



基于 NADH 焦磷酸酶高效表达的 NMNH 生物转化合成

李雪媛¹, 龚劲松^{1*}, 苏畅¹, 李恒¹, 徐国强², 许正宏^{2,3}, 史劲松¹

1 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 四川大学轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065

李雪媛, 龚劲松, 苏畅, 李恒, 徐国强, 许正宏, 史劲松. 基于 NADH 焦磷酸酶高效表达的 NMNH 生物转化合成[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2419-2433.

LI Xueyuan, GONG Jinsong, SU Chang, LI Heng, XU Guoqiang, XU Zhengong, SHI Jinsong. Efficient expression of NADH pyrophosphatase promotes the synthesis of NMNH by biotransformation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2419-2433.

摘要: 辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)作为人体内重要的辅酶, 在维持细胞生长、分化和能量代谢以及细胞保护方面起着重要作用。还原型烟酰胺单核苷酸(reduced nicotinamide mononucleotide, NMNH)是一种有效的 NAD⁺增强剂, 可以快速、高效地提高组织中 NAD⁺水平。NADH 焦磷酸酶可将还原型辅酶 I (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 转化为 NMNH 以促进 NAD⁺的再生。【目的】在枯草芽孢杆菌中构建 NADH 焦磷酸酶表达体系并实现 NMNH 的生物转化合成。【方法】通过载体筛选成功在枯草芽孢杆菌 WB600 中实现 NADH 焦磷酸酶的胞内表达, 结合启动子工程提升其酶活, 同时通过培养基优化及 5 L 发酵罐放大发酵策略进一步考察重组酶的工业应用潜力。在此基础上采用全细胞催化体系进行 NMNH 的生物转化。【结果】NADH 焦磷酸酶的初始表达酶活为 1.70 U/mL, NMNH 产量为 135 mg/L。通过启动子工程化改造, 将酶活提升了 41%; 此外, 培养基优化及 5 L 发酵罐放大发酵策略将酶活进一步提升至 5.02 U/mL, 较摇瓶水平提升 1.09 倍; 在此基础上采用全细胞催化体系进行 NMNH 生物转化, 获得 NMNH 产量为 1.20 g/L, 较初始产量提高了 7.88 倍。【结论】本研究开发了 NADH 焦磷酸酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达体系, 并采用全细胞催化方式实现了 NADH 到 NMNH 的高效转化, 为 NMNH 的生物合成提供了新思路。

资助项目: 国家自然科学基金(21978116); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP22047)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21978116) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP22047).

*Corresponding author. E-mail: jinsonggong.bio@hotmail.com

Received: 2023-12-16; Accepted: 2024-03-18; Published online: 2024-04-28

关键词：还原型烟酰胺单核苷酸；启动子工程；发酵优化；全细胞催化；枯草芽孢杆菌

Efficient expression of NADH pyrophosphatase promotes the synthesis of NMNH by biotransformation

LI Xueyuan¹, GONG Jinsong^{1*}, SU Chang¹, LI Heng¹, XU Guoqiang², XU Zhenghong^{2,3}, SHI Jinsong¹

1 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan, China

Abstract: [Objective] As an important coenzyme in human body, coenzyme I (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) plays an important role in maintaining cell growth, differentiation, and energy metabolism and protecting cells. Reduced nicotinamide mononucleotide (NMNH), an effective NAD⁺ enhancer, can efficiently elevate the levels of NAD⁺ in tissues. NADH pyrophosphatase can transform reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) into NMNH to promote the regeneration of NAD⁺. The purpose of this study is to construct a NADH pyrophosphatase expression system in *Bacillus subtilis* and realize the synthesis of NMNH by biotransformation. **[Methods]** NADH pyrophosphatase was successfully expressed in *B. subtilis* WB600 by vector screening, and promoter engineering was employed to improve the enzyme activity. Furthermore, the industrial application potential of the recombinant enzyme was further investigated by medium optimization and amplified fermentation in a 5 L fermenter. On this basis, the whole cell catalytic system was used for biotransformation to synthesize NMNH. **[Results]** The initial activity of NADH pyrophosphatase and the yield of NMNH were 1.70 U/mL and 135 mg/L, respectively. After promoter engineering, the enzyme activity was improved by 41%. In addition, the enzyme activity was increased to 5.02 U/mL after optimization of the culture medium and amplified fermentation in a 5 L fermenter, which was 1.09 times higher than that in a shake flask. On this basis, the whole-cell catalytic system was used for biotransformation, and the yield of NMNH reached 1.20 g/L, which was 7.75 times higher than the initial yield. **[Conclusion]** We built an efficient expression system of NADH pyrophosphatase in *B. subtilis* and realized the efficient transformation from NADH to NMNH by whole-cell catalysis, providing a new idea for the biosynthesis of NMNH.

Keywords: reduced nicotinamide mononucleotide; promoter engineering; fermentation optimization; whole-cell catalysis; *Bacillus subtilis*

辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)参与三羧酸循环、糖酵解等人体内重要代

谢反应。然而，随着人年龄增长，体内 NAD⁺水平会降低，从而导致一些神经退行性疾病的发

生^[1]。NAD⁺稳态改变已成为一系列疾病状态的共同特征^[2]。还原型烟酰胺单核苷酸(reduced nicotinamide mononucleotide, NMNH)是一种有效的NAD⁺前体^[3],研究表明将NMNH以不同浓度添加到小鼠肝细胞中,不仅提升了细胞内NAD⁺的水平,还加快了NAD⁺上升的速度^[4]。

目前,主要采用化学方法合成NMNH。利用二氧化硫脲(thiourea dioxide, TDO)可以将烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)还原为NMNH,但是TDO具有毒性,对环境造成污染的同时容易产生难以分离的手性异构体。生物催化法可在温和的反应条件下,通过NADH焦磷酸酶将还原型辅酶I(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)转化为NMNH和单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)(图1)。焦磷酸酶存在于多种生物体内,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*) BCG、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv^[5-7]。NADH

焦磷酸酶具有保守序列GX₅EX₇RE₁VXEEXGU,属于Nudix水解酶超家族^[8]。目前,研究者已经在多种生物体内实现了NADH焦磷酸酶的异源表达。Frick和Bessman在1995年率先实现了NADH焦磷酸酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655中的异源克隆表达^[9];Xu等通过低温诱导及伴侣蛋白的表达,成功在大肠杆菌中提高了来源于秀丽隐杆线虫的焦磷酸酶表达水平^[10]。Abdelraheim等在昆虫细胞中重组表达了人源NUDT12和鼠源NUDT13^[11]。Liu等通过启动子、核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)筛选在大肠杆菌BL21(DE3)中成功实现了NADH焦磷酸酶的高表达^[8]。然而,大肠杆菌缺乏有效的翻译后修饰过程,而且存在内毒素,不利于产物作为食品或药品用于提升生物体内的NAD⁺水平。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种生物安全(generally regarded as safe, GRAS)菌株^[12],不具有密码子偏好性,便于进行多种蛋白的表达,而且易于培养,发酵技术成熟^[13]。

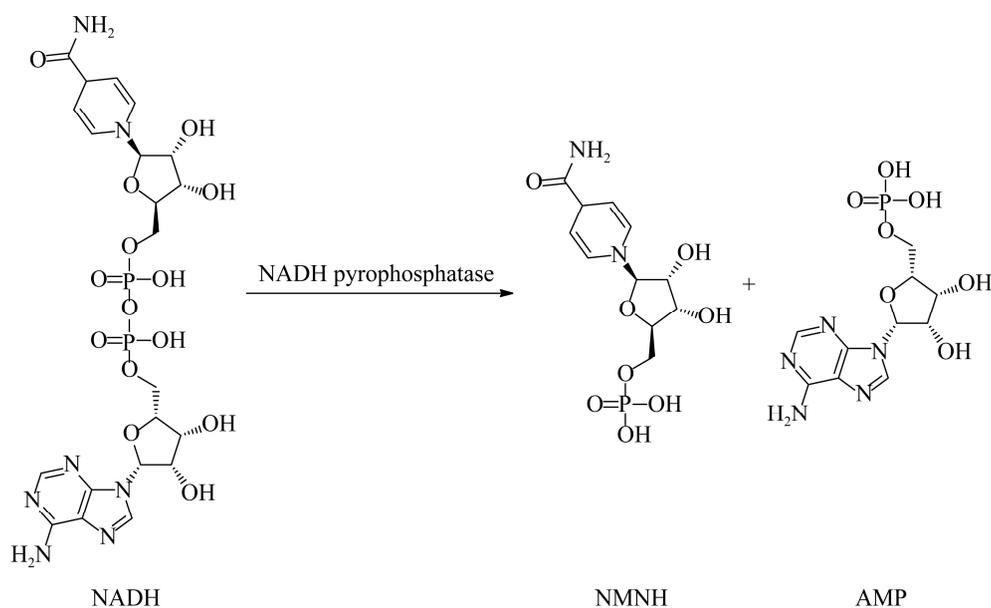


图1 NMNH的生物酶法合成

Figure 1 Enzymatic synthesis of NMNH.

本研究尝试在 *B. subtilis* WB600 中进行 NADH 焦磷酸酶基因的异源表达；为提升其表达量，通过筛选 *B. subtilis* 168 基因组中不同种类的内源性启动子对表达系统进行启动子适配性优化^[14]；进一步结合培养基优化及罐上放大培养发掘 NADH 焦磷酸酶发酵潜力，为其工业化生产奠定基础。最后，采用全细胞催化工艺进行 NMNH 的生物转化。本研究成功获得了 NADH 焦磷酸酶在枯草芽孢杆菌体系内的异源表达，为 NMNH 的酶法合成提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

宿主菌 *B. subtilis* WB600, 表达载体 pMA5、pAD123、pHT01 和 pWB980, NADH 焦磷酸酶基因 *EcNudc*, 实验室前期保存。

1.1.2 主要试剂及培养基

限制性内切酶 QuickCut™ *Nde* I、*Mlu* I、*Sal* I、*Xba* I 和 *Bam*H I, TaKaRa 公司；2×Phanta Max Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司；FuniCut™ *Dpn*I、MolPure Plasmid Mini Kit 质粒小量提取试剂盒、MolPure Gel Extraction Kit 琼脂糖凝胶回收试剂盒, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司；胰蛋白胨、酵母粉, ThermoFisher Scientific 公司；NaCl、琼脂粉、MgCl₂、KH₂PO₄、K₂HPO₄ 和吐温 80, 国药集团化学试剂有限公司；卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 主要仪器

恒温振荡金属浴 MSC-100、微量核酸蛋白浓度测定仪, ThermoFisher Scientific 公司；PCR 仪 C1000™ Thermal Cycler、核酸电泳仪、蛋白电泳仪, Bio-Rad 公司；超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司；高压蒸汽灭菌锅, 致微

(厦门)仪器有限公司；生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司；pH 计, METTLER TOLEDO 公司；5 L 发酵罐, 迪必尔生物工程(上海)有限公司；高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.2 *EcNudc* 的克隆与表达

以实验室保存的 *EcNudc* 基因片段为模板, 通过表 1 中引物对 NADH 焦磷酸酶基因进行扩增, 并采用双酶切方法使质粒线性化, pMA5 的酶切位点为 *Mlu* I、*Nde* I, pAD123 的酶切位点为 *Bam*H I、*Xba* I, pHT01 的酶切位点为 *Bam*H I、*Xba* I, pWB980 的酶切位点为 *Sal* I、*Xba* I。通过 Ligation Kit 使目的基因与载体片段连接, 分别获得重组质粒 pMA5-*EcNudc*、pAD123-*EcNudc*、pHT01-*EcNudc* 和 pWB980-*EcNudc*。

通过化学转化法将重组质粒 pMA5-*EcNudc*、pAD123-*EcNudc* 以及 pHT01-*EcNudc* 转入 *Escherichia coli* JM109 感受态中, 在氨苄青霉素(ampicillin, Amp)抗性平板上培养, 挑取平板上单菌落进行验证及鉴定, 将验证正确的质粒转入 *B. subtilis* WB600 感受态细胞。将重组质粒 pWB980-*EcNudc* 转入 *B. subtilis* WB600 感受态细胞中, 在卡那霉素(kanamycin, Kan)抗性平板上培养, 挑取平板上单菌落进行验证及鉴定。

1.3 酶活性分析及产物检测条件

发酵结束后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 使用 Tris-HCl 清洗 2 遍, 得到细胞液。全细胞催化体系(50 μL): Tris-HCl (0.1 mol/L, pH 8.0) 27 μL, MgCl₂ (0.05 mol/L) 5 μL, NADH (0.5 mol/L) 2.5 μL, 细胞液 15.5 μL。在 37 °C 下反应 15 min, 反应结束后立即加入 250 μL EDTA (0.004 mol/L, pH 8.0) 终止反应。在酶学性质表征中, 粗酶液反应体系的组成如全细胞催化体系, 不同之处在于, 将细胞液替换为粗酶液。通过高效液相色谱(HPLC)测定产物 NMNH 的生成, 使用 C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行检测, 流动相主

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
pMA5- <i>EcNudc</i> -F	taaaaaggagcgaatttacatgatGGACCGTATCATTGAGAAAC
pMA5- <i>EcNudc</i> -R	gaatttcgacctagaacgcgTAAatgatgatgatgatTTCATATTCAGCGCG
pAD123- <i>EcNudc</i> -F	ttcgagctcggtaccggggaatccATGGACCGTATCATTGAGAA
pAD123- <i>EcNudc</i> -R	tgtatatctcctcttaaatctagaTAAatgatgatgatgat
pHT01- <i>EcNudc</i> -F	tccaattaaggaggaagatccATGGACCGTATCATTGAGAA
pHT01- <i>EcNudc</i> -R	tgccccgggagctcgaactctagaTAAatgatgatgatgat
pWB980- <i>EcNudc</i> -F	GCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAATGGACCGTATCATTGA
pWB980- <i>EcNudc</i> -R	CTAGCTTGATGCCTGCAGGTCGACTTAAatgatgatgatgat
VpMA5-F	aaaggagcgaatttacatgatATGG
VpMA5-R	actcaaaaaatctccacctta
P _{srfA} -F	ttaaaggtggagatttttggagtAATGTTTGTGAAATGATTG
P _{srfA} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttATTGTCATACCTCCCCTAATC
P ₄₃ -F	aaaggtggagatttttggagtCGGTTGATTTAATAACTGACAA
P ₄₃ -R	CATcatatgtaaatcgcctcttGTGTACATTCCTCTCTTACC
P _{mpr} -F	aaaggtggagatttttggagtTTAGCGGATTACACTGTTGAAGGAT
P _{mpr} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttTTTGTCTATCCTCCTTTTGTGTCAC
P _{bpr} -F	aaaaggtggagatttttggagtTCGATTTTGTCTCTTTTGTCTCTTCTT
P _{bpr} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttTTTCATCCCCCTTTTCAACATGCTT
P _{aprE} -F	AaggtggagatttttggagtCGATAATATCCATTGTTCTCACGGAAGC
P _{aprE} -R	ATcatatgtaaatcgcctcttTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAATTCA
P _{nprB} -F	AaggtggagatttttggagtCATATGGAGCAGGGGTTATTATTTATGTC
P _{nprB} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttAACACCACATCCTTCTTATTTTGG
P _{yoIA} -F	AaggtggagatttttggagtGGCTTGCTCGTTGTCAAATCTGCGTA
P _{yoIA} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttTTCTAAATCCTCCTTGGTACAAGTTTACA
P _{epr} -F	AaggtggagatttttggagtAGGATAATCCGTCACGCAAAGCGCTGAGA
P _{epr} -R	ATcatatgtaaatcgcctcttGATTCATCTCCTTTTCTATGATGTTTGA
P _{trnQ} -F	AaggtggagatttttggagtGAGAATAAATGTCATACGCTCTTTCCCCGC
P _{trnQ} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttATATAGACTGCGTTATGAGAACGTCAGCAC
P _{gsiB} -F	AaggtggagatttttggagtGAAAAAATTTTCCAGATAGTCCCGGTT
P _{gsiB} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttTTTGAATTCCTCCTTAAATTGGTGTGGTT
P _{sigX} -F	AaggtggagatttttggagtCAAAGACTCCGGGTCTGGCATAACCGGAAGA
P _{sigX} -R	CATcatatgtaaatcgcctcttTTGAAACCCCTCCGTTCACTTTTTGTGCGT
P _{wapA} -F	AaggtggagatttttggagtATTCAATCATTGATTTCTCGACCCCGCT
P _{wapA} -R	tagtatttttgagaagatcTTCTCTCTCCTTTTGTAAATAAAGTAAT

要包括两部分。流动相 A 是甲醇、水、冰醋酸以及四丁基氢氧化铵(3:96:0.6:0.4), 流动相 B 是 100%甲醇。洗脱程序: 0 min, 100% A; 5 min, 100% A; 25 min, 40% A; 30 min, 20% A; 40 min, 100% A。通过产物 NMNH 的生成量计算酶活, NADH 焦磷酸酶酶活定义: 在上述反应条件下, 1 个酶活力单位(U)定义为每分钟(min)产生

1 μmol NMNH 所需的酶蛋白量。

1.4 酶蛋白表达情况检测

将鉴定正确的重组质粒转入 *B. subtilis* WB600, 在 37 °C 培养箱培养 12 h, 挑取单菌落, 接入含有 1%卡那霉素的 LB 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养 12 h, 以 1%的接种量转接至含有 1%卡那霉素的超级肉汤培养基(terrific

broth, TB)中, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养。

发酵结束后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 分别收集菌体与发酵上清液。收集的菌体, 使用 Tris-HCl 清洗 2 遍, 将菌体重悬后, 加入 14 mg/mL 溶菌酶并进行超声破碎。制备蛋白胶, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 取 30 μ L 酶液与 10 μ L 4 \times Protein Loading Buffer 混合, 100 °C 金属浴 10 min;

将制备好的蛋白胶放置于电泳槽中, 加入 Running buffer 浸润蛋白胶, 加入蛋白 Marker 和样品, 设定电泳程序: 首先 80 V 运行 30 min, 然后 120 V 运行 60 min。电泳结束后, 拆卸胶板, 用考马斯亮蓝溶液染色 2 h, 再用洗脱液脱色, 直至背景且蛋白条带清晰。

1.5 启动子适配性优化

以 *B. subtilis* 168 基因组为模板, 用表 1 中的引物对其内源性组成型及自诱导型启动子基因进行克隆, 通过反向 PCR 使载体线性化, 同源重组连接载体及片段。通过化学转化法将重组质粒转入大肠杆菌 JM 109 感受态中, 在氨苄青霉素抗性平板上培养, 挑取平板上单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 并提取测序正确的质粒进行双酶切验证重组质粒是否正确。将验证正确的质粒通

过化学转化法转入枯草芽孢杆菌 WB600, 得到 12 株重组菌(表 2)。

1.6 产酶曲线的测定

将 BSE00 和 BSE09 以 TB 培养基在 37 °C、220 r/min 条件下进行培养 36 h, 每隔 3 h 取样测定酶活及 OD_{600} 值, 绘制生长-酶活曲线。

1.7 酶学性质

发酵结束后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 使用 Tris-HCl 清洗 2 遍, 将菌体重悬后, 加入 14 mg/mL 溶菌酶并进行超声破碎。将破碎液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液用于酶学性质表征实验。

1.7.1 最适反应温度

为了测定酶活性最佳温度, 按照 1.3 中酶活检测方法, 在 pH 8.0 的条件下, 测定在 25、30、33、40、42、45、50 及 55 °C 条件下的酶活性, 并将试验组最高 NADH 焦磷酸酶活性设定为 100%。

1.7.2 最适反应 pH

为了测定酶活性最佳 pH, 参照 1.3 中酶活检测方法, 在 37 °C 的条件下, 测定在 pH 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 及 12.0 条件下的酶活性, 并将试验组最高 NADH 焦磷酸酶活性设定为 100%。

表 2 12 株重组菌及其描述

Table 2 12 recombinant strains and their description

Strains	Description
BSE00 (control)	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the pMA5 constitutive promoter P_{Hpall}
BSE01	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{43}
BSE02	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{mpr}
BSE03	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{bpr}
BSE04	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with an auto inducible promoter P_{aprE}
BSE05	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{nprB}
BSE06	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{yolA}
BSE07	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{epr}
BSE08	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{irmQ}
BSE09	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with an auto inducible promoter P_{srjA}
BSE10	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{gsiB}
BSE11	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{sigX}
BSE12	<i>EcNudc</i> was expressed in WB600 with the constitutive promoter P_{wapA}

1.7.3 金属离子对 NADH 焦磷酸酶活性的影响

研究不同金属离子(Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 K^+)对 NADH 焦磷酸酶活性的影响, 这些金属离子分别来自 CaCl_2 、 CuCl_2 、 FeCl_2 、 FeCl_3 、 MgCl_2 、 MnCl_2 、 ZnCl_2 和 KCl 配制的溶液。在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 pH 8.0 条件下分别将 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ (0.05 mol/L)、 $5\text{ }\mu\text{L}$ (0.05 mol/L) 的金属离子添加到反应体系中, 参照 1.3 酶活检测方法测定酶活。将试验组最高 NADH 焦磷酸酶活性设定为 100%。

1.8 发酵优化及扩大培养

1.8.1 培养基优化

基本培养条件: 接种量体积分数为 1%, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 220 r/min 培养 36 h, 以 TB 为基础培养基, 分别对基础培养基中的碳源种类、浓度, 氮源种类、浓度, 以及复合氮源比例进行优化。

保持氮源及磷酸盐的条件不变, 更换不同碳源(甘油、乳糖、木糖、蔗糖、麦芽糖和葡萄糖), 在确定最佳碳源种类后, 对碳源浓度进行优化(4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44 和 48 g/L)。在确定最佳碳源浓度后, 保持碳源不变, 更换氮源种类(酵母粉、胰蛋白胨、豆饼粉、大豆蛋白胨、棉籽饼粉、硫酸铵和氯化铵), 在确定氮源种类后, 对复合氮源比例进行优化(1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1 和 4:1), 得到最佳复合氮源比例后, 对氮源浓度进行优化(18、24、30、36、42、48、54、60、66 和 72 g/L)。以发酵结束时 NADH 焦磷酸酶活性及 OD_{600} 为指标, 探究培养基各因素对重组菌生长及产酶的影响。

1.8.2 罐上发酵

将 BSE09 重组菌在卡那霉素抗性平板上三区划线, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养过夜, 挑取转化子到 10 mL LB 培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 220 r/min 培养 12 h。以体积分数 1% 接种量转接至种子培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 220 r/min 培养 12 h。然后将种子培养液(接种量体积分数为 5%)转接至 5 L 发酵罐中, 通过调节

转速和通气量来控制溶氧水平, 流加体积分数为 75% 冰醋酸和 2 mol/L NaOH 溶液控制 pH (7.0 ± 0.1)。发酵过程中间隔 3 h 取样, 当发酵液溶氧水平开始上升时流加补料培养基(14 mL/h)。

1.9 全细胞催化工艺优化

对全细胞催化时所用的表面活性剂浓度、处理细胞时间进行优化。在 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 、 pH 10.0 的反应条件下, 使用不同浓度的吐温 80 对细胞处理不同时间, 测定 NMNH 产量。

2 结果与讨论

2.1 重组菌的构建

将 *EcNudc* 基因分别克隆至大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pMA5、pAD123、pHT01, 以及枯草芽孢杆菌质粒 pWB980 中, 分别获得重组质粒 pMA5-*EcNudc*、pAD123-*EcNudc*、pHT01-*EcNudc* 和 pWB980-*EcNudc*。

挑取测序正确的单菌落接入摇瓶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 220 r/min 培养 12 h, 提取质粒转化入枯草芽孢杆菌 WB600, 使用 TB 培养基在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 220 r/min 条件下进行发酵, 测定其酶活及 NMNH 产量。如图 2 所示, 当以穿梭质粒 pMA5 作为表达载体时, NADH 焦磷酸酶的酶活最高, 为 1.70 U/mL ,

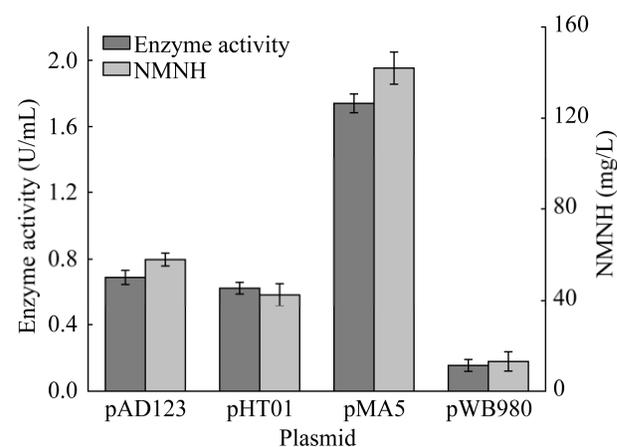


图 2 不同质粒初始表达酶活及产量

Figure 2 Initial expression enzyme activity and yield of different plasmids.

NMNH的产量为135 mg/L。这可能是由于pMA5质粒自身所带的 P_{HpaII} 启动子转录活性较强,拷贝数较高,从而使酶活显著高于其他质粒。因此,后续选择pMA5作为表达载体。

测定重组菌BSE00 (WB600/pMA5-*EcNudc*)的生长-酶活曲线,结果如图3A所示。菌体的 OD_{600} 值在18 h时达到最高,此时胞内酶活也达到最高值1.70 U/mL。

按照1.4方法,接种并发酵重组菌株*B. subtilis* WB600/pMA5-*EcNudc*,并对其分泌蛋白、胞内蛋白进行SDS-PAGE分析,以*B. subtilis* WB600/pMA5为阴性对照,结果如图3B所示。与含有空载pMA5质粒的对照菌相比,泳道3处出现一个明显的蛋白条带,分子量约为30 kDa,与*EcNudc*蛋白理论分子量符合,而泳道1、2的相同位置并未出现条带,这表明,NADH焦磷酸酶基因在*B. subtilis* WB600中成功实现了胞内表达。

2.2 启动子适配性改造

蛋白质的有效表达与其转录效率密切相关,

启动子是促进高水平基因表达和重组蛋白生产的重要调控元件^[15-16]。为了增强NADH焦磷酸酶表达量,同时避免因诱导剂添加而导致的成本增加、操作复杂以及细胞毒性等问题,本研究通过文献调研^[14,19],从枯草芽孢杆菌基因组中选择进行适配性改造的启动子均为无须添加诱导剂的组成型启动子或自诱导型启动子(表2)。对这些启动子进行筛选,成功构建了12株重组菌,如图4所示。测定对照菌株和各突变株的酶活,所得结果如图5所示,初始菌株BSE00 (P_{HpaII})的酶活为1.70 U/mL。其中,除了BSE06 (P_{yolA})、BSE08 (P_{trnQ})、BSE10 (P_{gsiB})和BSE11 (P_{sigX})外,其余启动子转录的NADH焦磷酸酶活性均较对照菌株BSE00 (P_{HpaII})表现为提升。BSE01 (P_{43})的效果较好,其是枯草芽孢杆菌内源性组成型启动子之一,这株重组菌的NADH焦磷酸酶活性仅次于BSE09 (P_{srfA})。重组菌BSE09酶活最高,达到了2.40 U/mL,较对照菌株BSE00 (P_{HpaII})提升了41%。

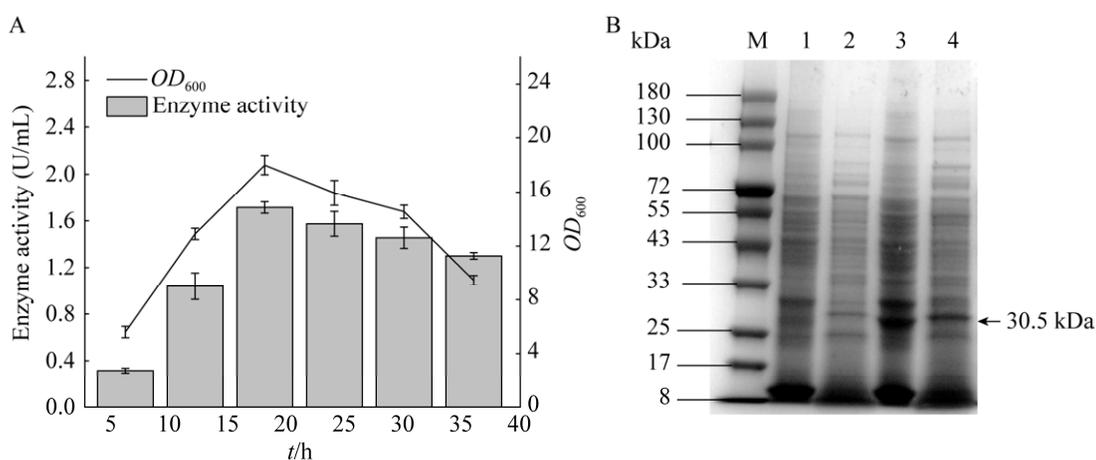


图3 BSE00的生长-酶活曲线与SDS-PAGE

Figure 3 Analysis of growth-enzyme activity curve and SDS-PAGE of BSE00. A: The growth enzyme activity curve of BSE00. B: SDS-PAGE analysis. Lane M: Protein Molecular Marker; Lane 1: The intracellular control band of WB600; Lane 2: The extracellular control band of WB600; Lane 3: The intracellular band of BSE00; Lane 4: The extracellular band of BSE00.

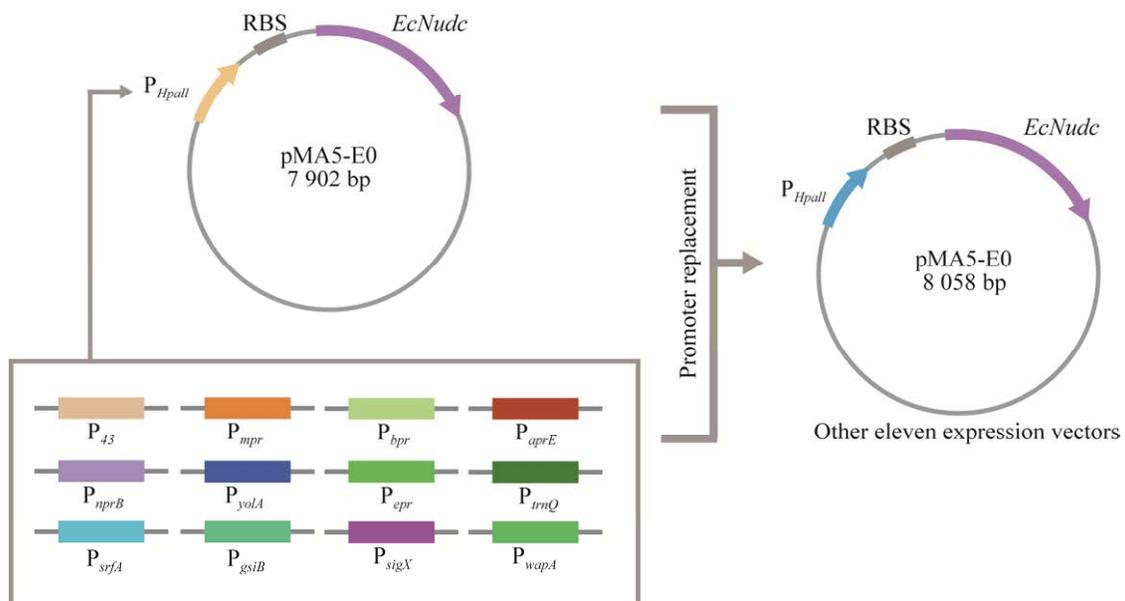


图 4 不同启动子改造的工程菌示意图

Figure 4 Schematic diagram of different promoter-engineered strains.

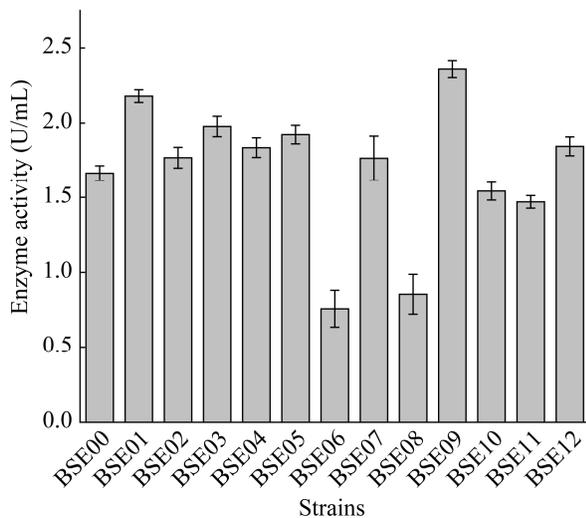


图 5 不同启动子改造的工程菌株酶活

Figure 5 Enzyme activity of different promoter-engineered strains.

2.3 重组菌的生长-酶活曲线测定

测定 BSE09 与对照菌株 BSE00 的生长-酶活曲线, 结果如图 6 所示。通过比较两株重组菌的生长-酶活曲线可知, BSE00 在生长前期便开始

快速表达, 到达最高点后出现一个与增长趋势相近的下降趋势。BSE09 在菌体生长前期酶的表达量及增长趋势较 BSE00 相比更为缓慢, 在菌体生长到指数期后期时, 开始大量表达^[17], 并且在达到酶活峰值后, 也呈现一个较为缓慢的下降趋势。

由此可见, P_{srfA} 调控的 NADH 焦磷酸酶重组菌生长-酶活曲线相比于原组成型启动子 P_{HpaI} 有较大不同。研究表明 P_{srfA} 是一种依赖菌体生长释放出信号分子而启动下游基因转录的启动子, 其与枯草芽孢杆菌中的 ComQXPA 系统^[18]有关。该系统由 comX、comQ、comP 和 comA 四部分组成。随着细菌增长, 群体密度增加, 释放到胞外的 comX 不断积累, 与细胞膜上的 comP 结合, 使之发生磷酸化, 激活 comA 蛋白, 从而使 comA 蛋白结合在启动子上游, 启动转录基因的表达。推测由于菌体前期处于信号分子积累状态, 酶的表达量不高, 因此菌体代谢压力较小^[19], 这使菌体在后期也维持一个较好的生长及产酶状态。

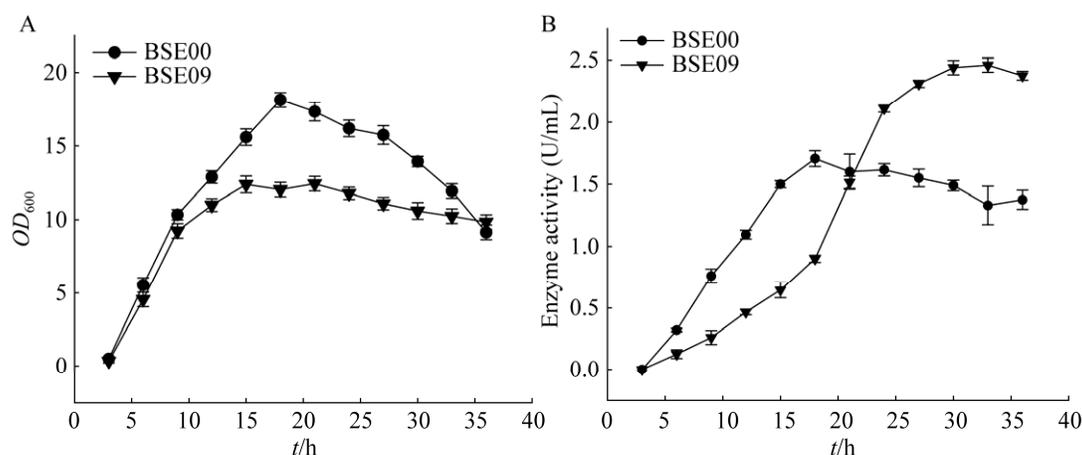


图 6 BSE00、BSE09 的生长-酶活曲线比较

Figure 6 The growth-enzyme activity curves of BSE00 and BSE09. A: The growth curves of BSE00 and BSE09. B: The enzyme activity curves of BSE00 and BSE09.

2.4 重组菌培养基优化

碳、氮源是微生物生长所必需的营养物质，为微生物代谢提供物质和能量基础。同时氮源是构成菌体内核酸、蛋白质的重要原料^[20]。本研究构建的重组菌 BSE09 在生长前期产酶较为缓慢，在指数期中后期表达增强。由于前期细胞生长会消耗 TB 中的甘油及复合氮源，在发酵后期菌体的生长性能下降。因此对培养基进行优化，使菌体在生长后期也能保持良好的生长状态，结果如图 7 所示。如图 7A 所示，在所选取的碳源中，以甘油为碳源时菌体酶活最高，36 h 的最高酶活达到 2.50 U/mL；以木糖为碳源时，酶活较低。研究发现，在微生物的长期进化过程中，对自然界中木糖的利用使不同微生物体内产生了不同的木糖代谢途径^[21]。如在枯草芽孢杆菌中，木糖可以直接在木糖异构酶(xylose isomerase, XI)的催化作用下形成木酮糖而不需要辅酶参与，并经过木酮糖激酶的催化作用形成木酮糖-5-磷酸，进入戊糖磷酸途径。由此推测，木糖可能是一种广泛参与枯草芽孢杆菌其他代谢途径的碳源，因此 NADH 焦磷酸酶对其利用率较低，不利于其表达。在确定甘油为最佳碳源

后，探究了不同浓度甘油对菌体产酶和生长的影响。当甘油浓度达到 16 g/L 时，酶活达到最高值 2.80 U/mL，结果如图 7B 所示。

以优化后的碳源为基础，研究不同氮源种类对菌体生长及产酶的影响。如图 7C 所示，在选取的氮源种类中，以蛋白胨和棉籽饼粉为单一氮源时酶活较高，36 h 的最高酶活分别达到 2.80 U/mL 和 3.20 U/mL；以硫酸铵和氯化铵作为氮源，不利于菌体的生长和产酶。因此，后续选择胰蛋白胨与棉籽饼粉作为复合氮源进行比例优化实验。由图 7D、7E 可知，当胰蛋白胨与棉籽饼粉的比例为 2:1，浓度为 54 g/L 时，菌株的酶活最高，达到 3.50 U/mL，相比培养基优化之前，酶活提升了 46%。

2.5 重组菌罐上发酵工艺探究

在 2.4 中得到的最佳发酵条件下，将重组菌 BSE09 于 5 L 发酵罐中进行罐上发酵工艺研究，从而进一步挖掘重组菌的产酶潜力。首先将二级种子液在 37 °C 下进行培养，12 h 后以 5% 的接种量接种至 5 L 发酵罐中，罐体温度维持在 37 °C，pH 7.0±0.1，转速维持在 400–600 r/min，使发酵罐溶氧维持在 30% 左右。如图 8 所示，

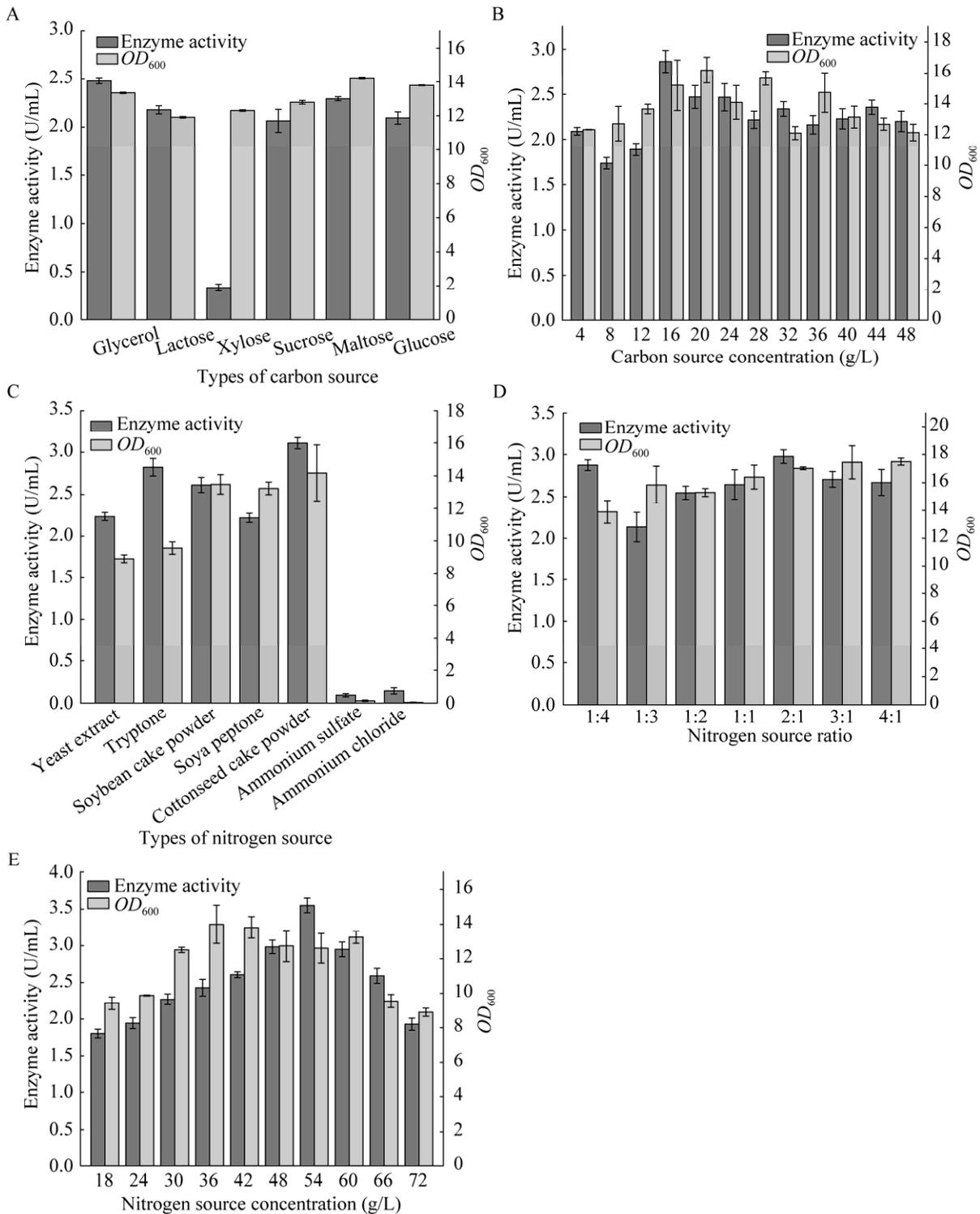


图 7 培养基优化

Figure 7 Medium optimization. A: The optimization of carbon source type. B: The optimization of carbon source concentration. C: The optimization of nitrogen source type. D: The optimization of composite nitrogen source proportion. E: The optimization of composite nitrogen source concentration.

在发酵的前 12 h, 酶活与 OD_{600} 均呈上升趋势。在 12–15 h 时酶活略有下降, 但经恒速补料后, 酶活再次上升, 在 24 h 后呈下降趋势。在 24 h 时, 酶活达到最高值 5.02 U/mL, 相比摇瓶水平提升了 43.43%。

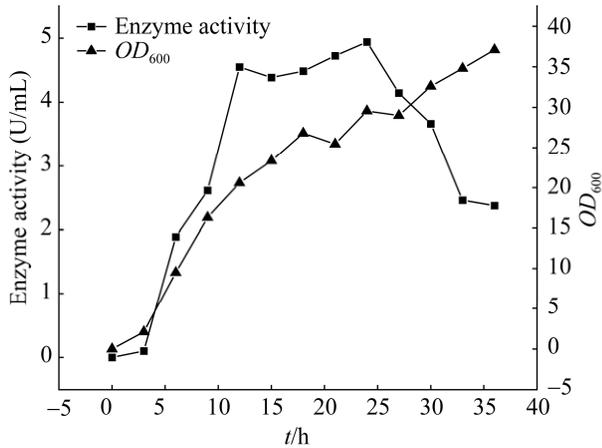


图 8 补料发酵过程曲线

Figure 8 The batch fermentation curves under fed batch.

2.6 酶学性质表征

为了探究温度、pH 及金属离子对 NADH 焦磷酸酶活性的影响, 使用粗酶液, 按照方法 1.2.6, 测定不同温度、pH、金属离子下 NADH 焦磷酸酶的相对酶活力。

在 25–55 °C 范围内测定重组 NADH 焦磷酸酶的活性, 如图 9A 所示。随着温度升高, 分子运动更加剧烈, 底物与酶更易结合反应, 因此酶活力逐渐升高, 并在 45 °C 时达到最高酶活力。在过高温下, 酶结构及活力往往会遭到破坏, 反应生成的产物也更容易降解。在温度超过 45 °C 时, 酶活力开始逐渐下降。因此, 该酶的最适反应温度为 45 °C。

在不同 pH 的缓冲液 (pH 6.0–12.0) 中测定重组 NADH 焦磷酸酶活性, 如图 9B 所示。NADH 焦磷酸酶在 pH 10.0 时表现出最高酶活力, 在碱性条件下能够更好地保持酶活。

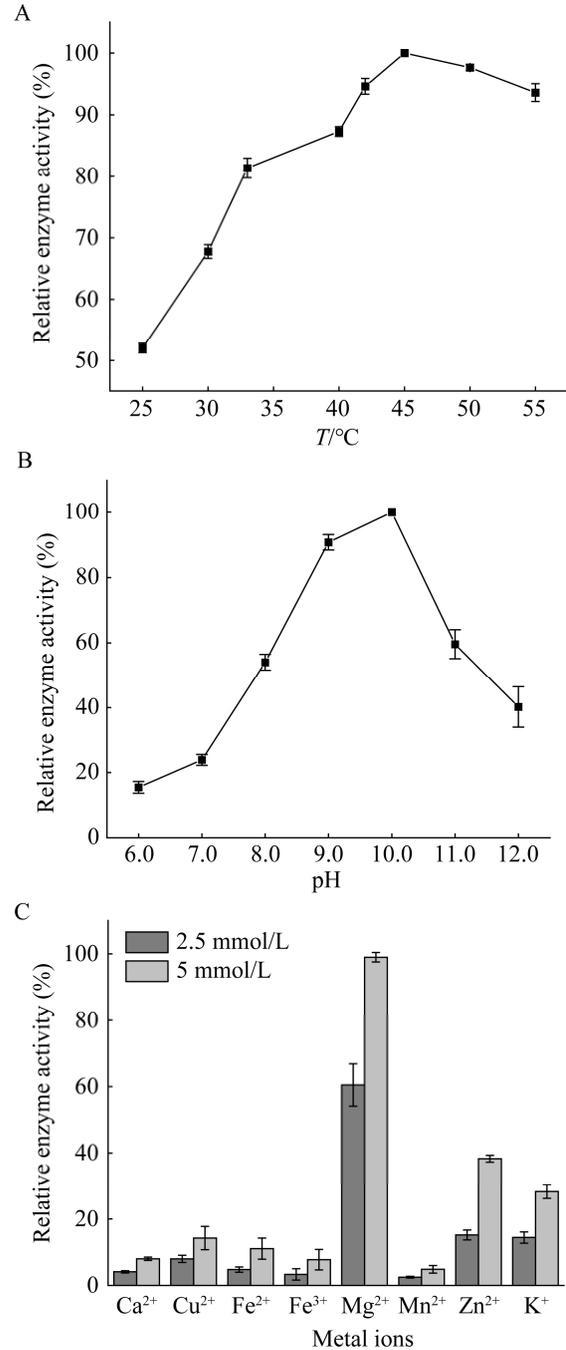


图 9 温度、pH 和金属离子对 NADH 焦磷酸酶活性的影响

Figure 9 The effects of temperature, pH and metal ions on the relative activity of the NADH pyrophosphatase. A: The effects of temperature on the relative activity of the NADH pyrophosphatase. B: The effects of pH on the relative activity of the NADH pyrophosphatase. C: The effects of metal ions on the relative activity of the NADH pyrophosphatase.

为了探究不同金属离子对 NADH 焦磷酸酶活性的影响, 向反应体系中分别加入 2.5 μL (0.05 mol/L)、5 μL (0.05 mol/L) 终浓度的不同金属离子, 如图 9C 所示。除 Mg^{2+} 外, 加入其余金属离子均抑制了 NADH 焦磷酸酶的活性。研究表明, NADH 焦磷酸酶属于 Nudix 水解酶超家族, 是一种需要 Mg^{2+} 参与且具有高度保守 Nudix 基序(GX₅EX₇REUXEEXGU)的水解酶。其中, U 是大体积疏水残基, X 是任意残基。Nudix 盒形成一个 loop 环- α 螺旋-loop 环结构基序, 其是 Mg^{2+} 的结合位点, 从而发挥催化作用^[22]。对于 NADH 焦磷酸酶催化体系中金属离子的优化实验也验证了这一点: 除了 Mg^{2+} , 其余金属离子的加入使其几乎失去了酶活, 这证明 Mg^{2+} 添加对于 NADH 焦磷酸酶催化活性的发挥具有至关重要的作用, 而其余金属离子的加入并不能与 NADH 焦磷酸酶蛋白形成具有良好活性的空间构型。

2.7 全细胞催化体系优化

由于 NADH 焦磷酸酶在 *B. subtilis* WB600 中是胞内表达, 目前普遍采用超声破碎获取胞内

酶。超声破碎过程会放出大量的热量, 破坏酶的结构从而影响活性。考虑到底物和产物均为小分子, 底物能够充分地进入胞内, 与胞内酶发生反应, 并且产物可分泌到胞外, 本研究采用全细胞催化方法进行 NMNH 的生物转化合成, 简化了破碎步骤, 降低能耗, 同时提高了生产效率。采用 HPLC 测定总产物的生成, NMNH 产量达到 280 mg/L。此产量仍较低, 推测可能是由于细胞壁和细胞膜对底物和产物的透性屏障作用阻碍了 NMNH 的出胞。

为了增强细胞膜通透性, 通过加入表面活性剂减少胞内外传质阻力。吐温 80 是一种非离子型表面活性剂^[23-24], 在生物实验中常用作乳化蛋白, 其具有改变细胞膜通透性的作用, 从而促进底物、产物进出细胞^[25]。本研究对吐温 80 的浓度及处理细胞时间进行优化, 避免其浓度过高而对细胞产生较大损伤。

按照 1.3 中的酶活检测方法, 保持反应体系不变, 对经 Tris-HCl 清洗后的细胞液加入不同浓度的吐温 80 进行预处理, 由图 10A 可知, 当吐温浓度从 0.05% 增加到 0.20% 时, NMNH 的

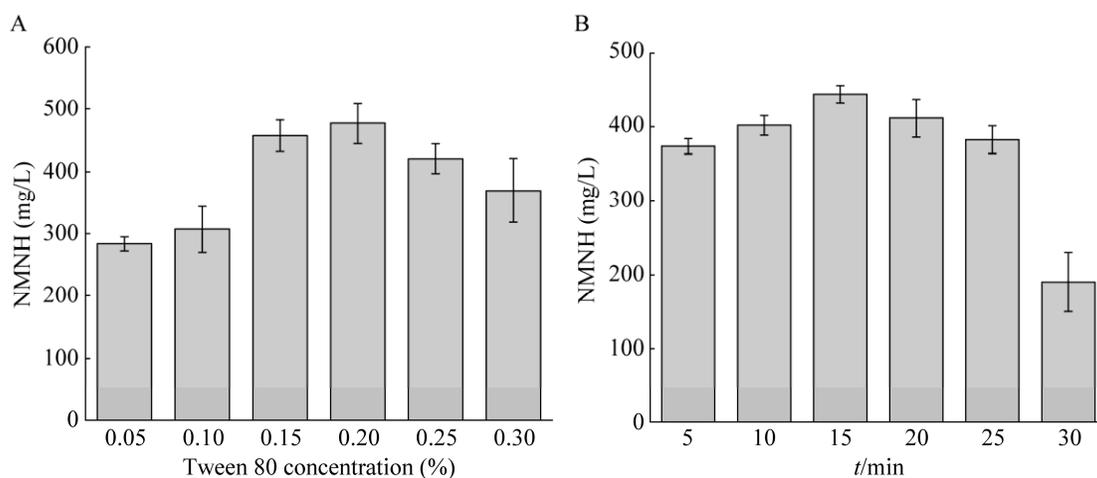


图 10 吐温 80 浓度及处理时间优化

Figure 10 Optimization of Tween 80 concentration and reaction time. A: The optimization of Tween 80 concentration. B: The optimization of Tween 80 treatment time for cells.

产量不断增加,在吐温浓度为 0.20%时达到最高,为 477 mg/mL。同样地,保持其他条件不变,对吐温 80 预处理细胞的时间进行优化。如图 10B 所示,当加入吐温 80 对细胞预处理 15 min 时,NMNH 产量达到最高为 444.80 mg/L。结合优化后条件,在 0.20%浓度的吐温 80 处理细胞 15 min 的条件下,NMNH 产量达到 529 mg/L。在此反应条件下,结合 2.6 中得到的 NADH 焦磷酸酶最适温度、pH、金属离子,探究全细胞催化的转化率,提升反应时间,发现在反应 50 min 后,经 HPLC 检测,底物量不再减少,此时 NMNH 的产量达到 1.20 g/L,转化率为 87%。

3 结论

本研究利用枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) WB600 作为宿主菌构建了 NADH 焦磷酸酶(EcNudc)异源表达体系,初始酶活为 1.70 U/mL。重组蛋白高效表达依赖启动子的转录,通过启动子工程策略探索了不同种类启动子与 NADH 焦磷酸酶的适配性,最终确定了菌体密度依赖型启动子(P_{srfA})启动目的基因的转录,酶活达到 2.40 U/mL,提升了 41%。通过对培养基优化及罐上发酵,酶活达到 5.02 U/mL,提升了 1.09 倍。采用全细胞催化的方法制备 NMNH,产量为 280 mg/L。为了增强细胞膜通透性,通过优化表面活性剂浓度和处理细胞的时间,最终 NMNH 的产量达到 1.20 g/L,相比初始表达产量提升了 7.88 倍。

本研究实现了 NADH 焦磷酸酶在 GRAS 安全菌株枯草芽孢杆菌中的表达,为 NMNH 的工业生产奠定了基础。后续将继续进行 NADH 焦磷酸酶分子水平的改造及转化体系优化,以推进其产业化应用。

参考文献

- [1] HIKOSAKA K, YAKU K, OKABE K, NAKAGAWA T. Implications of NAD metabolism in pathophysiology and therapeutics for neurodegenerative diseases[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2021, 24(5): 371-383.
- [2] SULTANI G, SAMSUDEEN AF, OSBORNE B, TURNER N. NAD⁺: a key metabolic regulator with great therapeutic potential[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2017, 29(10): 10.1111/jne.12508.
- [3] ZAPATA-PÉREZ R, TAMMARO A, SCHOMAKERS BV, SCANTLEBERY AML, DENIS S, ELFRINK HL, GIROUD-GERBETANT J, CANTÓ C, LÓPEZ-LEONARDO C, McINTYRE RL, van WEEGHEL M, SÁNCHEZ-FERRER Á, HOUTKOOPER RH. Reduced nicotinamide mononucleotide is a new and potent NAD⁺ precursor in mammalian cells and mice[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2021, 35(4): e21456.
- [4] LIU Y, LUO CT, LI T, ZHANG WH, ZONG ZY, LIU XH, DENG HT. Reduced nicotinamide mononucleotide (NMNH) potently enhances NAD⁺ and suppresses glycolysis, the TCA cycle, and cell growth[J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(5): 2596-2606.
- [5] YOSHIMURA K, SHIGEOKA S. Versatile physiological functions of the Nudix hydrolase family in *Arabidopsis*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(3): 354-366.
- [6] DOBRZANSKA M, SZURMAK B, WYSLOUCH-CIESZYNSKA A, KRASZEWSKA E. Cloning and characterization of the first member of the Nudix family from *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(52): 50482-50486.
- [7] WANG XD, GU J, WANG T, BI LJ, ZHANG ZP, CUI ZQ, WEI HP, DENG JY, ZHANG XN. Comparative analysis of mycobacterial NADH pyrophosphatase isoforms reveals a novel mechanism for isoniazid and ethionamide inactivation[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 82(6): 1375-1391.
- [8] LIU Y, GONG JS, MARSHALL G, SU C, HALL M, LI H, XU GQ, SHI JS, XU ZH. Protein engineering of NADH pyrophosphatase for efficient biocatalytic production of reduced nicotinamide mononucleotide[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1159965.

- [9] FRICK DN, BESSMAN MJ. Cloning, purification, and properties of a novel NADH pyrophosphatase. Evidence for a nucleotide pyrophosphatase catalytic domain in MutT-like enzymes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(4): 1529-1534.
- [10] XU W, DUNN CA, BESSMAN MJ. Cloning and characterization of the NADH pyrophosphatases from *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, members of a Nudix hydrolase subfamily[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 273(2): 753-758.
- [11] ABDELRAHEIM SR, SPILLER DG, McLENNAN AG. Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix family: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein[J]. *The Biochemical Journal*, 2003, 374(Pt 2): 329-335.
- [12] SCHUMANN W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2007, 62: 137-189.
- [13] LIU YF, LI JH, DU GC, CHEN J, LIU L. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: recent advances and future directions[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(1): 20-30.
- [14] YE J, LI YJ, BAI YQ, ZHANG T, JIANG W, SHI T, WU ZJ, ZHANG YH PJ. A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 56.
- [15] CUI WJ, HAN LC, SUO FY, LIU ZM, ZHOU L, ZHOU ZM. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(10): 145.
- [16] DONG HN, ZHANG DW. Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 63.
- [17] XU KD, TONG Y, LI Y, TAO J, RAO SQ, LI JH, ZHOU JW, LIU S. Efficient, flexible autoinduction expression systems with broad initiation in *Bacillus subtilis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(11): 3084-3093.
- [18] ZHOU JJ, WU GJ, ZHENG J, ABDALMEGEED D, WANG MX, SUN SW, SEDJOAH RC AA, SHAO YT, SUN S, XIN ZH. Research on the regulation of plipastatin production by the quorum-sensing ComQXPA system of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(28): 10683-10692.
- [19] GUAN CR, CUI WJ, CHENG JT, ZHOU L, LIU ZM, ZHOU ZM. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 66.
- [20] LI X, ZENG WC, ZHU DY, FENG JL, TIAN CC, LIAO XP, SHI B. Investigation of collagen hydrolysate used as carbon and nitrogen source in the fermentation of *Bacillus pumilus*[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 55: 11-16.
- [21] KUHAD RC, GUPTA R, KHASA YP, SINGH A, ZHANG YH P. Bioethanol production from pentose sugars: current status and future prospects[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, 15(9): 4950-4962.
- [22] MILDVAN AS, XIA Z, AZURMENDI HF, SARASWAT V, LEGLER PM, MASSIAH MA, GABELLI SB, BIANCHET MA, KANG LW, AMZEL LM. Structures and mechanisms of Nudix hydrolases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 433(1): 129-143.
- [23] LI QY, LEI YG, HU GY, LEI YZ, DAN DM. Effects of Tween 80 on the liquid fermentation of *Lentinus edodes*[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(4): 1103-1109.
- [24] ROCCHIO J, NEILSEN J, EVERETT K, BOTHUN GD. A solvent-free lecithin-Tween 80 system for oil dispersion[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, 533: 218-223.
- [25] ZHAO WW, WANG YL. Coacervation with surfactants: from single-chain surfactants to gemini surfactants[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 239: 199-212.