

酿酒酵母烟酰胺核苷激酶的异源表达及其酶学性质分析

何建菊¹, 刘欣欣¹, 史红玲¹, 冉璐妮¹, 王 贤², 张英君¹, 唐存多^{1,2,3,*}

(1.南阳师范学院生命科学与农业工程学院, 河南 南阳 473061; 2.赊店老酒股份有限公司博士后创新实践基地, 河南 南阳 473300; 3.河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 从酿酒酵母中克隆烟酰胺核苷激酶 (nicotinamide riboside kinase, NRK) ScNRK1的编码基因, 借助pET28a质粒在大肠杆菌中实现了可溶性表达。结果表明, 发酵液中酶活力为14.75 IU/mL, 纯化后的比活力为2 252.59 IU/mg。此外, ScNRK1的动力学参数也明显优于其他已报道的NRK, 在烟酰胺单核苷酸的酶促合成中具有更大的优势。

关键词: 烟酰胺核苷激酶; β -烟酰胺核苷酸; 表达; 鉴定; 生物催化

Heterologous Expression and Enzymatic Properties of Nicotinamide Nucleoside Kinase from *Saccharomyces cerevisiae*

HE Jianju¹, LIU Xinxin¹, SHI Hongling¹, RAN Luni¹, WANG Xian², ZHANG Yingjun¹, TANG Cunduo^{1,2,3,*}

(1. College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China;

2. Postdoctoral Innovation Practice Base, She Dian Lao Jiu Co. Ltd., Nanyang 473300, China;

3. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this study, the nicotinamide riboside kinase 1 gene (*ScNRK1*) was cloned from *Saccharomyces cerevisiae*, and its soluble expression in *Escherichia coli* was achieved using pET28a plasmid. The enzyme activity in the fermentation broth was 14.75 IU/mL, and the specific activity the purified enzyme was 2 252.59 IU/mg. In addition, the kinetic parameters of *ScNRK1* were significantly higher than those of other reported nicotinamide nucleoside kinases, so *ScNRK1* could be more advantageous in the enzymatic synthesis of nicotinamide mononucleotide (NMN).

Keywords: nicotinamide nucleoside kinase; β -nicotinamide mononucleotide; expression; identification; biocatalysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220912-095

中图分类号: Q814.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 16-0192-06

引文格式:

何建菊, 刘欣欣, 史红玲, 等. 酿酒酵母烟酰胺核苷激酶的异源表达及其酶学性质分析[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 192-197. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220912-095. <http://www.spkx.net.cn>

HE Jianju, LIU Xinxin, SHI Hongling, et al. Heterologous expression and enzymatic properties of nicotinamide nucleoside kinase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2023, 44(16): 192-197. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220912-095. <http://www.spkx.net.cn>

烟酰胺单核苷酸 (nicotinamide mononucleotide, NMN) 是一种天然存在的活性核苷酸, 有 α 、 β 两种异构体, 其中 β -NMN是辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 的活性形式^[1]。NMN是细胞氧化还原NAD⁺的关键中间体^[2]。NAD⁺在

人体中发挥着至关重要的生物作用, 主要包括参与生物氧化还原反应、维持细胞氧化还原稳态及参与信号传导过程^[3]。有研究表明人体中NAD⁺含量会随着年龄的增长而慢慢减少^[4-6], NMN在体内需要转化成NAD⁺才有生理功能^[5]。临床研究发现, 通过调节生物体内NMN水平,

收稿日期: 2022-09-12

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31900916); 河南省高校科技创新人才项目 (21HASTIT041); 河南省中央引导地方科技发展资金项目 (Z20221343035)

第一作者简介: 何建菊 (1995—) (ORCID: 0000-0003-3208-968X), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物催化与生物转化。

E-mail: 1022575270@qq.com

*通信作者简介: 唐存多 (1987—) (ORCID: 0000-0003-0352-0805), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物催化与生物转化。

E-mail: tcd530@126.com

对心脏和脑缺血、阿尔茨海默病、饮食和年龄引起的2型糖尿病和肥胖等有良好的治疗和修复作用^[6-8]。近几年, NMN被誉为“不老神药”^[9], 有实验表明, 在小鼠模型中口服NMN会导致NAD⁺的回升, 能抗衰老、延长寿命^[10-11]。此外, 通过烟酰胺核苷激酶(nicotinamide riboside kinase, NRK)途径增加NAD⁺含量能恢复抗病毒聚ADP核糖聚合酶功能, 对SARS-CoV-2产生先天免疫^[12]。

NAD⁺主要有3种代谢合成途径: Preiss-Handler途径、从头合成途径和补救合成途径^[13]。补救合成途径是以烟酰胺核糖(nicotinamide ribose, NR)为底物, 在NRK的作用下磷酸化生成NMN。NMN合成最早使用的是化学合成法, 由于使用的各种化学试剂对环境造成污染、产物分离困难, 且存在手性异构体等问题, 制约了NMN的大规模生产^[2]。随着生物催化、酶工程技术的发展, NMN的生物合成成为热点。生物合成包括天然发酵法和酶促合成法, 天然发酵法因为底物和产物都很容易被菌体自身消耗, 产物很难大量积累, 生产效率低下, 不适于工业化生产^[2]。酶促合成法是一种较为绿色环保的制备方法^[14], 因为其没有有机溶剂的残留, 也不存在手性问题等优点。

目前, 生产NMN的生物催化法有两种, 第1种是烟酰胺底物路线, 第2种是NR底物路线^[11]。烟酰胺底物路线是指以烟酰胺、ATP和核糖为底物, 通过烟酰胺磷酸核糖转移酶、核糖磷酸焦磷酸激酶以及核糖激酶制得NMN的方法^[15-16]。第2种方法是以NR和ATP为底物, 只需NRK的催化即可生成NMN, 这是一个单酶反应体系。反应速率快, 底物转化率高, 是目前比较热门的合成路线^[17-19]。虽然NR价格昂贵, 但是考虑到NMN的重要性, 以及NMN在医疗和生物技术行业的广泛应用, 在可接受的成本范围内高效制造NMN仍然具有重要的意义^[20]。同时, 开发高活性的NRK, 降低酶的使用成本也是降低NMN生物合成成本的有效途径。

本研究从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中克隆出NRK基因片段, 再借助pET28a质粒在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中实现高水平的可溶性表达, 并对其酶学特性进行分析。本研究有望为NRK进一步分子改造、表达宿主的优选及应用奠定坚实的基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试剂

NR、 β -烟酰胺核苷酸标准品 麦克林化学试剂有限公司; 甲醇(色谱纯) 天津科密欧化学试剂有

限公司; 三磷酸腺苷溶液、磷酸二氢钠、氯化镁、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 生工生物工程(上海)股份有限公司; rTaqDNA聚合酶、PrimeSTAR[®] HS DNA聚合酶、PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、DL 2 000 DNA Marker、DNA连接试剂盒Ver.2.1 宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 菌株、质粒与培养基

携带原核表达质粒的BL21(DE3)/pET28a、酿酒酵母菌株由本课题组保藏^[21]。LB(Luria-Bertani)培养基用于大肠杆菌的培养, 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基用于酿酒酵母的培养。

1.2 仪器与设备

核酸电泳仪 北京市六一仪器厂; 蛋白电泳仪 美国Bio-Rad公司; EC 2006型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)系统 大连依利特分析仪器有限公司; Hypersil C₁₈柱 美国Thermo Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 重组大肠杆菌的构建

以*Saccharomyces cerevisiae*和Nicotinamide nucleoside kinase为关键词搜索, 在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中找到酿酒酵母NRK1(*ScNRK1*), 对应的基因组序列(GenBank: AY611479.1)。为了去除模板核苷酸序列中的内含子, 选择进行合成NRK cDNA的第1链, 根据已报道的NRK1序列设计特异性引物NRK1-F: GGAATTCCATATGATGACTTCGAAAAAGTGATA(含Nde I酶切位点)和NRK1-R: CCGCTCGAGCTAATCCTTACAAAGCTTTAG(含Xho I酶切位点), 并委托苏州弘讯生物技术有限公司进行合成。

以酿酒酵母的总RNA为模板, 用PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行cDNA第1链的合成, 再利用NRK1-F和NRK1-R引物PCR扩增NRK的编码基因, 利用限制性内切酶Nde I和Xho I对目的基因及pET28a质粒分别进行双酶切, 然后连接转化进入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞, 经抗性筛选和测序鉴定获得BL21(DE3)/pET28a-*ScNRK1*重组菌。将上述重组菌连续在无抗LB培养基上传代10次, 然后接种至含卡那霉素的LB培养基上培养, 观察它的生长情况, 通过卡那霉素抗性筛选考察重组菌携带质粒的遗传稳定性^[22]。

1.3.2 重组大肠杆菌的诱导表达及纯化

将BL21(DE3)/pET28a-*ScNRK1*重组大肠杆菌单菌落接种至5 mL含100 μ g/mL卡那霉素的LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min条件下振荡培养14 h, 以2%接种量转接至100 mL新鲜LB液体培养基中, 培养至OD_{600nm}约为

1.0, 加入1 mol/L IPTG溶液至终浓度为0.1 mmol/L, 16 °C、200 r/min诱导培养20h; 将100 mL菌液于8 000 r/min、4 °C离心5 min, 收集菌体, 用20 mmol/L Tris-HCl菌体重悬后进行超声破碎, 破碎后收集上清液, 上清液通过平衡好的镍琼脂糖柱上进行纯化, 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)分析^[22-23]。

1.3.3 酶活力分析

NRK活力分析: 以NR为底物, NMN生成量为标准计算酶活力。根据已报道的酶活力测定方法^[23-24]略作修改。酶活力测定的反应体系为1 mL, 包含20 mmol/L pH 7.6 Tris-HCl缓冲液、10 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L ATP、10 mmol/L NR, 加入稀释适当倍数的100 μL酶液, 40 °C反应20 min, 沸水中煮5 min终止反应, 0.22 μm滤膜过滤反应液, 用HPLC测定酶活力。HPLC条件: 色谱柱为Thermo Hypersil C₁₈柱, 检测波长260 nm, 柱温30 °C, 流动相为磷酸二氢钠缓冲液-甲醇(95:5, V/V), 流速1 mL/min, 进样体积10 μL。在测定条件下每分钟生成1 μmol NMN所需的酶量定义为1个酶活力单位(IU)。

1.3.4 NMN的定量分析

将NMN准品用超纯水分别配成0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L的溶液, 然后分别取10 μL进行HPLC分析, 获得各浓度NMN的峰面积后, 进行线性拟合获得回归方程及相关系数, 色谱条件和上述测酶活力方法相同, 后面待检样品产物按照同样条件进行HPLC分析, 根据测得的峰面积可以由回归方程计算出相应的样品浓度。

1.3.5 重组酶的温度特性

参照1.3.3节方法, 分别在25~55 °C(以5 °C为间隔)下测定该重组酶的催化活性以获得该重组酶的最适反应温度。将重组酶分别在25~55 °C(以5 °C为间隔)下保温1 h, 然后在最适反应温度下测定各自的残留酶活力, 以冰浴保存1 h后酶活力为100%, 以此考察各重组酶的温度稳定性^[25]。

1.3.6 重组酶的pH值特性

参照1.3.3节方法, 在最适反应温度下, 分别在pH 3.4~7.0(以0.6为间隔)下测定重组酶的催化活性以获得重组酶的最适反应pH值。将重组酶分别在pH 3.4~7.0(以0.6为间隔)缓冲液中冰浴1 h, 然后在各自最适反应温度和最适反应pH值下测定各自的残留酶活力, 以未经处理值为100%, 以此考察各重组酶的pH值稳定性^[25]。

1.3.7 重组酶的最适Mg²⁺浓度

已有文献报道, NRK催化活性受Mg²⁺浓度的影响^[26]。为考察Mg²⁺浓度对重组酶酶活力的影响, 参照1.3.3

节方法, 在最适反应温度下, 分别在MgCl₂终浓度为0.1~0.4 mol/L(以0.05 mol/L为间隔)下测定重组酶的催化活性, 以获得最适Mg²⁺浓度, 以最适Mg²⁺浓度下酶活力为100%, 以此检测重组酶的最适Mg²⁺浓度。

1.3.8 重组酶的动力学参数

重组NRK动力学参数的测定根据已报道方法稍加修改, 以确定NR底物的特异性^[27], 反应系统中ATP浓度为1 mmol/L。在最佳反应条件下, 在0.1~0.35 mmol/L不同NR浓度下测定重组酶的催化活性。每次测定重复3次。同样地, 固定NR浓度为1 mmol/L, 将ATP浓度设置为0.04~0.2 mmol/L, 以测定重组酶的催化活性, 每次测定执行3次, 依次考察对ATP的动力学参数。使用Michaelis-Menten方程计算未表现出底物抑制酶的表现动力学数据, 或者当观察到底物抑制时使用以下方程: $V = V_{\max} / (1 + K_m/S + S/K_i)$ ^[28], 所有计算均使用Origin 9.0软件。

1.3.9 NMN的生物合成

NMN反应进程: 配制1 mL体系, 包含50 mmol/L pH 5.8 Tris-HCl缓冲液、17.5 mmol/L MgCl₂、3 mmol/L ATP、6 mmol/L NR, 加入稀释适当倍数的100 μL酶液, 在反应10、20、30、40、50、60 min时取样, 终止反应, 用0.22 μm滤膜过滤, 进行HPLC分析, 获得各反应时间下的NMN峰面积, 计算NMN随反应时间变化的得率。

1.3.10 常用网站及软件

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库和BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): 蛋白质、基因序列及蛋白质3-D结构的搜索; DNAMAN: 用于基因序列及限制性酶切位点分析和测序结果分析; ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 网站: 预测蛋白质的理论理化性质; TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.phpTMHMM-2.0>): 用于预测蛋白质的跨膜结构。

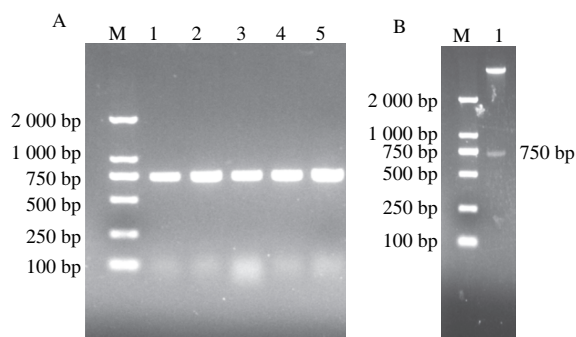
1.4 数据统计及图表绘制

图片均用Adobe Photoshop CS 8.0软件进行色阶、对比度调节及标注等处理。简单的数据处理及分析均借助Origin 9进行。

2 结果与分析

2.1 重组大肠杆菌的构建

目的基因PCR扩增产物的电泳图如图1A所示, 在约750 bp处出现了明显的特异性条带, PCR产物的片段长度与预期的理论长度基本一致。潜在重组质粒双酶切的电泳检测如图1B所示, 鉴定后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定, 获得*ScNRK1*的基因序列, 并推测出其氨基酸序列。



A: M. DNA Marker, 下同; 1~5. PCR扩增产物。
B: 1.用Nde I和Xho I对pET28a-ScNRK1进行双酶切的产物。

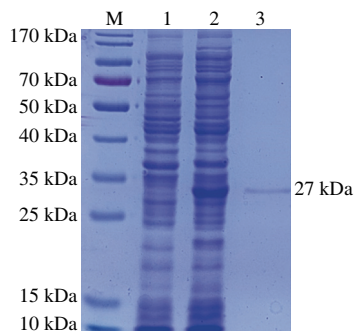
图1 ScNRK1基因的PCR扩增(A)及pET28a-ScNRK1的双酶切验证(B)
Fig.1 PCR amplification of ScNRK1 (A) and double-enzyme digestion of pET28a-ScNRK1 (B)

2.2 ScNRK1的序列分析

将上述推测出的ScNRK1氨基酸序列在ProtParam上进行理论理化性质的预测,结果表明ScNRK1的理论等电点为6.23,理论分子质量为27 689.58 Da,不稳定指数II为25.59,是一个较稳定的蛋白,其在大肠杆菌和酵母体内的半衰期分别能达到10 h和20 h以上。利用TMHMM-2.0服务器预测蛋白跨膜结构的结果显示,ScNRK1的240个氨基酸残基均为膜外残基,表明ScNRK1理论上较容易实现胞外分泌型表达。

2.3 重组大肠杆菌的诱导表达及鉴定

图2结果显示, BL21 (DE3) /pET28a-ScNRK1上清液在约27 kDa处有明显的特异性条带,与ScNRK1的理论分子质量27 689.58 Da基本一致,表明已成功实现了ScNRK1在大肠杆菌中的可溶性表达。经亲和纯化后产物在约27 kDa处出现了单一特异性条带,表明经过亲和层析,获得了电泳纯的重组ScNRK1,可以用于后续酶学特性的分析。酶活力测定结果表明, BL21 (DE3) /pET28a-ScNRK1发酵液中NRK活力达14.75 U/mL,纯化后重组ScNRK1的比活力为2 252.59 U/mg(表1),其表达水平和比活均显著高于已报道的水平^[7],具有较好的应用前景。



M. 预染的蛋白质Marker; 1. BL21 (DE3) /pET28a的表达产物; 2. BL21 (DE3) /pET28a-ScNRK1表达的粗产物; 3.经纯化后BL21 (DE3) /pET28a-ScNRK1的表达产物。

图2 重组大肠杆菌表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression products in recombinant *E. coli*

表1 不同来源NRK的比活力及动力学参数的比较

Table 1 Comparison of specific activity and kinetic parameters of nicotinamide nucleoside kinases from different sources

来源	比活力/(U/mg)	K_m /(mmol/L)	K_{cat}/s^{-1}	参考文献
人(NRK1)	0.275	0.088	0.60	[29]
人(NRK2)	2.32	0.19	0.75	[29]
马氏克鲁维酵母	7.9	0.045	3.79	[20]
嗜热链霉菌	0.08	/	/	[20]
嗜热毛壳菌	0.08	/	/	[20]
酿酒酵母	2 252.59	54.27	63.28	本研究

2.4 NMN标准品的HPLC分析

将分析纯的NMN在ThermoHypersil C₁₈柱上进行HPLC分析,在该分析条件下,NMN的保留时间约为2.79 min(图3A),底物标准品也进行HPLC分析,保留时间为4.02 min(图3B)。将NMN浓度(x/(mmol/L))对相应峰面积(y)进行线拟合,获得NMN标准曲线,回归方程为 $y=173.87x+101.32$, $R^2=0.9935$,结果表明在该HPLC分析条件及浓度范围下,NMN浓度与峰面积呈良好线性相关,因此,利用此法可以对NMN进行精确定量。

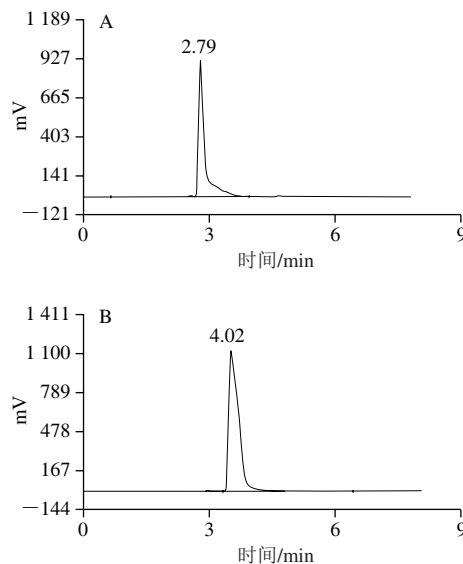


图3 NMN(A)、NR(B)标准品分析

Fig.3 HPLC chromatograms of NMN (A) and NR (B) standards

2.5 温度对重组ScNRK1活力的影响

从图4可以看出,在20~30℃温度范围内,酶促反应速率随温度的升高而增大。当温度超过30℃时,反应速率降低,重组ScNRK1的最佳反应温度为30℃,这和之前文献报道的最适温度相同^[30]。由图5可知,当孵育的温度超过40℃时,其残余酶活力显著下降,仅为50%左右,这在一定程度上也会限制它在NMN生物合成中的应用,在以后研究中可通过蛋白质工程和固定化技术对ScNRK1的热稳定性进行改造,以满足工业化生产的需求^[20]。

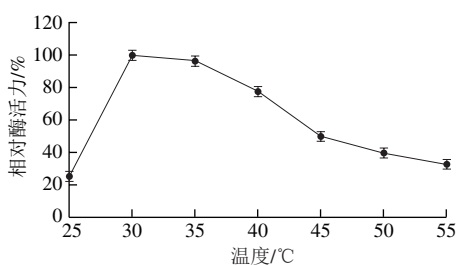


图4 重组ScNRK1的最适反应温度

Fig. 4 Optimal temperature of recombinant ScNRK1

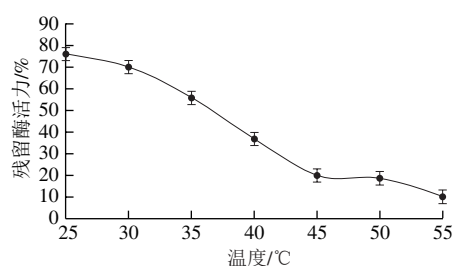


图5 重组ScNRK1的温度稳定性

Fig. 5 Temperature stability of recombinant ScNRK1

2.6 pH值对重组ScNRK1活力的影响

缓冲液pH值过高或过低可能会导致酶的空间结构发生变化,从而降低其催化活性^[31]。从图6可以看出,重组ScNRK1是一种嗜酸性酶,其最适反应pH值为5.8。当pH值稍微偏离其最佳pH值时,其催化活性显著降低。因此,在使用过程中必须严格控制反应系统的pH值。从图7可以看出,重组ScNRK1对pH值的耐受性较好,在测定条件下,它的残余酶活力均大于90%。

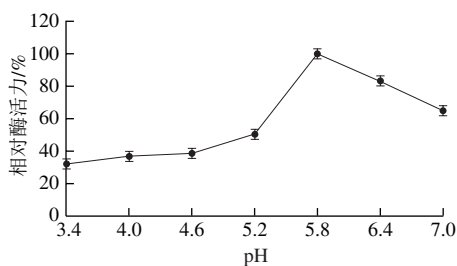


图6 重组ScNRK1的最适pH值

Fig. 6 Optimal pH of recombinant ScNRK1

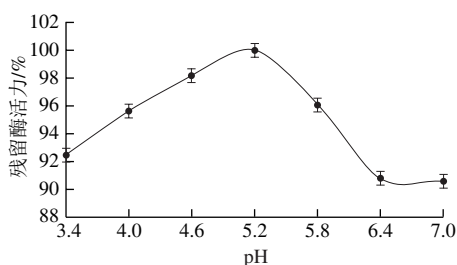
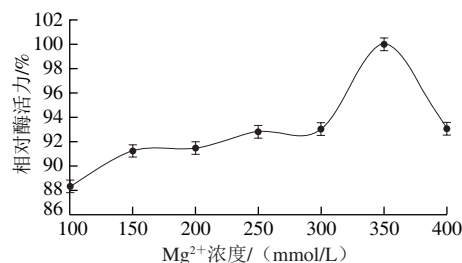


图7 重组ScNRK1的pH值稳定性

Fig. 7 pH stability of recombinant ScNRK1

2.7 重组ScNRK1的最适Mg²⁺浓度

从图8可以看出,重组ScNRK1的最佳Mg²⁺浓度为350 mmol/L,过低的Mg²⁺浓度不能充分发挥酶的催化活性,过高的Mg²⁺浓度对酶的催化活性也有一定的抑制作用。

图8 Mg²⁺浓度对重组ScNRK1酶活力的影响Fig. 8 Effect of Mg²⁺ concentration on the activity of recombinant ScNRK1

2.8 重组ScNRK1的动力学参数

重组ScNRK1对NR有很高的催化效率,其 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 值分别为 63.28 s^{-1} 和 $1.17\text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 。同样,其对ATP也表现出较高的催化效率,其 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 值分别为 92.96 s^{-1} 和 $1.71\text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$,表明重组ScNRK1在NMN的酶法合成中具有重要潜力,对降低合成过程中酶的使用成本具有重要的意义。

2.9 NMN的生物合成

如图9所示,已有部分NR(4.01 min)转化成烟酰胺核苷酸(2.79 min)。6 mmol/L的NR用上述方法得到反应进程曲线,如图10所示,表明离理论得率仍有一定的差距^[19],在后续研究中仍需对反应条件进行系统的优化。但这种一步酶法反应节约了一定的反应时间^[9,17]。

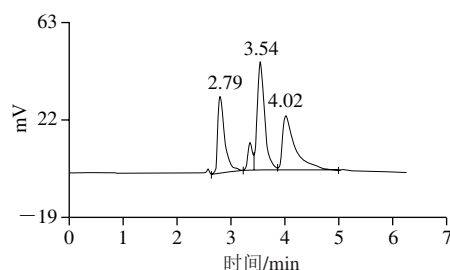


图9 NMN反应液相色谱图

Fig. 9 Liquid chromatogram of NMN reaction products

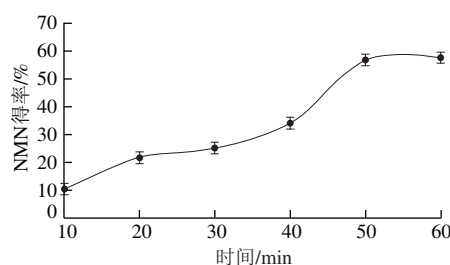


图10 NMN的反应进程

Fig. 10 Evolution of NMN yield during the reaction process

3 讨论

NMN是公认NAD⁺生物合成中间体的一种核苷酸^[11],是食品、化妆品、保健品的研究热点^[9]。采用基因组挖矿技术,可以快速地将来假定酶变为真实酶,为生物催化提供更多的选择^[32]。

本研究从酿酒酵母中克隆出NRK基因片段,再借助pET28a质粒在大肠杆菌BL21中实现高水平的可溶性表达,酶活力测定结果表明,BL21(DE3)/pET28a-ScNRK1发酵液中NRK活力达14.75 U/mL,纯化后重组ScNRK1比活力为2 252.59 U/mg,其表达水平和比活力均显著高于已报道的水平^[7]。表明从酿酒酵母中挖掘的NRK有一定优势。温度特性结果表明,酿酒酵母来源NRK的最适温度为30℃,且稳定性差,这与之前的报道相同^[30],这都限制了NMN的工业化生产。接下来将对NRK进一步分子改造、表达宿主的优选。最后对底物NR进行催化生成NMN进行研究,虽然离理论得率仍有一定的差距^[19],但反应节约了反应时间,为更快生产NMN奠定了基础。

参考文献:

- [1] 潘钦孩. 辅酶I及其中间体化学合成的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [2] SAUVE A A. NAD⁺ and vitamin B₃: from metabolism to therapies[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, 324: 883-893. DOI:10.1124/jpet.107.120758.
- [3] 王玮璇, 胡亚东, 陈宇凌, 等. 衰老相关疾病中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸生物学功能的质谱分析[C]//第三届全国质谱分析学术报告会摘要集. 第三届全国质谱分析学术报告会, 2017: 70.
- [4] MILLS K F, YOSHIDA S, STEIN L R, et al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice[J]. Cell Metabolism, 2016, 24(6): 795-806. DOI:10.1016/j.cmet.2016.09.013.
- [5] WANG X N, HU X J, YANG Y, et al. Nicotinamide mononucleotide protects against beta-amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death[J]. Brain Research, 2016, 1643: 1-9. DOI:10.1016/j.brainres.2016.04.060.
- [6] YAMAMOTO T, BYUN J, ZHAI P, et al. Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD⁺ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion[J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e98972. DOI:10.1371/journal.pone.0098972.
- [7] BIEGANOWSKI P, BRENNER C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a preissandler independent route to NAD⁺ in fungi and humans[J]. Cell, 2004, 117(4). DOI:10.1016/S0092-8674(04)00416-7.
- [8] LONG A N, OWENS K, SCHLAPPAL A E, et al. Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an Alzheimer's disease-relevant murine model[J]. BMC Neurol, 2015, 15: 19. DOI:10.1186/s12883-015-0272-x.
- [9] 任丽梅, 王晓茹, 祁永浩, 等. β -烟酰胺单核苷酸功能与合成研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(2): 127-132. DOI:10.14188/j.ajsh.2021.02.004.
- [10] DAS A, HUANG G X, BONKOWSKI M S, et al. Impairment of an endothelial NAD⁺-H₂S signaling network is a reversible cause of vascular aging[J]. Cell, 2018, 173(4): 74-89. DOI:10.1016/j.cell.2019.01.026.
- [11] PODDAR S K, SIFAT A E, HAQUE S, et al. Nicotinamide mononucleotide: exploration of diverse therapeutic applications of a potential molecule[J]. Biomolecules, 2019, 9(1): 34. DOI:10.3390/biom9010034.
- [12] HEER C D, SANDERSON D J, VOTH L S, et al. Coronavirus infection and PARP expression dysregulate the NAD metabolome: an actionable component of innate immunity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(52): 17986-17996. DOI:10.1074/jbc.RA120.015138.
- [13] IMAI S. Dissecting systemic control of metabolism and aging in the NAD world: the importance of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis[J]. FEBS Letters, 2011, 585(11): 11-12. DOI:10.1016/j.febslet.2011.04.060.
- [14] 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.
- [15] 傅荣昭, 张琦. 一种制备烟酰胺单核苷酸的方法: CN107889504B[P]. 2021-07-27.
- [16] YANG Y, SAUVE A A. NAD (+) metabolism: bioenergetics, signaling and manipulation for therapy[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2016, 1864(12): 1787-1800. DOI:10.1016/j.bbapap.2016.06.014.
- [17] 于铁妹, 林立峰, 凌瑞枚, 等. 一种 β -烟酰胺单核苷酸的酶催化合成方法: CN112795606B[P]. 2021-07-27.
- [18] 陶军华, 付敏杰, 梁晓亮. 一种酶法制备 β -烟酰胺单核苷酸的方法: CN106755209B[P]. 2021-07-23.
- [19] 祝俊, 李斌, 徐飞, 等. 一种烟酰胺核糖激酶突变体及其应用: CN110373398A[P]. 2019-10-25.
- [20] 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]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9: 26-35. DOI:10.1186/s40643-022-00514-6.
- [21] 张振华, 解玉丽, 王铁军, 等. 甲酸脱氢酶催化活性的定向进化及其高效表达[J]. 应用化学, 2021, 38(6): 704-712. DOI:10.19894/j.issn.1000-0518.200271.
- [22] TANG C D, DING P J, SHI H L, et al. One-pot synthesis of phenylglyoxylic acid from racemic mandelic acids via cascade biocatalysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2946-2953. DOI:10.1021/acs.jafc.8b07295.
- [23] 张章, 张琦. 酶法工业化生产NAD的方法: CN112437813A[P]. 2021-03-02.
- [24] 单欣淑. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的生物合成研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [25] 李祥, 解玉丽, 贾园园, 等. 基于基因组挖掘技术的新型谷氨酸脱羧酶基因挖掘及表达鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 79-85. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200102-012.
- [26] IKARI A, NAKAJIMA K, SUKETA Y, et al. Arachidonic acid-activated Na⁺-dependent Mg²⁺ efflux in rat renal epithelial cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2003, 1618(1): 1-7. DOI:10.1016/j.bbame.2003.09.011.
- [27] FLETCHER R S, RATAJCZAK J, DOIG C L, et al. Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells[J]. Molecular Metabolism, 2017, 6(8): 78-89. DOI:10.1016/j.molmet.2017.05.011.
- [28] JÖRG Z, WOLFGANG B, RENÉ G, et al. Removal of substrate inhibition and increase in maximal velocity in the short chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase involved in morphine biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(39): 55-56. DOI:10.1074/jbc.M109.030957.
- [29] 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.
- [30] 肖春英. 烟酰胺核糖激酶及其应用: CN112608910A[P]. 2021-04-06.
- [31] KIM S, AHMED D, EDMOND M, et al. Insights into aldehyde dehydrogenase enzymes: a structural perspective[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8(2): 11-12. DOI:10.3389/fmolb.2021.659550.
- [32] GONG J S, LU Z M, LI H, et al. Metagenomic technology and genome mining: emerging areas for exploring novel nitrilases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(15): 6603-6611. DOI:1007/s00253-013-4932-8.