

# 生物酶工程与β-烟酰胺单核苷酸的合成

田富贤 21301050157 临床医学（五年制）

β-烟酰胺单核苷酸(NMN)是哺乳动物体内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸补救合成途径的前体物质。研究表明，烟酰胺单核苷酸在延缓衰老、治疗帕金森等老年病、调节胰岛素分泌、调控 mRNA 的表达等方面具有医疗保健效果。目前，化学合成法制备 NMN 的技术较为成熟，但是存在食品安全、产生手性化合物和环保等问题；生物催化法合成 NMN 能更好地避开这些缺陷。

## 一、技术原理

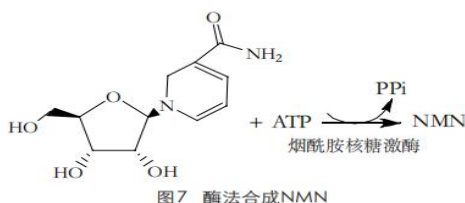
### （一）生物酶工程技术

生物酶工程，即用基因重组技术生产酶以及对酶基因进行修饰或设计新基因，从而产生性能稳定，具有新的生物活性及催化效率更高的酶。因此酶工程可以说是把酶学基本原理与化学工程技术及重组技术有机结合而形成的新型应用技术。

生物酶工程主要包括三个方面：(1)用 DNA 重组技术(即基因工程技术)大量地生产酶(克隆酶)；(2)对酶基因进行修饰，产生遗传修饰酶(突变酶)；(3)设计新的酶基因，合成自然界不曾有过的、性能稳定、催化效率更高的新酶。

### （二）β-烟酰胺单核苷酸的酶法合成

2016 年，苏州汉酶公司以烟酰胺核糖为底物、ATP 为磷酸供体，在烟酰胺核糖激酶的催化作用下生成烟酰胺单核苷酸。该反应结束后发现烟酰胺核糖转化率达 90%以上。



2018 年，尚科生物报道以 D-5-磷酸核糖、ATP 和烟酰胺为原料，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活性细胞，实现了高效生物催化合成β-烟酰胺单核苷酸。

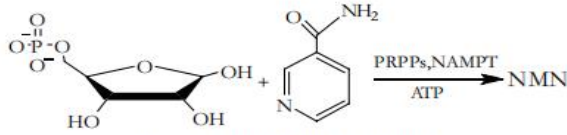


图8 固定化细胞催化合成NMN

### (三) 利用生物酶工程大量生产烟酰胺核糖激酶

基本原理：利用分子克隆技术、基因工程技术获得烟酰胺核糖激酶的重组大肠杆菌（或其他微生物菌）表达菌株，然后将重组大肠杆菌发酵，制备得含有烟酰胺核糖激酶的重组细胞，或者制备得到烟酰胺核糖激酶的冻干粉。具体操作流程如下：

#### 1、 利用基因工程构建重组菌株

将编码烟酰胺核糖激酶的基因片段进行密码子序列优化后，加上 Nde I 和 BamH I 酶切位点，连入 pET30a 载体，将重组质粒转化进入大肠杆菌 BL21 中，利用 IPTG 诱导目的蛋白表达，得到烟酰胺和糖激酶的重组大肠杆菌表达菌株。

#### 2、 制备含烟酰胺核糖激酶的重组细胞

将含有烟酰胺核糖激酶的重组大肠杆菌表达菌株接种到培养基中，37℃ 振荡培养两次后加入 IPTG 20℃ 振荡培养，离心收集细胞，获得重组细胞。

#### 3、 烟酰胺核糖激酶冻干粉的制备

将制得的烟酰胺核糖激酶重组细胞在冰浴中超声破碎，经离心收集上清液，冻干后获得烟酰胺核糖激酶的冻干粉，可用于催化合成 β-烟酰胺单核苷酸。

## 二、 技术应用

烟酰胺单核苷酸是辅酶 NAD<sup>+</sup> 的关键前体之一，在生命过程发挥重要作用。在哺乳动物体内，NMN 主要由烟酰胺在烟酰胺品算核糖转移酶的催化下生成，随后 NMN 在烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶的催化下生成 NAD<sup>+</sup>。NMN 在人体内通过转化为 NAD<sup>+</sup> 以发挥其生理功能。近期，人们发现 NMN 可以应用于药品和保健品领域，具有多种疗效。例如，研究人员发现 NMN 可用于抗衰老抗氧化治疗、角膜障碍治疗和改善年龄相关的肥胖症，对高血脂、神经变



性疾病、动脉硬化等病症具有较好的缓解作用。NMN 是一种近年来受到广泛研究和关注的保健品原料，也是用来合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶 I)的关键中间体。其在抗衰老等方面有巨大潜力，在日本和美国均有相关的保健品上市销售，且售价昂贵(1.8 万元/kg)。在商业化产品方面，美国 Herbalmax 公司最早开发了基于 NMN 的保健品——瑞维拓 NMN9000。

### 三、技术局限与发展方向

生物酶催化法因不含有机溶剂残留，也不存在手性问题，且制备的 NMN 与机体内的同型，因而是一种较为绿色环保的制备方法。目前，生物催化法一般是以烟酰胺和磷酸核糖基焦磷酸为底物，在烟酰胺磷酸核糖转移酶的催化下生成 NMN。但是，NMN 中磷酸根主要来源于 ATP 或 PRPP 等能量物质，这 2 种前体的市场价格较高，也导致该生物催化法的生产成本较高，严重制约了其应用和发展。