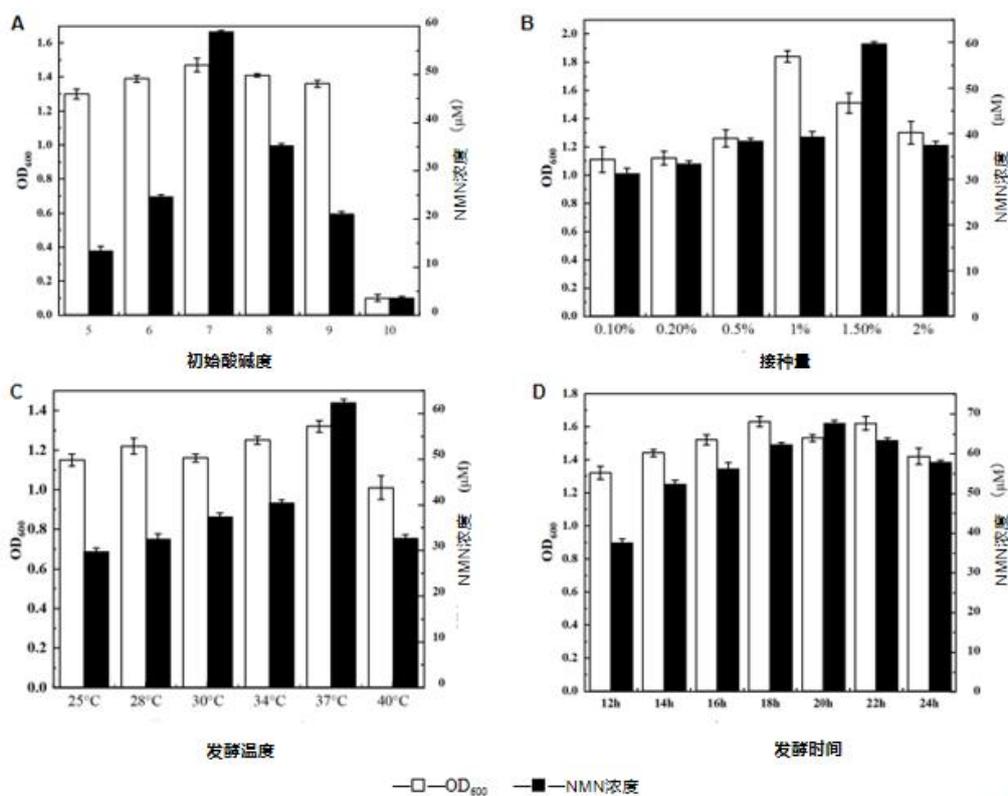


图5

图 5. 发酵条件对成都肠杆菌 2021T4.7 细胞生长和 NMN 产量的影响 (A.初始酸碱度; B.接种量; C.发酵温度; D.发酵时间)

## 2. 小鼠来源的烟酰胺磷酸核糖转移酶 (mNampt) 及其突变体的克隆表达

### 2.1 小鼠来源的 mNampt 的克隆和表达

小鼠来源的 mNampt 序列(表 S1)由苏州金维智公司在密码子优化后合成。目的基因两端有 HindIII 和 NdeI 酶切位点, 末端添加了 6×His 标签。将含有 mNampt 靶基因(pET-30a(+), pET-24a、pET-28a、ppsumo、psj-2、psj-5)的重组载体导入宿主大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆

菌 BL21(DE3)plySs 和 Rosetta(DE3)菌株。然后在多个载体和宿主中表达目的蛋白, 发现只有大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt 表达成功。在此表达菌株中, mNampt 与 SUMO 标签融合。大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt 蛋白表达电泳如图 S3A 所示。由于在合成基因序列的末端添加了 His 标签, 因此可以使用磁珠纯化蛋白, His 标签纯化后酶的缓冲液保持不变。蛋白纯化后的 SDS-PAGE 蛋白电泳图见图 S3B, 图中蛋白条带清晰可见, 背景无明显杂蛋白。

表 S1. 引物和基因序列

引物	序列 (5'→3')	参考
Nampt-F	TAATCCTTATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTC	
Nampt-R	AGGAAGCTTGCATATGAACGCTGCTGCTG	
N67K-F	CGGGCTTCAGTATATTCTTAAAAAATATCTTAAAGG	
N67K-R	TTTAAGAATATACTGAAGCCCGTAGAACACTGT	
S155I-F	GGATTGAAACAATTCTTGTTTCAGATCTGGTATCCTA	
S155I-R	GATCTGAACAAGAATTGTTTCAATCCAGTTTG	
N164L-F	CCTATTACAGTTGCTACACTGTCACGCGAAC	
N164L-R	CAGTGTAGCAACTGTAATAGGATACCAT	本研究
R166W-F	GTTGCTACAAACTCATGGGAACAGAAGAAG	
R166W-R	CCATGAGTTTGTAGCAACTGTAATAGGATACC	
A208G-F	GGAAACAGCTGGCATTGGCGGCTCAGCTCATCT	
A208G-R	GCCGCCAATGCCAGCTGTTTCCTGTGATGAAAC	
A245T-F	CCTGGTTATTCAGTTCTGCTACCGAACATTCAAC	
A245T-R	GGTAGCAGGAAGTGAATAACCAGGAAGT	
S248A-F	TCCTGCTGCTGAACATGCGACAATTACAG	
S248A-R	ACTATGTTTCAGCAGCAGGAAGTGAATAAC	

续表 S1.

引物	序列 (5'→3')	参考
V365L-F	ATTAACACACTTCAGGAAATTCTGGAAGGCATGAAAC	
V365L-R	CAGAATTTCTGAAGTGTGTTAATATCAACG	
S382M-F	ATTGAGAATGTCTCATTGGCATGGGCGGCGCTC	本项研究
S382M-R	CATGCCAAATGAGACATTCTCAATGGACC	
V467L-F	AGTGTTCAGAATGGCAAGCTGACGAAGTCCTACTC	
V467L-R	CAGCTTGCCATTCTTGAACACTGTATGAAGAAG	
mNampt 的突变体	基地变化	参考
N67K	AAC→AAA	
S155I	TCA→ATC	
N164L	AAC→CTG	
R166W	CGC→TGG	本项研究
A208G	GCT→GGC	
A245T	GCT→ACC	
S248A	TCA→GCG	
V365L	GTT→CTG	
S382M	TCA→ATG	
V467L	GTA→CTG	
基因	序列 (5'→3')	参考
mNampt 的优化(大肠杆菌)序列	CATATGAACGCTGCTGCTGAGGCCGAGTTCAATATATTGTTAGCG	
	ACCGACTCGTACAAGGTCACGCATTATAAACAGTATCCTCCTAA	
	CACATCAAAGGTCTACTCATATTTGAGTGCCGCGAGAAGAAGA	
	CGGAGAACTCGAAAGTCCGAAAGGTGAAGTATGAAGAAACAG	
	TGTTCTACGGGCTTCAGTATATTCTTAACAAATATCTTAAAGGCA	
	AAGTTGTTACAAAGGAGAAGATCCAGGAAGCTAAAGAAGTTTA	本项研究
	TCGCGAACATTCCAAGACGATGTCTTCAATGAGCGCGGCTGGA	
	ACTATATTCTTGAGAAGTACGACGGCCATCTCCTATTGAAGTTA	
	AAGCTGTTCTGAAGGCTCAGTTATTCTCGCGGCA	

续表 S1.

基因	序列 (5'→3')	参考
mNampt 的优化(大肠杆菌)序列	ACGTCCTGTTTACCGTCGAGAATACGGATCCTGAATGTTATTGGC	本项研究
	TTACAAACTGGATTGAAACAATTCTTGTTTCAGTCATGGTATCCTA	
	TTACAGTTGCTACAAACTCACGCGAACAGAAGAAGATCCTAGCT	
	AAATATCTTCTTGAAACATCAGGCAACCTTGATGGCCTGAATAT	
	AAACTTCATGATTTCGGGTACCGCGGCGTTTCATCACAGGAAAC	
	AGCTGGCATTGGCGCTTCAGCTCATCTTGTTAACTTTAAAGGCA	
	CAGATACAGTTGCTGGCATTGCTCTTATTAAGAAGTACTACGGCA	
	CAAAGGACCCAGTTCCTGGTTATTCAGTTCCTGCTGCTGAACAT	
	TCAACAATTACAGCTTGGGGAAAGGATCATGAGAAGGACGCGT	
	TCGAGCACATTGTTACACAGTTCAGTAGTTCCTGTTTCAGTTG	
	TTTCAGATTCTTATGATATTTATAACGCTTGTGAGAAGATCTGGG	
	GAGAGGACCTTCGCCATCTTATTGTTTCACGCTCAACAGAAGCT	
	CCTCTTATTATTCGCCCTGATTCAGGCAACCCTCTTGATACAGTT	
	CTTAAAGTTCTTGATATCTTGGCAAGAAGTTCCCGGTTACCGA	
	GAATCCAAGGGTTATAAACTCTTCCTCCTTATCTTCGCGTTAT	
	CAGGGCGATGGCGTTGATATTAACACACTTCAGGAAATTGTTGA	
	AGGCATGAAACAGAAGAAGTGGTCCATTGAGAATGTCTCATTG	
	GCTCAGGCGGCGCTTCTTCAGAACTTACACGCGATCTTCTT	
	AACTGTTCAATTAATGTTCTTATGTTGTTACAAACGGCCTTGGC	
	GTTAACGTGTTCAAAGATCCCGTAGCAGACCCTAACAAACGCTC	
AAAGAAGGGTC		

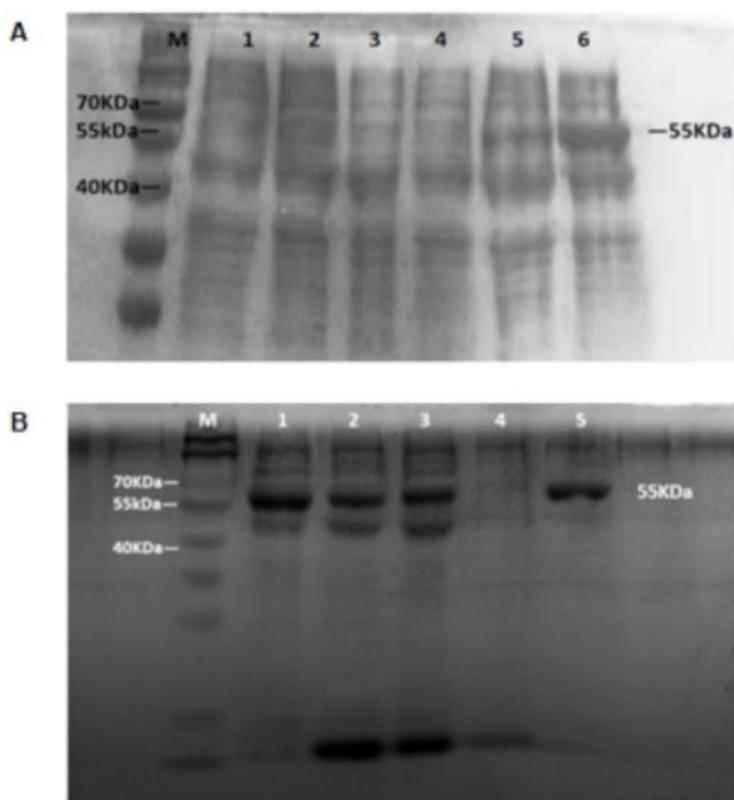


图 S3. SDS-PAGE 电泳图

(A) 不同宿主/载体的 Nampt 表达:

- 1-大肠杆菌 BL21(DE3)-pET-30a(+)-mNampt(+IPTG 0h),
- 2-大肠杆菌 BL21(DE3)-pET-30a(+)-mNampt(+IPTG 3h),
- 3-大肠杆菌 BL21(DE3)-pET-30a(+)-mNampt(+IPTG 12h),
- 4-大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt(+IPTG 0h),
- 5-大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt(+IPTG 3h),
- 6-大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt(+IPTG 12h)。

(B) Nampt 纯化, M: 标记, 1: 细胞, 2: 粗酶溶液, 3: 流通溶液, 4: 洗脱液, 5: 纯化蛋白

## 2.2 大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt 菌株的 NMN 产量

我们使用 HPLC 方法确定 NMN 和底物 NAM、PRPP 和 ATP 的峰值时间。可以看出, NMN、PRPP、ATP 和 NAM 的峰值时间分别为 3.826 分钟、4.757 分钟、4.059 分钟和 10.804 分钟(图 S4)。当这四种组分混合进样时, 各峰能很好地分离, 表明该 HPLC 方法可用于测定反应后 NMN 的收率。制备大肠杆菌

BL21(DE3)-ppsumo-mNampt 菌株的 Nampt 粗酶液。在酶反应体系中, NAM、PRPP、ATP、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub> 的终浓度分别为 1mM, pH 为 7.0。反应在室温下进行 15 分钟, 并在 95℃下加热 1 分钟以终止酶反应。图 S5 显示 NMN 标准品在 0~150μM 范围内呈线性关系, 计算出大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt 菌株的 NMN 产 mNampt 量为 84.08μM(28.08 毫克/升)。

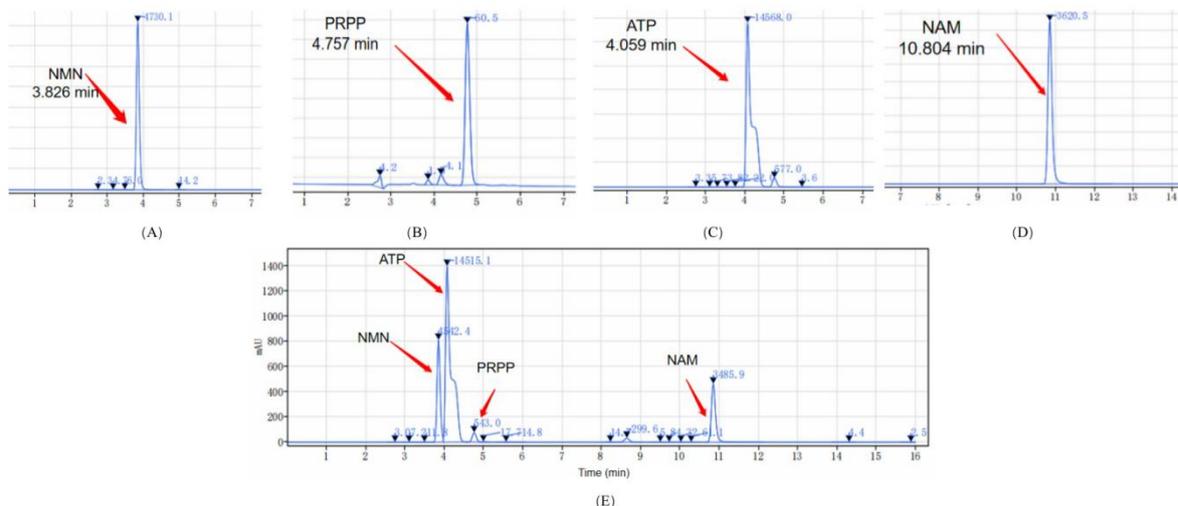


图 S4. 各组分的 HPLC 峰

A-E 分别是 NIMN、ATP、PRPP、NAMIN 标准和混合样品峰值输出图表

## 2.3 半理性设计 mNampt 对 NMN 生产的影响

### 2.3.1 mNampt 突变株对 NMN 产量的影响

我们从酶分子本身出发，采用基于结构分析和吉布斯自由能稳定性相结合的半理性设计策略。FoldX 和 DeepDDG 可用于预测高质量的突变位点，以模拟突变位点对吉布斯自由能和蛋白质稳定性变化的影响。我们首先使用 FoldX 和 DeepDDG 软件进行模拟，构建 mNampt 的蛋白质结构，预测其可能影响酶催化活性的关键位点，综合分析结果选取 10 个突变位点：N67K、S155I、N164L、R166W、A208G、A245T、S248A、V365L、S382M、V467L。然后，设计定点突变引

物 PCR 扩增引物(表 S1)，引物由爱集生物合成，然后分别构建大肠杆菌 DH5 $\alpha$ -ppsumo-mNampt 表达菌株。mNampt 突变株产生 NMN 的结果表明，10 株克隆突变株中有 8 株的突变活性高于野生株，其中 mNampt-V365L 突变株活性最高，NMN 产量为 135.99 $\mu$ M，即 45.42mg/L，比野生型 mNampt(84.17 $\mu$ M，或 28.11mg/L)高 62%(图 6)。与野生型相比，Nampt-S248A、Nampt-N164L、Nampt-S382M、Nampt-A245T 和 Nampt-A208G 的 NMN 产量增加了 34%、27%、27%、22%和 17%，而 NMNNampt-V467L 和 S155I 的产率分别下降了 53%和 31%。

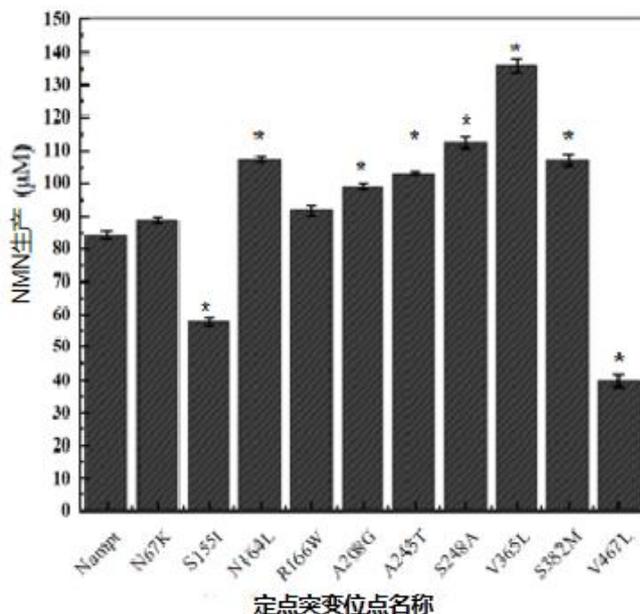


图6

图 6. mNampt 定点诱变与野生型 mNampt(对照)对 NMN 产量的影响。\* $P \leq 0.05$

### 3. 讨论

随着对 NAD<sup>+</sup>生物学研究的不断发展，人们对与年龄相关的功能衰退和疾病发病机制有了很多重要的见解。补充这些 NAD<sup>+</sup>中间体，例如烟酰胺核糖(NR)和 NMN，已显示出预防和治疗功效，可改善与年龄相关的病理生理学和疾病状态。关于产生 NMN 的底盘菌株的研究报告相对较少。此外，Nampt 生产 NMN 的技术路线也存在 Nampt 催化活性低、Nampt 来源少等问题。因此，一方面从土壤中筛选出 NMN 高产的天然菌株，另一方面构建优质高效的 Nampt 表达体系，提高 NMN 的产量。邦泰生物工程(深圳)有限公司是 NMN 原料药生产商，因此在其工厂下水管道附近采集土壤有望获得 NMN 高

产菌株。通过初筛和复筛筛选出 7 株在土壤中转化烟酰胺产生 NMN 能力强的菌株，其中 NMN 产量最高为 44.7μM，最低为 36.59μM(图 2)。此外，菌株 3-4 和 4-7 已被确定为属于肠杆菌科，据我们所知，之前没有关于肠杆菌作为生产 NMN 微生物底盘的报道。经过优化发酵条件，包括发酵培养基的优化和发酵条件的优化，成都肠杆菌 2021T4.7 菌株 NMN 的产量高达 67.66μM 或 22.61mg/L(图 5D)。杉山等人以 NR 营养缺乏型酵母培养基为筛选工具，从 174 株兼性厌氧乳酸菌(均为 Fructobacilli)中筛选出 3 株具有 NMN 生产活性的菌株，最大生产能力为 2.1mg/LNMN<sup>[30]</sup>。与之前的报道相比，成都肠杆菌 2021T4.7 展现了其作为高产 NMN 天然菌株

的潜力。

微生物合成 NMN 的关键是获得一株表达高 Nampt 催化活性的菌株。在本文中,合成了源自小鼠 Nampt 的基因序列(mNampt),并根据大肠杆菌密码子偏好对其进行了优化。然后以大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主细胞构建 pET-30a(+)载体并进行诱导表达,但 SDS-PAGE 电泳验证其未能表达蛋白。“生命之树”是由测序的基因组和 Gazzaniga 等人构建的系统发育树。报道了整个生命之树的微生物烟酰胺代谢<sup>[31]</sup>。根据生命树,大多数表达 Nampt 的微生物可能是致病的。因此,探索不同载体和宿主细胞对小鼠来源 mNampt 表达的影响,以寻找合适的酶基因载体和表达宿主。我们测试了六种重组载体(pET-30a(+), pET-24a, pET-28a, ppsumo, psj-2, psj-5)和三种表达宿主(E.coliBL21(DE3)、E.coliBL21(DE3)plySsandRosetta(DE3)),发现只有大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt 表达成功。这不同于 George 等人先前报道的大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 和 pET-28a(+)载体的组合<sup>[16]</sup>。这可能是因为 George 等人选择的 Nampt,来源于杜克雷嗜血杆菌,在生命之树中更接近于大肠杆菌。尽管小鼠来源的 Nampt 在生命之树中距离大肠杆菌更远,但我们获得了表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3)-ppsumo-mNampt,其 NMN 产量为 28.08mg/L,几乎是来自杜克雷嗜血杆菌的表达菌株的两倍。在大肠杆菌中很难获得 Nampt 的高效可溶性表达。起初我们使用 pET 表达系统,但目的蛋白表达量很低。近年来发现 SUMO 是一种分子伴侣,可以增加外源蛋白

的稳定性和溶解度。其作用机制可能是 SUMO 蛋白作为高度疏水的核心,为目标蛋白的折叠提供成核位点<sup>[32]</sup>,并促进蛋白之间的相互作用,使其能够正确折叠,最终增强融合蛋白的溶解性<sup>[33]</sup>。

如果了解酶分子的结构信息和机理,半理性设计或理性设计方法是定制高效生物催化剂的首选方法<sup>[28,34]</sup>,许多文章报道了使用半理性设计方法提高酶的催化活性、稳定性、底物特异性等<sup>[27-29]</sup>。我们利用 FoldX 和 DeepDDG 软件分析了目标蛋白 Nampt 的结构,预测了 10 个可能影响酶活性的位点,进行了酶的半理性设计。我们得到了 10 个突变体,其中 8 个比野生型更活跃(图 6)。其中 Nampt-V365L 突变体活性最高,NMN 产量为 135.99 $\mu$ M(45.42mg/L),转化率为 13.60%,比野生型(28.11mg/L)高 62%。Nampt-V365 位点从中性非极性缬氨酸突变为中性非极性亮氨酸表明亮氨酸对酶活性有积极影响。其次,突变体 Nampt-S248A 的催化活性比野生型菌株高 34%,表明疏水性氨基酸有利于改善该结构域的环境,从而增加 Nampt 的稳定性。结果还表明,一些突变体可能会有降低酶活性的副作用。例如, Nampt-V467L 由缬氨酸突变为酸性亮氨酸,酶活性显著降低,该菌株的 NMN 产量仅为 39.97 $\mu$ M,与野生型相比降低了 53%(图 6)。此外,与野生型相比, Nampt-S155I 的 NMN 产量也降低了 31%。这表明 NamptV467 和 S155 对 Nampt 的酶活性至关重要。

已经表明, mNampt 的 365 位点可能是影响酶活性的关键位点。从结构上看,缬氨酸比亮

氨酸脂肪族侧链更长，疏水性更强，这使得附近的蛋白质结构更加稳定，表明 V365 区域蛋白质结构的稳定可以增强 mNampt 酶蛋白对底物 NAM 的亲和力。突变体 V365L 在相同条件下可催化形成 135.99 $\mu$ mol/L(45.42mg/L)NMN，比野生型 mNampt 高 62%(图 6)，比 George 等人构建的重组大肠杆菌 MNM 表达株(17.26mg/L)产量高 2.6 倍。廖等过度表达大肠杆菌中来自 *Meiothermus ruber* 的 Nampt，以 PRPP 和 NAM 为底物进行酶促反应 10 分钟，得到 34mg/LNMN<sup>[35]</sup>。据我们所知，45.42mg/L 的 NMN 含量是大肠杆菌中最好的产物。从现有证据来看，疏水区域的增加有助于提高 mNampt365 位点附近结构的稳定性。我们推测该区域结构的稳定增加了酶蛋白对底物 NAM 的亲和力，导致在酶催化过程中形成更紧密的结合口袋，从而构成有效的空间位阻<sup>[36]</sup>。

在哺乳动物中，从 NAM 开始的补救途径是主要的 NAD<sup>+</sup>生物合成途径<sup>[37]</sup>。NMN 的生物合成生产一般以 NAM 和 PRPP 为底物，NMN 是在 Nampt 的催化下生成的(图 1)。NMN 中的磷酸盐主要来源于 ATP 或 PRPP 等能量物质(图 1)。这两种前驱体的市场价格较高，也导致该方法的生产成本较高，严重制约了其应用和发展。未来可通过合成生物学方法改进生物合成途径，绕过 PRPP 和 ATP 作为能量物质的途径，同时尝试使用廉价的 NAM 和 NR 作为起始原料，可显著降低生产成本，促进 NMN 产业化生产的推广。NR 一步转化为 NMN 被认为是 NMN 最有前途的合成路线。He 等人<sup>[38]</sup>在优化条件下使用

全细胞 NRK-2 作为催化剂，反应混合物中的 NMN 产量高达 12.6g/L，远高于之前的报道。2022 年，Huang 等人以葡萄糖和 NAM 为底物发酵合成 NMN。通过优化分批补料工艺并在 5L 生物反应器上异源表达源自弧菌噬菌体 KVP40 的 Nampt，NMN 的产量达到 16.2g/L<sup>[39]</sup>。这是目前发酵法 NMN 产量最高的。此外，酵母耦合发酵可直接为 NMN 合成提供 ATP，降低 ATP 成本。NMN 提取纯化技术需要进一步研发，以降低其提取成本。

## 4. 材料和方法

### 4.1 细菌菌株和培养基

购自 Takara(日本)的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 用于质粒克隆和长期储存。购自 Takara(日本)的大肠杆菌 BL21(DE3)、Rosetta(DE3)和大肠杆菌 BL21(DE3)plySs 用于蛋白表达。由于 Nampt 使用烟酰胺来产生 NMN，因此设计了一种以烟酰胺为单一碳源的筛选培养基来培养和筛选产生 NMN 的菌株。本研究使用的培养基及其组成如下：富集培养基(pH=7)：烟酰胺(2g/L)、葡萄糖(5g/L)、酵母膏(5g/L)、蛋白胨(5g/L)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O(14g/L)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(5.2g/L)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(2g/L)。筛选培养基(pH=7)：去除葡萄糖的富集培养基配方，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(14g/L)。平板分离培养基：在筛选培养基中加入琼脂粉(12.5g/L)。培养保存培养基(pH=7)：胰蛋白胨(10g/L)，酵母提取物(5g/L)，氯化钠(5g/L)。种子培养基(pH=7)：胰蛋白胨(10g/L)，酵母提取物(5g/L)，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1g/L)，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O(2.5g/L)，

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.5g/L)。发酵培养基(pH=7): 烟酰胺(1g/L)、胰蛋白胨(10g/L)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1g/L)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2.5g/L)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.5g/L)。

#### 4.2 天然高产 NMN 菌株筛选

收集邦泰生物科技有限公司(中国深圳)排水管附近的土壤, 去除多余成分, 预处理后制备种子溶液(10mL/50mL)。在恒温摇床(180rpm)中于 37°C 摇动培养 15 分钟。将种子溶液添加到发酵培养基(10mL/50mL)中, 接种量为 1%, 并在相同条件下孵育 12 小时。将 1mL 细菌溶液制备成粗酶溶液和酶反应系统(50mM TrisHCl 缓冲液、0.02% 牛血清蛋白 BSA、12mM MgCl<sub>2</sub>、2mM ATP、2mM 二硫苏糖醇、80μM 烟酰胺、40μM 5-磷酸核糖-1-焦磷酸盐(PRPP), 细菌溶液 12.5μL)。其中, PRPP 不稳定, 需现用现配。95°C 反应 1 分钟后, 冰上冷却终止反应。使用酶联免疫吸附测定(TECAN, BioTek, 美国)检测 OD<sub>445</sub> 处的 NMN 含量并计算转化率。筛选出的菌株采用革兰氏染色法, 并由广州爱吉生物科技有限公司进行 16SrDNA 测序鉴定。

#### 4.3 蛋白质表达载体的构建

蛋白表达载体 pET-30a(+), pET-28a(+) 和 pET-24a(+) 保存于本实验室。蛋白表达载体 ppsumo、psj-2、psj-5 由中国科学院先进技术研究院 EZ-lab 捐赠。这些载体都是大肠杆菌蛋白表达载体, PET 载体有 N 端 T7 标签和 C 端 His 标签, ppsumo 载体有 SUMO 标签。

来自小鼠的重组烟酰胺磷酸核糖基转移酶(mNampt)基因序列(表 S1)由苏州金维智公司合成。mNampt 基因序列针对在大肠杆菌中的表达

进行了优化(考虑密码子使用频率和 GC 含量, 消除了不需要的限制性序列), 两端包含消化酶切位点 HindIII 和 NdeI, 并在序列的结尾添加了 6×His 标签。

mNampt 基因被 HindIII 和 NdeI 双酶消化, 并克隆到 pET-30a(+) 表达载体中, 该载体允许在 T7lac 启动子的控制下表达蛋白质。还使用相同的方法将 mNampt 基因克隆到 pET-28a(+), pET-24a(+), ppsumo、psj-2 和 psj-5。如下产生了六个这样的质粒: 将含有来自小鼠的 Nampt 基因的 mNampt-PET 载体克隆到大肠杆菌 DH5α 中, 并在 -80°C 下保存(作为甘油原液)。将产生的质粒化学转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中。在琼脂平板上选择转化的卡那霉素(km)抗性细菌。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和使用 Nampt-F 正向和 Nampt-R 引物进行 PCR 扩增来验证载体的存在(表 S1)。对不同的表达菌株(大肠杆菌 BL21(DE3)、Rosetta(DE3) 和 大肠杆菌 BL21(DE3)plySs)进行克隆和转化以表达 Nampt 酶。

使用 ppsumo-Nampt(m) 质粒作为模板的 mNampt 突变质粒的半理性设计。FoldX 和 DeepDDG 软件用于预测 mNampt 的高质量突变位点。点突变 PCR 扩增引物(表 S1)由爱极生物设计合成, 然后分别扩增得到突变序列, 然后按照同源重组的手工方法试剂盒(Novazan Biotechnology)构建重组 ppsumo-mNampt 突变质粒。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和使用 Nampt-F 正向和 Nampt-R 引物进行 PCR 扩增来验证载体的存在(表 S1)。在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行克

隆和转化。

#### 4.4 细菌生长条件

为了质粒克隆目的、重组蛋白表达的初步评估、生长培养基中耐受的 NAM 浓度的确定、蛋白质诱导和细胞密度的优化，细菌在 Luria-Bertani 中 37°C 的摇瓶(180rpm)培养箱中生长(LB)培养基补充有抗生素用于质粒维持(表达载体卡那霉素 50 $\mu$ g/mL, pLysS 质粒 25 $\mu$ g/mL 氯霉素)。细菌生长动力学记录为细胞密度，使用分光光度计测量为 600nm 光散射。

对于 mNampt 的诱导表达菌株，将菌株接种到种子培养基中，以 180rpm 孵育，在 37°C 下振荡 12 小时，然后以 1%接种量转移到含有卡那霉素的发酵培养基中。然后在相同条件下按 2%接种量扩充卡那霉素发酵培养基，当 OD 在 0.5~0.6 之间时，加入 0.25mMIPTG，18°C 诱导表达 16h。通过 SDS-PAGE(8%分离胶和 4%浓缩胶)确认蛋白质的存在。

#### 4.5 细菌的转化

将大约 100 $\mu$ L 化学感受态细胞与 1 $\mu$ L 质粒 DNA 混合，这些 DNA 来自小量制备(携带合成 mNampt 的质粒)(0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L)。将试管置于冰上 30 分钟，然后在预热至 42°C 的水浴中热激 45 秒，然后在冰上冷却 2 分钟。然后，加入体积为 700 $\mu$ L 的 LB 培养基，并在 37°C、180rpm 振荡条件下孵育 1 小时。将细胞接种在含有特定抗生素的琼脂培养皿上进行选择(10 $\mu$ L/板)，并在 37°C 下放置过夜。第二天，从每个平板中选择单个菌落并接种在含有用于维持质粒的抗生素的 LB 培养基中。一天后，使用 Omega 的“质粒

提取试剂盒”从 1mL 过夜培养物中提取质粒 DNA。通过 1%琼脂糖凝胶电泳确认克隆载体的存在。DNA 浓度和纯度由 NanoDrop (ThermoScientific)测定。

**通过 Nampt 粗酶溶液生产 NMN。**使用 pH7.4 的 PBS 缓冲液将诱导菌液调至 OD<sub>600</sub> 至 1.0，然后浓缩 5 倍得到粗 Nampt 酶液。均匀加入粗酶液 12.5 $\mu$ L 和母液 12.5 $\mu$ L(1mM 烟酰胺、1mMATP、1mMPRPP、1mM 氯化镁、1mM 氯化锰)，室温反应 15 分钟。将反应液在 95°C 金属浴中加热 1 分钟使酶失活。

#### 4.6 蛋白质纯化

通过以 3000g 离心将细菌细胞与生长培养基分离。分别收集上清液，将细胞重新悬浮在相同体积的水中，并使用 Soniprep150 超声波破碎机(SANYO)在冰上超声裂解 10 分钟(5 秒，暂停 5 秒)。破碎的粗酶溶液可储存在-20°C。使用 His•Bind 纯化试剂盒(Novagen、MerckKGaA、Darmstadt、Germany)纯化蛋白质，并根据制造商的方案脱盐。使用牛血清白蛋白作为标准，通过 BSA 蛋白质定量试剂盒(Amresco)测定蛋白质浓度。

#### 4.7 荧光 NMN 测定

荧光衍生法适用于 96 孔板，将 50 $\mu$ L 反应液、10 $\mu$ L20%苯乙酮和 20 $\mu$ L2MKOH 溶液加入黑色酶板，置于冰水中。在冰上孵育 10 分钟后，向每个孔中加入体积为 90 $\mu$ L 的 88%甲酸，并将板在 37°C 下孵育 10 分钟。在 382nm 的激发波长下，在分光光度计上测量 445nm 的紫外线发射。通过内插外标 NMN 的 5 个标准样品稀释度，

获得浓度范围为 0~150 $\mu$ M 且相关系数为 0.99 的校准曲线。来自未诱导培养物的细菌细胞裂解物用作对照。

**HPLC 法检测 NMN。** HPLC 法检测 NMN 具有灵敏度强、精密度高的特点。该方法基于 Kurnasov 等人的研究<sup>[40]</sup>。选择浓度为 0.1mol/L 的 100%磷酸二氢钠溶液分离 ATP、NMN 和 NR。选择甲醇作为有机相，磷酸二氢钠作为流动相梯度洗脱，从而洗脱反应体系中的碎片。反应后，用 MicroconYM-10 离心过滤器(Amicon, Bedford, MA)通过微量超滤去除蛋白质，适当稀释后在 ChromCoreC18 反相柱 (5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250mm) 上分析滤液。离子对分离在 0.1mol/LNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O(pH5.5)和流动相(100%甲醇)中以 1ml/min 进行等度分离。样品注射体积为 20 $\mu$ L，并使用 Gilson (Middleton, WI)HPLC 系统在 254nm 处进行监测。采用 Origin2019b 软件对数据进行处理，绘制以 NMN 浓度为横坐标，样品峰面积为纵坐标的标准曲线。

#### 4.8 统计方法

使用 SPSSv.18 软件进行方差分析。每个数据为至少 3 次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。统计显著性定义为  $P \leq 0.05$ 。

#### 致谢

这项工作得到了国家重点研发计划 (2021YFA0910800)、广东省自然科学基金 (2022A1515012043)、深圳市科技计划 (ZDSYS20210623100800001)和 2022 年省(广东)

科技创新战略专项(大专项+任务清单)项目计划 (STKJ2023044)的支持。

#### 利益冲突

本文作者没有需要声明的利益冲突。

#### References

- [1] Wang X, Hu X, Yang Y, et al. Nicotinamide mononucleotide protects against  $\beta$ -amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death. *Brain Research*, 2016, 1643: 1–9.
- [2] Khan J A, Forouhar F, Tao X, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism as an attractive target for drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11(5): 695–705.
- [3] Fletcher RS, Ratajczak J, Doig CL, et al. Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. *Molecular Metabolism*, 2017, 6(8): 819–832.
- [4] Frederick D, Loro E, Liu L, et al. Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle – ScienceDirect. *Cell Metabolism*, 2016, 24(2): 269–282.
- [5] Guan Y, Wang SR, Huang XZ, et al. Nicotinamide Mononucleotide, an NAD + Precursor, Rescues Age-Associated

- Susceptibility to AKI in a Sirtuin 1–Dependent Manner. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017, 28(8): 2337–2352.
- [6] Uddin GM, Youngson NA, Sinclair DA, et al. Head to Head Comparison of Short–Term Treatment with the NAD<sup>+</sup> Precursor Nicotinamide Mononucleotide (NMN) and 6 Weeks of Exercise in Obese Female Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7: 258.
- [7] Fukamizu Y, Uchida Y, Shigekawa A, et al. Safety evaluation of  $\beta$ –nicotinamide mononucleotide oral administration in healthy adult men and women. *Scientific Reports*, 2022,12(1):14442.
- [8] Nadeeshani H, Li J, Ying T, et al. . Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti–aging health product – Promises and safety concerns. *Journal of Advanced Research*, 2021, 37:267–278.
- [9] Park JH, Long A, Owens K, et al. Nicotinamide mononucleotide inhibits post–ischemic NAD<sup>+</sup> degradation and dramatically ameliorates brain damage following global cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease*, 2016, 95: 102–110.
- [10] Yano M, Akazawa H, Yabumoto C, et al. Monocyte–derived extracellular Nampt–dependent biosynthesis of NAD<sup>+</sup> protects the heart against pressure overload. *Journal of Cardiac Failure*, 2015, 21(10): S178–S178.
- [11] Mills KF, Yoshida S, Stein LR, et al. Long–Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age–Associated Physiological Decline in Mice. *Cell Metabolism*, 2016, 24(6): 795–806.
- [12] Long AN, Owens K, Schlappal AE, et al. Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an Alzheimer's disease–relevant murine model. *BMC Neurology*, 2015, 15(19): 1–14.
- [13] Revollo JR, Krner A, Mills KF, et al. Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in  $\beta$  Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme. *Cell Metabolism*, 2007, 6(5): 363–375.
- [14] Caton PW, Kieswich J, Yaqoob MM, et al. Nicotinamide mononucleotide protects against pro–inflammatory cytokine–mediated impairment of mouse islet function. *Diabetologia*, 2011, 54(12): 3083–3092.
- [15] Stromsdorfer KL, Yamaguchi S, Yoon MJ, et al. NAMPT–Mediated NAD<sup>+</sup> Biosynthesis in Adipocytes Regulates Adipose Tissue Function and Multi–organ Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Reports*, 2016, 16(7): 1851–1860.

- [16] George M, Roua-Gabriela P, Gheorghe S, et al.  $\beta$ -nicotinamide mononucleotide (NMN) production in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12278-.
- [17] Marinescu GC, Popescu RG, Dinischiotu A. Size Exclusion Chromatography Method for Purification of Nicotinamide Mononucleotide (NMN) from Bacterial Cells. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4433.
- [18] Wang P, Xu TY, Guan YF, et al. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovascular Research*, 2009, 81(2): 370-380.
- [19] Veer ED, Ho C, O'neil C, et al. Extension of Human Cell Lifespan by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(15): 10841-5.
- [20] Burgos ES, Schramm VL. Weak Coupling of ATP Hydrolysis to the Chemical Equilibrium of Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 2008, 47(42): 11086-11096.
- [21] Cobb RE, Chao R, Zhao H. Directed Evolution: Past, Present, and Future. *AIChE Journal* 2013, 59(5): 1432-1440.
- [22] Andreas, Bommarius. Biocatalysis: A Status Report. *Annual Review of Chemical & Biomolecular Engineering*, 2015, 6(1): 319.
- [23] Reetz MT. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(34): 12480-12496.
- [24] Chen Z, Zeng AP. Protein design in systems metabolic engineering for industrial strain development. *Biotechnology Journal*, 2013, 8(5): 523-533.
- [25] Yakov K, Eynat DG, Tawfik DS. TRINS: a method for gene modification by randomized tandem repeat insertions. *Protein Engineering Design & Selection*, 2012, 25(9): 437-444.
- [26] Cheng F, Zhu L, Schwaneberg U. Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties. *Chemical Communications*, 2015, 51(48): 9760-9772.
- [27] Yu H, Qiu S, Cheng F, et al. Improving the catalytic efficiency of aldo-keto reductase Km AKR towards *t*-butyl 6-cyano-(3*R*,5*R*)-dihydroxyhexanoate via semi-rational design. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 90: 103018.
- [28] Zhang Q, Lu XF, Zhang Y, et al. Development of a robust nitrilase by fragment swapping and semi-rational design for efficient biosynthesis of pregabalin precursor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(2): 318-329.

- [29] Xu P, Ni ZF, Zong MH, et al. Improving the thermostability and activity of *Paenibacillus pasadenensis* chitinase through semi-rational design. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 9–15.
- [30] Sugiyama K, Iijima K, Yoshino M, et al. Nicotinamide mononucleotide production by fructophilic lactic acid bacteria. *Scientific Reports*, 2021, 11: 7662.
- [31] Gazzaniga F, Stebbins R, Chang SZ, et al. Microbial NAD metabolism: lessons from comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2009, 73(3):529–541.
- [32] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2004, 5(1–2): 75–86.
- [33] Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73, 355–382.
- [34] Lutz S. Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(6): 734–743.
- [35] Liao YB, Wu MH, Ling SL, et al. Expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase in *Escherichia coli* and catalytic synthesis of nicotinamide mononucleotide. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(2): 87–93, 182 .
- [36] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 891–903.
- [37] Imai S, Yoshino J. The importance of Nampt/NAD/SIRT1 in the systemic regulation of metabolism and ageing. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 2013, 15(s3): 26–33.
- [38] He Z, Yang X, Tian X, et al. Yeast Cell Surface Engineering of a Nicotinamide Riboside Kinase for the Production of  $\beta$ -Nicotinamide Mononucleotide via Whole-Cell Catalysis. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(10): 3451–3459.
- [39] Huang ZS, Li N, Yu SQ, et al. Systematic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of nicotinamide mononucleotide from nicotinamide. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(9): 2979–2988.
- [40] Kurnasov OV, Polanuyev BM, Ananta S, et al. Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: identification and implications in NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(24): 6906–6917.

# Screening of Natural High-producing NMN Strains and Biosynthesis of NMN by Nampt

Chao Li<sup>1,2,3#</sup>, Zouguo Long<sup>1#</sup>, Haichao Zhang<sup>1#</sup>, Yuhui Lin<sup>4</sup>, Liqing Zhao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

<sup>2</sup> College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

<sup>3</sup> Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041, China;

<sup>4</sup> Shantou Tianyue Technology Innovation Research Institute Co., Ltd.;

# These authors contributed equally to this work

\* Corresponding author: Liqing Zhao, Email: lqzhao@szu.edu.cn

**Abstract:** Nicotinamide mononucleotide (NMN) is an endogenous substance in humans with high safety and thermal stability, and its application in cosmetics, medical health, and functional foods has received widespread attention. However, the synthesis process of NMN has problems such as high cost, time-consuming and low yield, which limits the large-scale industrial application of NMN to a certain extent. Nicotinamide phosphate ribose transferase (Nampt) is a critical enzyme in a technical route in the biological synthesis of NMN, which can catalyze the synthesis of NMN by Nicotinamide (NAM) and Phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP). Screening and expression of a Nampt with excellent enzymatic properties and stability is the key to the synthesis of NMN by this method. At present, the main problems in the technical route of NMN production by Nampt are that the catalytic activity of Nampt is low. And the source of Nampt is small and limited, so we isolated the microorganism with high NMN production, *Enterobacter chengduensis* 2021T4.7, and optimized its fermentation conditions. The yield of NMN is up to 67.66  $\mu\text{M}$ . In addition, we synthesized Nampt and constructed related recombinant high-yield engineering bacteria. We semi-rationally designed the Nampt structure derived from mice and obtained mutant mNampt-V365L with NMN yields as high as 135.99  $\mu\text{M}$  increased by 62% compared with wild type. Here, we screened high-yield NMN natural strains, and obtained high-yield strains through the semi-rational design optimization of Nampt enzyme, which provided new chassis microorganisms and new ideas for the conversion rate of NMN.

**Keywords:** Nicotinamide mononucleotide; Fermentation conditions optimization; Semi-rational design