

## 研究报告

## CRISPR/Cas9 编辑大肠杆菌工程菌生产氨基葡萄糖

吉瑞阳, 刘枫, 花强, 胡凤仙\*

华东理工大学生物工程学院 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

吉瑞阳, 刘枫, 花强, 胡凤仙. CRISPR/Cas9 编辑大肠杆菌工程菌生产氨基葡萄糖[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3271-3284.

JI Ruiyang, LIU Feng, HUA Qiang, HU Fengxian. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *Escherichia coli* for the production of glucosamine[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3271-3284.

**摘要:** 【背景】氨基葡萄糖(glucosamine, GlcN)及其衍生物 N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine, GlcNAc)是合成糖胺聚糖的重要前体物质, 在医药、化妆品和保健品领域具有广泛的应用价值。传统的生产方式存在诸多弊端, 如环境污染、原料限制、不适于海鲜易过敏人群等问题, 因此利用微生物发酵法生产 GlcN 和 GlcNAc 越来越受到青睐。【目的】利用微生物发酵生产并提高 N-乙酰氨基葡萄糖的产量, 探索分子改造及发酵条件优化策略。【方法】以大肠杆菌 MG1655 为出发菌株, 首先利用表达载体共表达大肠杆菌来源的 *glmS* 和酿酒酵母来源的 *gna1*, 构建 GlcNAc 的生物合成路径, 然后利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 GlcNAc 的分解代谢与转运途径, 以提高 GlcNAc 的产量, 最后结合发酵条件优化使 GlcNAc 的产量得到进一步提升。【结果】通过分子改造得到一株产 GlcNAc 菌株 RY-5, 发酵 20 h 后 GlcNAc 的产量达到了 2.36 g/L, 相较于初始构建的菌株 RY-1 提高了 29 倍, 进一步对装液量和诱导剂 IPTG 的添加时间等条件进行发酵优化, GlcNAc 产量达到了 7.74 g/L, 与优化前相比提高了 2.3 倍。【结论】成功构建一株生产 GlcN 和 GlcNAc 的重组大肠杆菌工程菌株, 并为微生物合成 GlcN 和 GlcNAc 的工业化生产奠定了基础。

**关键词:** 大肠杆菌; 氨基葡萄糖; N-乙酰氨基葡萄糖; CRISPR/Cas9; 发酵优化

CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *Escherichia coli* for the production of glucosamine

JI Ruiyang, LIU Feng, HUA Qiang, HU Fengxian\*

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** [Background] Glucosamine (GlcN) and its derivative N-acetylglucosamine (GlcNAc)

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102805)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102805).

\*Corresponding author. E-mail: hufx@ecust.edu.cn

Received: 2022-11-20; Accepted: 2023-02-11; Published online: 2023-03-12

are important precursors for the synthesis of glycosaminoglycans, which have a wide range of applications in the fields of medicine, cosmetics, and healthcare products. The traditional production methods of GlcN and GlcNAc have many drawbacks, such as environmental pollution, raw material limit, and unsuitability for people with seafood allergies. Therefore, the microbial fermentation for producing GlcN and GlcNAc has attracted increasing attention. **[Objective]** To explore the molecular modification for producing GlcNAc by microbial fermentation and optimize the fermentation conditions for increasing the production. **[Methods]** Firstly, the *glmS* from *Escherichia coli* MG1655 and *gnal* from *Saccharomyces cerevisiae* were co-expressed in *E. coli* MG1655 by the pTrcHisA vector. CRISPR/Cas9 was then employed to knock out the genes responsible for GlcN and GlcNAc transport and metabolism to improve the production of GlcNAc. Finally, the fermentation conditions were optimized to further increase the production of GlcNAc. **[Results]** The RY-5 strain was constructed by the molecular modification. The production of GlcNAc by RY-5 reached 2.36 g/L after shake flask fermentation for 20 h, which was 29 times that by RY-1 strain. After optimization of the fermentation conditions, the production of GlcNAc reached 7.74 g/L, which increased by 2.3 times compared with that before optimization. **[Conclusion]** This study successfully developed a recombinant *E. coli* strain producing GlcN and GlcNAc, which launched a foundation for the industrial production of GlcN and GlcNAc by microbial fermentation.

**Keywords:** *Escherichia coli*; glucosamine; *N*-acetylglucosamine; CRISPR/Cas9; optimization of fermentation conditions

氨基葡萄糖(glucosamine, GlcN)全称为 2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖,是天然且必需的氨基单糖<sup>[1]</sup>。N-乙酰氨基葡萄糖(*N*-acetylglucosamine, GlcNAc)是 GlcN 的一种衍生物,是细菌和动植物中结构聚合物的主要成分<sup>[2]</sup>。在工业生产的下游提取时,将 GlcNAc 用弱酸进行处理后脱乙酰化即可产生 GlcN<sup>[3]</sup>。两者是合成糖胺聚糖如透明质酸、硫酸软骨素和硫酸角藻聚糖的重要前体物质,广泛存在于所有生物体中,包括细菌、酵母、丝状真菌及动植物<sup>[4]</sup>。GlcN 和 GlcNAc 在骨关节炎的治疗<sup>[5-10]</sup>、食品添加剂<sup>[11-12]</sup>和化妆品领域<sup>[13-14]</sup>具有广泛的应用价值。全球新产品数据库显示,GlcN 和 GlcNAc 作为膳食补充剂的主要市场为日本、北美和欧洲<sup>[15-16]</sup>,最大的生产商和供应商目前仍然是中国<sup>[17-18]</sup>。

GlcN 常用的生产方法包括三大类:几丁质水解法<sup>[19-21]</sup>、生物转化法<sup>[22-23]</sup>及微生物发酵法<sup>[24]</sup>。

这 3 种方法的优缺点对比如表 1 所示。

近几年来,微生物发酵法中常使用的微生物有真菌<sup>[25]</sup>和原核生物<sup>[26]</sup>,真菌包括了寡根霉、红曲霉和曲霉,原核生物主要包括枯草芽孢杆菌<sup>[27]</sup>和大肠杆菌<sup>[28-30]</sup>。真菌存在产量和生产率低的问题,枯草芽孢杆菌分泌途径研究不足,限制了产量的提升,因此本研究选用大肠杆菌作为表达宿主。

随着目前全球人口老龄化的加剧及 GlcN 作为健康膳食补充剂在骨关节炎治疗中的广泛使用,人们对 GlcN 的需求不断增长<sup>[5-10]</sup>。由于 GlcN 在促进关节健康方面的优点,近几年的市场趋势表明,GlcN 在保健产品(如运动饮料和食品)中越来越受欢迎,同时全球推出的补充 GlcN 的新产品数量从之前的 95 种增加到 120 多种<sup>[15-18]</sup>。然而目前工业常用的几丁质水解法存在诸多缺陷:(1) 利用强酸溶液会造成严

表 1 GlcN 常用的生产方法比较

Table 1 Comparison of common production methods of GlcN

方法 Method	具体操作 Specific operations	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
几丁质水解法 Chitin hydrolysis process	利用强酸将虾蟹外壳中提取的几丁质进行水解来获得 GlcN GlcN was obtained by hydrolysis of chitin from shrimp and crab shells with strong acid	方法简单, 目前比较常用的一种方法 The method is simple and is commonly used at present	浪费水资源, 污染环境 <sup>[19-20]</sup> , 不适用于海鲜过敏人群, 受到原材料供应的限制 <sup>[21]</sup> Water resources waste, environmental pollution <sup>[19-20]</sup> , not suitable for people allergic to seafood, limited by the supply of raw materials <sup>[21]</sup>
生物转化法 Biological transformation method	以几丁质作为原料, 通过四大类分解系统进行: 内切几丁质酶(EC 3.2.1.1.4)、外切几丁质酶(EC 3.2.1.14)、几丁质酶(EC 3.2.1.30)和 $\beta$ -N-乙酰基己糖胺酶(EC 3.2.1.52) <sup>[23]</sup> With chitin as the raw material, it is carried out by four major classes of decomposition systems: endo chitinases (EC 3.2.1.1.4), exo chitinases (EC 3.2.1.14), chitinases (EC 3.2.1.30), and $\beta$ -N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) <sup>[23]</sup>	不使用强酸碱, 对环境污染较少 Strong acid and base were not used, so it caused less pollution to the environment	为了维持酶制剂的活性和稳定性, 该方法生产成本过高, 因此很难实现工业生产 In order to maintain the activity and stability of enzyme preparation, the production cost of this method is too high, so it is difficult to realize industrial production
微生物发酵法 Microbiological fermentation	利用微生物代谢来合成 GlcN 或 GlcNAc GlcN or GlcNAc were synthesized by microbial metabolism	原料几乎无限制、发酵周期短、转化条件温和、环境污染少、服用后无过敏反应等优点, 具有广阔的市场前景 The advantages of almost unlimited raw materials, short fermentation cycle, mild transformation conditions, less environmental pollution, no allergic reaction after taking, etc. So this method has broad market prospects	目前多处于实验室研发阶段, 无法应用于工业生产 At present, most of them are in the laboratory research and development stage and cannot be applied to industrial production

重的环境污染及水资源浪费; (2) 该方法获得的产品不适用于海鲜易过敏人群; (3) 受地理位置和原料的供给等因素影响较大<sup>[19-21]</sup>。近年来, 随着代谢工程的不断发展, 微生物发酵法在不断进步, 该方法有原料几乎无限制、发酵周期短、转化条件温和、环境污染少、服用后无过敏反应等优点<sup>[24,26,28-30]</sup>。本研究旨在构建高产 GlcN 和 GlcNAc 的大肠杆菌基因工

程菌种, 为工业化生产奠定基础。另外, 微生物发酵法成功实现工业化生产后, GlcN 的生产将不再受原料和地域限制, 获得的产品健康且符合食素人群的习惯, 会更好地满足市场需求。有研究表明, 外源引入氨基葡萄糖-6-磷酸-N-乙酰基转移酶合成基因可赋予大肠杆菌生产 N-乙酰氨基葡萄糖的能力, 基于此构建的大肠杆菌工程菌株产生、转运与分解代谢

氨基葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖途径如图 1<sup>[31]</sup>所示。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

研究中所涉及的菌株及质粒如表 2 所示。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

工具酶和限制性内切酶(*Bam*H I、*Eco*R I 等), Thermo Fisher Scientific 公司; DNA Marker, 擎科(上海)生物技术有限公司; PCR 相关酶, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 分子克隆试剂盒及 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 酵母粉和蛋白胨, OXOID 公司; 葡萄糖和无机盐, 上海泰坦科技股份有限公司。研究中所用试剂均为分析纯。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京市六一生物科技有限公司; 凝胶成像仪, 上海

复日科技公司。

#### 1.1.3 培养基

种子培养基: LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母粉 24.0, 蛋白胨 12.0, 甘油 5.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.54, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达载体的构建

构建 TRC 启动子调控的 GLMS 和 GNA1 的表达载体 pTrcHisA-*glmS-gna1* 时, 使用引物 *trc-glmS-F* (5'-TAAATAAGGAGGAATAAACCA TGTGTGGAATTGTTGGCGC-3')和 *trc-glmS-R* (5'-TACCAGCTGCAGATCTCGAGTTACTCAA CCGTAACCGATT-3')以大肠杆菌基因组 DNA 为模板扩增 *glmS* 基因(注释号为 NC\_000913.3), 使用引物 *trc-gna1-F* (5'-AATCGGTTACGGTTG AGTAACTCGAGAGAGGTATATATTAATGTAT CGATTAAATAAGGAGGAATAAACCATGAGC TTACCCGATGGATT-3')和 *trc-gna1-R* (5'-CCGC

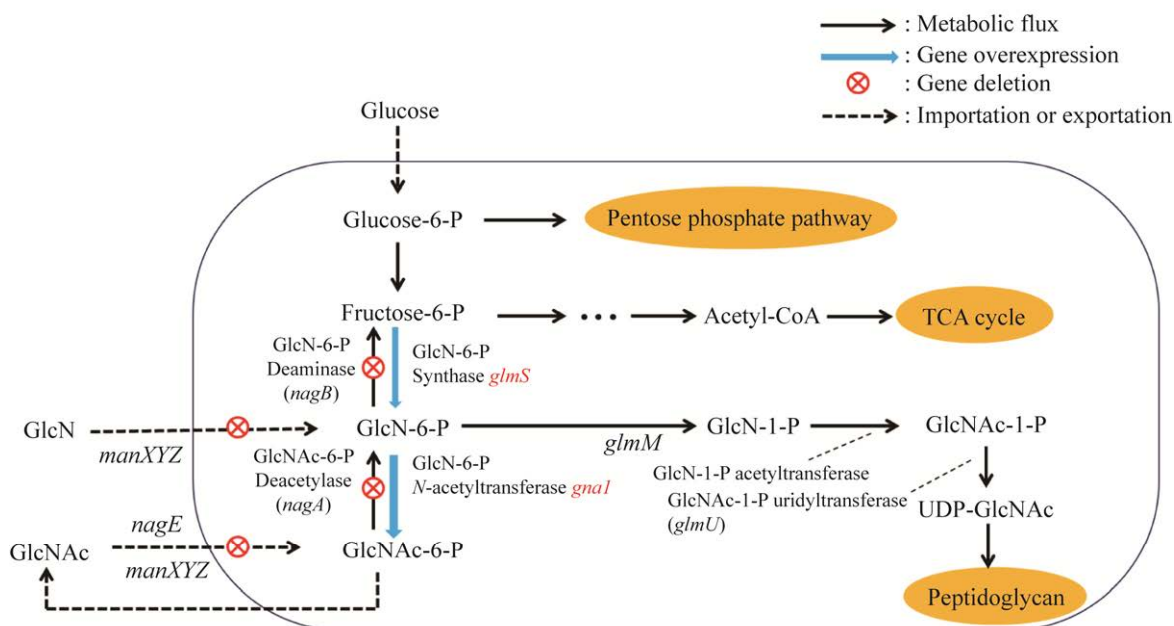


图 1 重组大肠杆菌中 GlcN 和 GlcNAc 代谢流程图<sup>[31]</sup>

Figure 1 Pathway by the GlcN and GlcNAc production in recombinant *Escherichia coli*<sup>[31]</sup>.

表 2 本研究所涉及的菌株和质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	基因型	来源或参考文献
Strain/Plasmid	Genotype	Source or reference
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F' [traD36, proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15]</i>	Invitrogen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C		Invitrogen
<i>E. coli</i> MG1655	F <sup>-</sup> , lambda <sup>-</sup> , rph <sup>-</sup>	Invitrogen
RY-1	<i>E. coli</i> MG1655 contained the expression vector pTrcHisA- <i>glmS-gnaI</i>	This study
RY-2	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>nagB</i> Δ <i>nagA</i>	This study
RY-3	RY-2 contained the expression vector pTrcHisA- <i>glmS-gnaI</i>	This study
RY-4	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>nagB</i> Δ <i>nagA</i> Δ <i>manXYZ</i> Δ <i>nagE</i>	This study
RY-5	RY-4 contained the expression vector pTrcHisA- <i>glmS-gnaI</i>	This study
pTrcHisA	<i>E. coli</i> episomal plasmid, Trc promoter, rrnB T1 terminator, Amp <sup>r</sup> , induced by IPTG	淼灵生物科技有限公司 Miaolingbio. Inc
pCas	<i>repA101</i> (Ts), Kan <sup>r</sup> , <i>P<sub>cas</sub>-cas9</i> , <i>P<sub>arab</sub>-Red</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>P<sub>trc</sub>-sgRNA-pMB1</i>	[32]
pTargetT	<i>pMB1</i> , <i>aadA</i> , sgRNA	[32]
pTrcHisA- <i>glmS-gnaI</i>	pTrcHisA with <i>glmS</i> (from <i>E. coli</i> MG1655) and <i>gnaI</i> (from <i>Saccharomyces</i> S288C)	This study
pTargetT-Δ <i>nagB</i>	Constructed for knocking out <i>nagB</i> gene	This study
pTargetT-Δ <i>nagA</i>	Constructed for knocking out <i>nagA</i> gene	This study
pTargetT-Δ <i>manX</i>	Constructed for knocking out <i>manX</i> gene	This study
pTargetT-Δ <i>manY</i>	Constructed for knocking out <i>manY</i> gene	This study
pTargetT-Δ <i>manZ</i>	Constructed for knocking out <i>manZ</i> gene	This study
pTargetT-Δ <i>nagE</i>	Constructed for knocking out <i>nagE</i> gene	This study

CAAAACAGCCAAGCTTCTATTTTCTAATTG CATT-3')以酿酒酵母基因组 DNA 为模板扩增 *gnaI* 基因(注释号为 NC\_001138.5)。PCR 反应体系(50 μL): Phanta<sup>®</sup> HS Super-Fidelity DNA polymerase (1 U/μL) 1 μL, 上、下游引物(10 nmol/L) 各 2 μL, 模板(100 ng/μL) 1 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 5×SF buffer 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 33 μL。PCR 反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5–7 min。利用无缝克隆酶连接到 *Nco* I 和 *Hind* III 酶线性化的 pTrcHisA 载体上。

### 1.2.2 重组菌的构建与筛选

将野生型大肠杆菌 MG1655 及经过基因编辑的工程菌株 RY-2 和 RY-4 制备成感受态细胞, 然后将测序正确的表达载体 pTrcHisA-*glmS*-

*gnaI* 转化感受态细胞, 利用含氨基青霉素 (100 μg/mL) 的 LB 平板抗性筛选, 37 °C 恒温培养箱静置培养过夜, 获得重组工程菌株。

### 1.2.3 基因敲除

本研究中利用的基因敲除方法为 CRISPR/Cas9, 涉及两种关键质粒 pCas 质粒和 donor 质粒, 其中 donor 质粒由特异性 sgRNA 和同源臂 donor 组成, donor 质粒的构建与表达载体的构建相似, 先将载体线性化, 然后将 PCR 扩增获得的 sgRNA 和上、下游同源臂利用无缝克隆酶连接起来, 即可获得完整 donor 质粒<sup>[32]</sup>。PCR 反应体系(50 μL): Phanta<sup>®</sup> HS Super-Fidelity DNA polymerase (1 U/μL) 1 μL, 上、下游引物 (10 nmol/L) 各 2 μL, 模板(100 ng/μL) 1 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 5×SF buffer 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 33 μL。

PCR 反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5–7 min。具体操作过程如图 2<sup>[32]</sup>所示。

#### 1.2.4 发酵方法

工程菌株平板划线获取单菌落, 挑选单菌落接种至 3 mL LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素), 37 °C、220 r/min 摇床培养 9 h 获得种子液; 将种子液按照 1% 的接种量接种至发酵培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素), 37 °C、220 r/min 摇床培养, 在菌体浓度  $OD_{600}$  达到 0.6 时加入 IPTG 诱导, 继续培养 24 h。所有摇瓶发酵试验均设置 3 个平行组。

#### 1.2.5 产物测定

GlcN 测定采用 Elson-Morgan 法, 取发酵液上清 0.5 mL 于具塞试管, 加入乙酰丙酮试剂 1.0 mL

90 °C 水浴 1 h, 再缓慢加入 96% (体积分数) 乙醇 10 mL; 加入对二甲氨基苯甲醛 (4-dimethylaminobenzaldehyde, DMAB) 试剂 (0.53 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 10 mL 浓盐酸和 10 mL 96%乙醇中) 1.0 mL, 混合均匀后室温静置 1 h, 利用分光光度计测定 530 nm 处吸光值, 并根据标准曲线计算 GlcN 产量。

GlcNAc 测定采用 Reissing 法, 取发酵液上清 0.25 mL, 加入四硼酸钾试液 0.05 mL, 混匀并沸水浴 3 min, 然后加入 1.5 mL PDABA 试剂 [1 g 对二甲氨基苯甲醛溶于 10 mL 含 12.5% 盐酸(体积比)的冰乙酸中, 4 °C 保存, 临用前以 9 倍体积的冰乙酸稀释], 混匀后 37 °C 水浴 20 min, 利用分光光度计测定 585 nm 处吸光值, 并根据标准曲线计算 GlcNAc 产量。

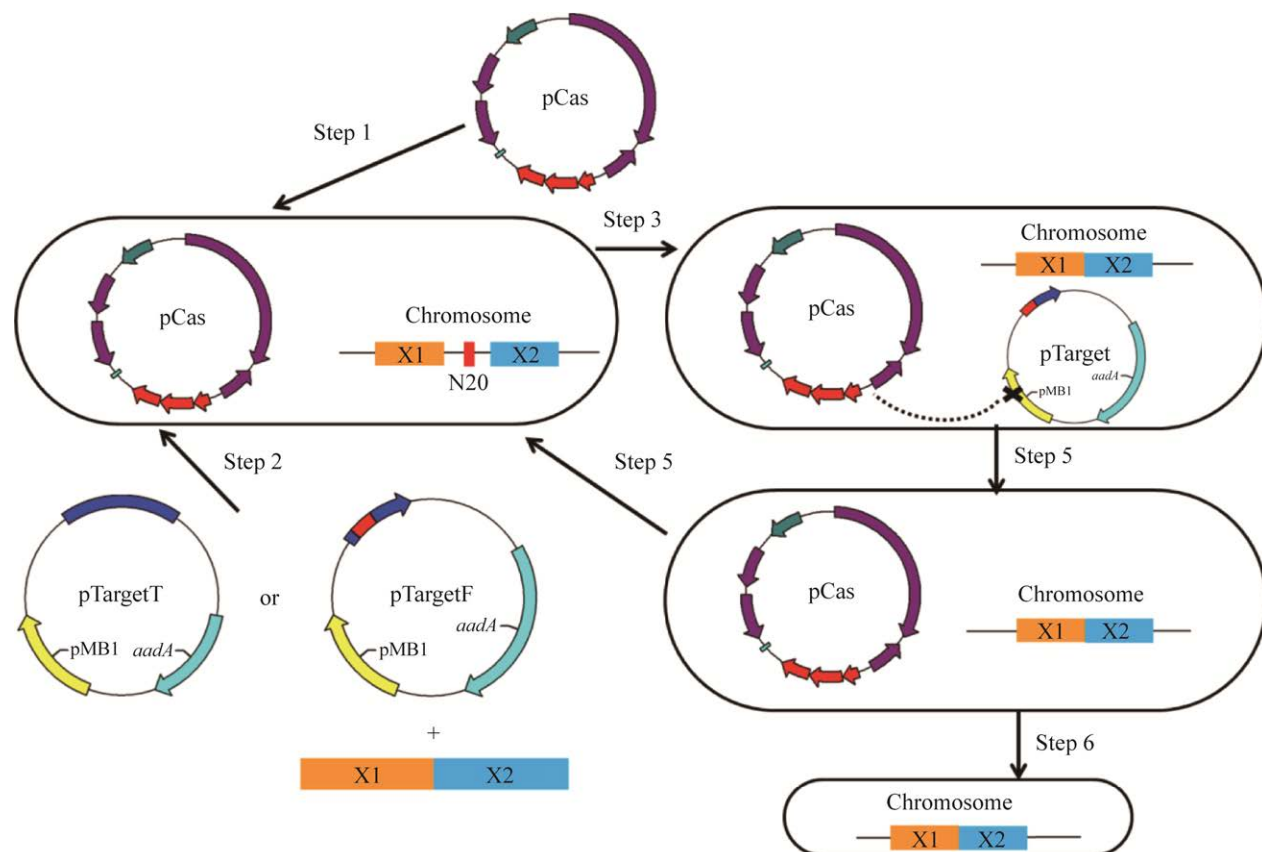


图 2 双质粒系统连续进行基因组编辑的流程图<sup>[32]</sup>

Figure 2 Flow diagram of continual genome editing with the two-plasmid system<sup>[32]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 构建合成 GlcNAc 重组工程菌

为实现 GlcNAc 合成途径在 *E. coli* MG1655 中的构建, 选择了 pTrcHisA 载体, 在 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切位点插入 *glmS* 和 *gnaI* 基因, 菌落 PCR 验证载体构建成功(图 3)后测序获得完全正确的重组表达载体 pTrcHisA-*glmS-gnaI*, 并导入 *E. coli* MG1655 中, 得到重组工程菌株 RY-1。

以 *E. coli* MG1655 为空白对照, 在摇瓶中发酵重组工程菌株 RY-1, 与空白对照相比, 重组工程菌株 RY-1 的细胞积累量明显降低(图 4A), 可能是导入了重组载体之后需要额外消耗底物过表达外源引入的基因, 为宿主的生长增加了负担, 直接表现为影响菌株的细胞积累量。在诱导之后继续培养 24 h, 终止发酵, 取样测定发酵上清中目标产物产量, 空白对照菌株中 GlcN 的产量为 85.67 mg/L, RY-1 的 GlcN 产量为 129.45 mg/L, 相较于对照组提升了 51.1%(图 4B)。RY-1 菌株 GlcNAc 的产量为 77.71 mg/L, 而对照

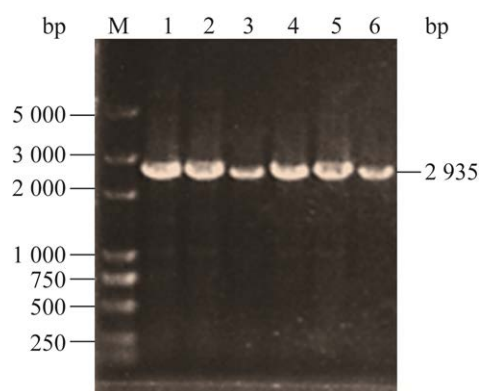


图 3 菌落 PCR 验证质粒 pTrcHisA-*glmS-gnaI*  
M: DNA Marker. 1-6: 工程菌株 RY-1 的不同单克隆菌落

Figure 3 Colony PCR verification of recombinant vectors pTrcHisA-*glmS-gnaI*. M: DNA Marker. 1-6: Different single colonies which *Escherichia coli* MG1655 contained the expression vector pTrcHisA-*glmS-gnaI* (RY-1).

菌株 *E. coli* MG1655 中无 GlcNAc 生成(图 4C)。结果表明, 本试验利用游离表达载体外源引入 *gnaI* 基因的过表达, 在大肠杆菌 MG1655 宿主中成功构建了 N-乙酰氨基葡萄糖的合成路径。

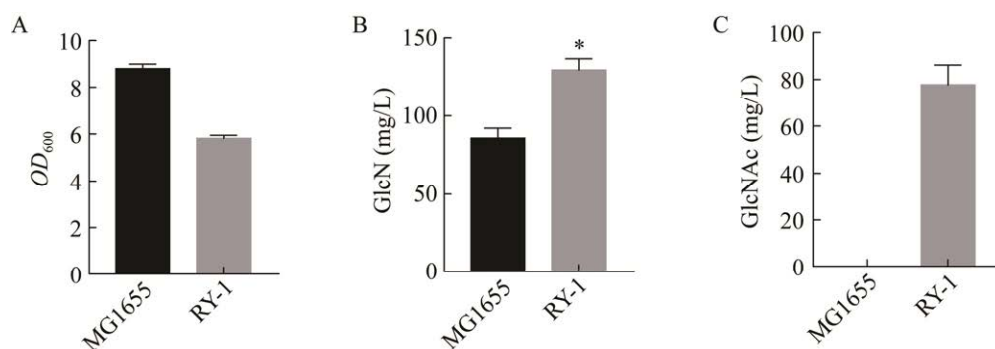


图 4 工程菌株 RY-1 和 *Escherichia coli* MG1655 生长与 GlcN 和 GlcNAc 生产情况比较 A: 对照菌株与 RY-1 的生长情况比较. B: 对照菌株与 RY-1 的 GlcN 产量. C: 对照菌株与 RY-1 的 GlcNAc 产量. \*:  $P < 0.05$

Figure 4 Comparison of GlcN and GlcNAc production in engineering strains RY-1 and wild type *Escherichia coli* MG1655. A: Comparison of growth between *Escherichia coli* MG1655 and RY-1. B: The production of GlcN between *E. coli* MG1655 and RY-1. C: The production of GlcNAc between *E. coli* MG1655 and RY-1. \*:  $P < 0.05$ .



## 2.2 GlcN 和 GlcNAc 的分解代谢(*nagB* 和 *nagA*)及转运途径基因(*manXYZ* 和 *nagE*)的敲除

### 2.2.1 利用 CRISPR/Cas9 敲除分解代谢途径基因 *nagB* 和 *nagA*

大肠杆菌中目标产物 GlcN 和 GlcNAc 的分解代谢途径涉及两个关键基因 *nagB* 和 *nagA*, *nagB* 编码氨基葡萄糖-6-磷酸脱氨酶,这是一种氨基糖分解代谢酶,脱氨氨基葡萄糖-6-磷酸产生果糖 6-磷酸和氨,并被 N-乙酰氨基葡萄糖 6-磷酸变构激活,有研究表明, *nagB* 基因的表达会限制 GlcN 的积累速率<sup>[33]</sup>; *nagA* 编码 N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸脱乙酰酶<sup>[34]</sup>,催化 N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸转化为氨基葡萄糖-6-磷酸,该基因的存在会使得前期研究中构建的 N-乙酰氨基葡萄糖的合成路径重新回到氨基葡萄糖,降低 N-乙酰氨基葡萄糖的积累量。因此,我们设计实验方案将 *nagB* 和 *nagA* 基因进行敲除,在目的基因两端设计引物进行菌落 PCR,通过凝胶电泳中条带大小来判断基因敲除是否成功,当基因被成功敲除时,目标条带会比未敲除时短;进一步设计引物,选择 3 株核酸凝胶

电泳条带正确的单菌落,将菌落 PCR 的原液送到检测公司进行测序,通过测序结果比对,从测序结果中选择测序正确的单菌落进行进一步的基因编辑。根据图 5 可知,存在 *nagB* 及 *nagA* 基因被成功敲除的单菌落,可进一步通过发酵验证基因敲除的效果。

利用 CRISPR/Cas9 将大肠杆菌 MG1655 中的分解代谢途径基因 *nagB* 和 *nagA* 敲除得到工程菌株 RY-2,将表达载体 pTrcHisA-*glmS*-*gnaI* 导入 RY-2 得到工程菌株 RY-3,以 RY-1 为对照,在摇瓶中发酵重组工程菌株 RY-3,2 株不同的工程菌中导入了相同的重组表达载体,基因敲除菌株 RY-3 与未进行基因敲除的菌株 RY-1 相比较生长情况有明显的提升(图 6A),但与图 4A 中对照菌株 *E. coli* MG1655 相比仍未达到野生型菌株的长势,可能由于菌株经代谢工程改造使得其在正常生长之外生产目标产物,增加了代谢路径,虽然经过进一步的基因敲除使其生长得到改善,但仍然无法达到野生型菌株的生长水平。菌株 RY-1 的 GlcN 产量为 129.45 mg/L,菌株 RY-3 的 GlcN 产量为 165.09 mg/L(图 6B),相较于 RY-1 提升了 27.5%; RY-1 菌株 GlcNAc 的产

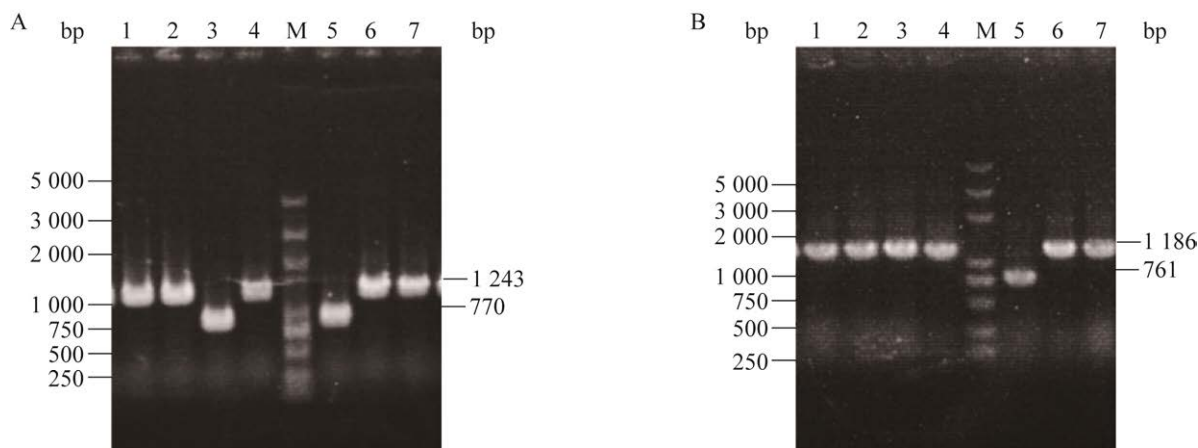


图 5 *nagB* (A)和 *nagA* (B)的敲除验证

Figure 5 The verification of the *nagB* (A) and *nagA* (B) knockout.



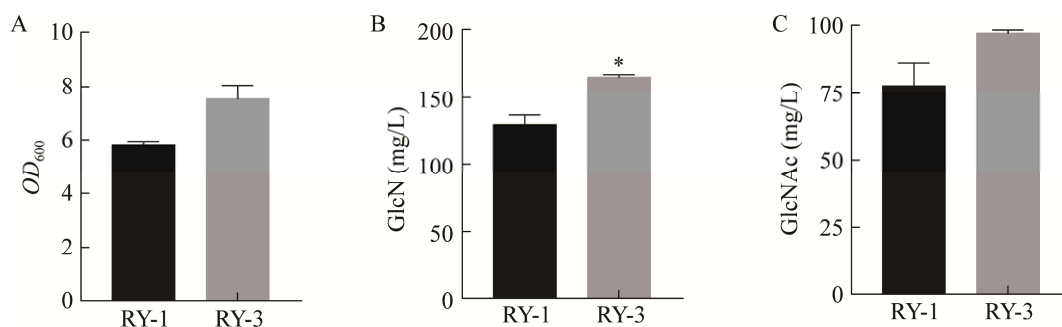


图6 菌株 RY-3 与 RY-1 中 GlcN 和 GlcNAc 生产情况比较 A: RY-3 与 RY-1 的生长情况比较. B: RY-3 与 RY-1 的 GlcN 产量比较. C: RY-3 与 RY-1 的 GlcNAc 产量比较. \*:  $P < 0.05$

Figure 6 GlcN and GlcNAc production in strains RY-3 and RY-1. A: Comparison of growth between RY-3 and RY-1. B: The production of GlcN between RY-3 and RY-1. C: The production of GlcNAc between RY-3 and RY-1. \*:  $P < 0.05$ .

量达到了 77.71 mg/L, RY-3 的 GlcNAc 产量为 97.05 mg/L (图 6C), 相较于 RY-1 提升了 24.9%。与 RY-1 相比较, 分解代谢基因敲除的菌株 RY-3 中 GlcN 和 GlcNAc 的产量均有所提升, 而且 GlcN 的增加更显著(27.5% vs. 24.9%)。综上所述, 分解代谢途径相关基因的敲除对菌体的生长有正向的影响, 目标产物 GlcN 和 GlcNAc 的产量均有所提升。

### 2.2.2 利用 CRISPR/Cas9 敲除转运途径基因 *manXYZ* 和 *nagE*

大肠杆菌中目标产物 GlcN 和 GlcNAc 转运途径涉及的关键基因有 *manXYZ* 和 *nagE*。其中, *manXYZ* 编码甘露糖渗透酶, 该酶是磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)的一个组成部分。有研究表明该酶可以通过糖磷酸化的机制运输甘露糖及相关的己糖<sup>[35]</sup>, 本研究中的目标产物 GlcN 和 GlcNAc 为该途径涉及的相关己糖。*nagE* 编码 N-乙酰氨基葡萄糖途径中 N-乙酰氨基葡萄糖特异性 PTS 酶, 有研究表明<sup>[36]</sup>, 在葡萄糖 PTS 和甘露糖 PTS (葡萄糖的主要运输系统)不可用时, N-乙酰氨基葡萄糖 PTS 是最可能被扩增以允许葡萄糖被利用的 PTS, 说明 N-乙酰氨基葡萄糖 PTS 系统的高效性, 可以推

测, 当发酵液中 GlcNAc 不断积累, 细胞首先会选择其作为碳源用于细胞的生长。因此, 将这些关键基因敲除可以阻断 GlcN 和 GlcNAc 磷酸化重新被细胞利用, 从而在发酵液中大量积累。分子验证结果如图 7 所示, 其中 1、3、

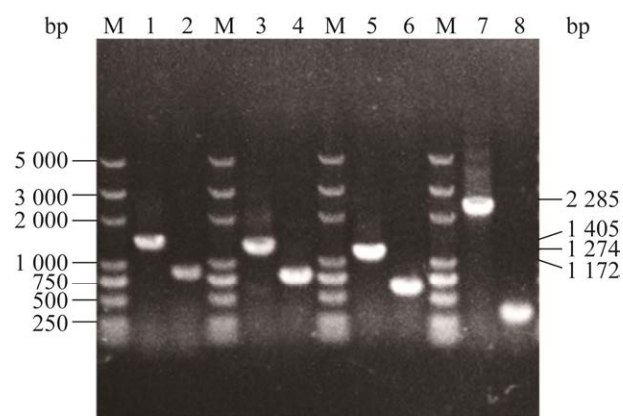


图7 *manXYZ* 和 *nagE* 的敲除验证

Figure 7 The verification of the *manXYZ* and *nagE* knockout. M: DNA Marker; 1, 3, 5 and 7: *Escherichia coli* MG1655 strain PCR with different validation primers; 2: *Escherichia coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manX$  strain; 4: *Escherichia coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manXY$  strain; 6: *Escherichia coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manXYZ$  strain; 8: *Escherichia coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manXYZ \Delta nagE$  (RY-4).

5、7泳道为阴性对照即菌株 *E. coli* MG1655 (各个基因的敲除验证使用验证引物不同), 2、4、6、8泳道分别为 *E. coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manX$ 、*E. coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manXY$ 、*E. coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manXYZ$  和 *E. coli* MG1655  $\Delta nagB \Delta nagA \Delta manXYZ \Delta nagE$  (RY-4) 菌株, 即 *manX*、*manY*、*manZ*、*nagE* 基因敲除成功的单菌落, 进一步通过发酵验证基因敲除的效果。

利用 CRISPR/Cas9 将大肠杆菌 RY-2 中转途径相关基因 *manXYZ* 和 *nagE* 敲除得到工程菌株 RY-4, 将表达载体 pTrcHisA-*glmS-gna1* 导入 RY-4 得到工程菌株 RY-5, 以 RY-3 为对照, 在摇瓶中发酵重组工程菌株 RY-5。结果表明 RY-5 菌株的生长情况与对照 RY-3 菌株相当(图 8A), RY-3 的 GlcN 产量为 165.09 mg/L, RY-5 的 GlcN 产量为 303.35 mg/L (图 8B), 后者较前者提升了 83.7%。RY-3 的 GlcNAc 产量为 97.05 mg/L, RY-5 菌株 GlcNAc 的产量达到了 1756.47 mg/L (图 8C), 相较于对照菌株 RY-3, RY-5 菌株 GlcNAc 的产量提升了 17 倍。同时, 分析 RY-5 中胞外产物 GlcN 和 GlcNAc 的分布情况, 经过重组载体过表达的氨基葡萄糖-6-磷酸-N-乙酰

基转移酶(GNA1 可以将绝大多数 GlcN 催化生成 GlcNAc, 减少了胞内 GlcN 的积累, 一方面解除了 GlcN 对氨基葡萄糖-6-磷酸合酶的反馈抑制; 另一方面减弱了其对细胞生长的抑制。因此在后期的发酵条件优化研究中, 可以简化产物的分析, 通过测定 GlcNAc 的产量来研究发酵条件变化对重组工程菌株生产目标产物的影响。

## 2.3 菌株 RY-5 发酵条件优化

### 2.3.1 装液量优化

以 GlcNAc 产量最高的基因工程菌株 RY-5 为实验菌株进行发酵条件优化。通过间隔 4 h 取样监测生长与生产情况, 如图 9A 所示, RY-5 在发酵过程中  $OD_{600}$  一直呈现递增的趋势, 但自 12 h 后递增的幅度逐渐减小。GlcNAc 的产量变化与生长趋势同步, 在菌株生长最快的前期阶段, 目标产物 GlcNAc 快速积累, 20 h 时 GlcNAc 的胞外积累量达到了最高, 为 2.36 g/L, 继续进行发酵, GlcNAc 的产量不增反降, 推测存在其他途径, 使得 GlcNAc 被消耗利用。结合工程菌株 RY-5 生长情况和 GlcNAc 的产量变化情况, 选择 20 h 作为最优的发酵结束时间点。

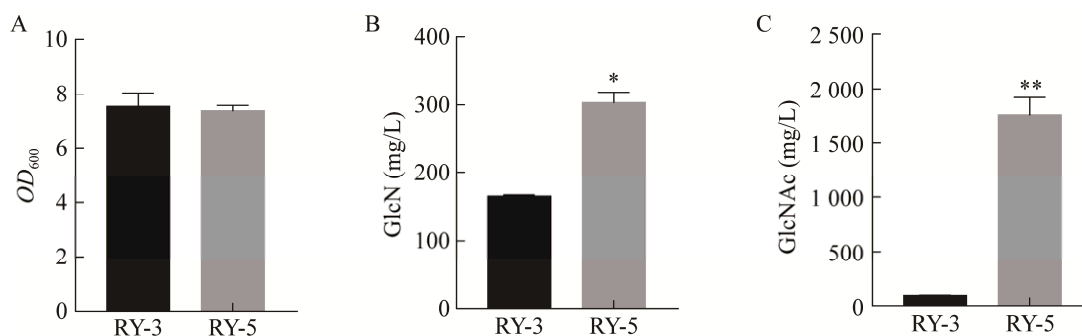


图 8 *manXYZ* 和 *nagE* 基因敲除菌株 RY-5 与 RY-3 发酵情况比较 A: RY-5 与 RY-3 的生长情况比较. B: RY-5 与 RY-3 的 GlcN 产量比较. C: RY-5 与 RY-3 的 GlcNAc 产量比较

Figure 8 GlcN and GlcNAc production in RY-5 strain with *manXYZ* and *nagE* genes knockout. A: Comparison of growth between RY-5 and RY-3. B: The production of GlcN between RY-5 and RY-3. C: The production of GlcNAc between RY-5 and RY-3. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

溶氧(dissolved oxygen, DO)会影响菌体的生长和产物积累,与 DO 直接相关的是发酵液的装液量,因此控制装液量为单因素变量,设置梯度 25、38 和 50 mL,其他发酵条件不变,发酵结束时间为 20 h,250 mL 摇瓶发酵重组工程菌株 RY-5,在不同装液量条件下的工程菌株 RY-5 的生长情况有较大的差异(图 9B),其中在装液量为 25 mL 时细胞生长情况最好,发酵 20 h 时  $OD_{600}$  达到了 17.83,而 50 mL 装液量时  $OD_{600}$  只有 7.33。装液量为 38 mL 与 50 mL 时菌株生长情况相似,无显著差距。在 25 mL 装液量时 GlcNAc 的产量最高为 3.14 g/L(图 9C),与 50 mL 装液量时 GlcNAc 产量 2.34 g/L 相比,产量提升了 34.2%。综合菌株生长情况和 GlcNAc 产量变化情况,在 25 mL 装液量时菌株生长情况较 50 mL 装液量时提高了约 2.4 倍,但 GlcNAc 的产量仅提升了 34.2%,说明在增加了溶氧量之后,其对菌株生长的影响比对 GlcNAc 产量的影响更大一些。因此,综合生长和产物产量确定发酵装液量为 25 mL 发酵液/250 mL 摇瓶。

### 2.3.2 IPTG 添加时间优化

IPTG 对于大肠杆菌具有毒性作用,合适的浓度既可以达到最佳的催化效果,也能减少毒

性伤害,经验证,0.2 mmol/L 为最优 IPTG 诱导浓度。细胞生长是逐渐积累的过程,发酵前期细胞积累量少,IPTG 毒性对菌体影响大,因此其他发酵条件选用前期优化结果,设置 IPTG 添加时间为单因素变量,探索 IPTG 添加时间对发酵结果的影响。图 10A 为 IPTG 添加时间与工程菌株 RY-5 菌体浓度的对应关系。IPTG 的添加时间对于发酵结束时菌体生长情况有较大的影响(图 10B),在 3.25 h 即 3 h 15 min 前添加 IPTG,对应的菌体浓度为  $OD_{600} \leq 1.0$  时,菌株的生长情况较差,这是由于 IPTG 对细胞有毒性,在菌体浓度较低的情况下进行添加时,菌体积累量不足以抵抗 IPTG 的毒性,导致菌体生长较差;在  $OD_{600} > 1.0$  时,即添加时间为 3.5 h 及之后,IPTG 的浓度对于细胞的生长无显著影响,由于细胞积累达到一定量,IPTG 的毒性不足以影响细胞的正常生长。随着工程菌株菌体浓度的不断增大,不同时间添加诱导剂 IPTG, GlcNAc 的产量先增大后减少(图 10C),当在 4.25 h 即 4 h 15 min 时添加 IPTG,产生的 GlcNAc 产量达到了最高,为 7.74 g/L,与 IPTG 添加时间未优化前的 4.86 g/L 相比提升了 59.3%。综上可知, IPTG 的添加存在一个最佳的菌体

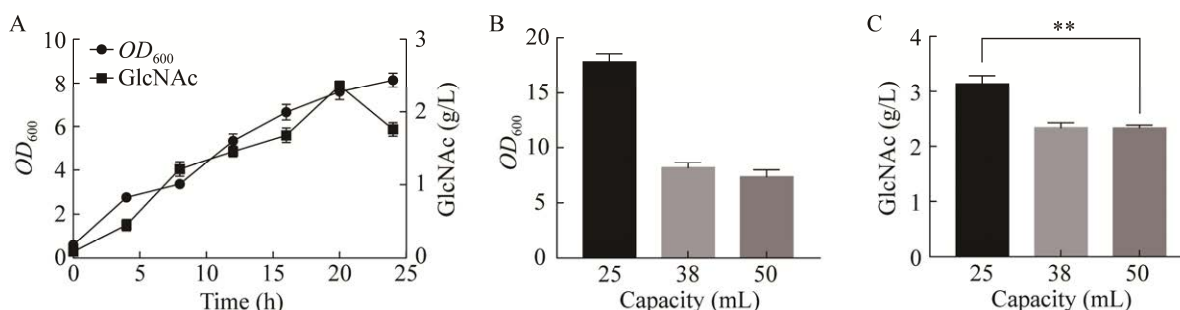


图 9 基因工程菌株 RY-5GlcNAc 的生产情况及发酵装液量比较 A:RY-5 的 GlcNAc 的生产情况. B:不同装液量时 RY-5 生长情况比较. C: 不同装液量时 RY-5 的 GlcNAc 产量比较. \*\*:  $P < 0.01$

Figure 9 GlcNAc production and comparison of capacity in fermentation of genetically engineered strain RY-5. A: GlcNAc production in genetically engineered strain RY-5. B: Comparison of the growth of RY-5 with different capacities. C: Comparison of GlcNAc production of RY-5 with different capacities. \*\*:  $P < 0.01$ .

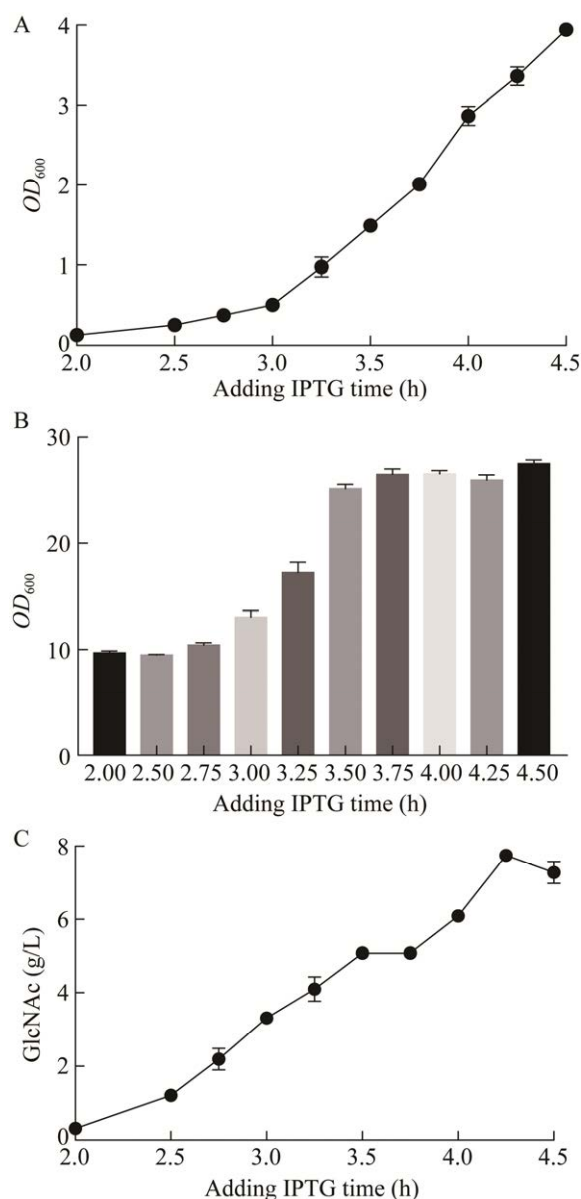


图 10 基因工程菌株 RY-5 发酵中 IPTG 添加时间的影响 A: IPTG 添加时间对应 RY-5 的菌体浓度. B: IPTG 添加时间对应发酵结束时 RY-5 生长的影响. C: 不同 IPTG 添加时间 RY-5 的 GlcNAc 产量

Figure 10 Effects of the IPTG adding time in the genetically engineered strain RY-5. A: The concentration of RY-5 at different IPTG adding times. B: IPTG addition time corresponds to the growth of RY-5 at the end of fermentation. C: GlcNAc production of RY-5 at different IPTG adding times.

浓度, 对数生长期的大肠杆菌长势较快, 因此我们以时间来反映菌体浓度变化, 得到当发酵时间为 4 h 15 min 时, 对应菌体浓度  $OD_{600}$  为 3.36 (3.0–3.5 之间) 时加入 IPTG 进行诱导, 目标产物 GlcNAc 的产量达到了最高, 为 7.74 g/L。

### 3 结论

通过游离载体过表达合成酶基因, 本研究成功在大肠杆菌 MG1655 菌株中构建了 GlcNAc 的合成路径, 产量为 77.77 mg/L。进一步通过敲除分解代谢和转运途径的相关基因, 提升了 GlcNAc 的产量, 达到了 1.76 g/L, 提升了 21.6 倍。最终通过发酵条件优化, 确定最优发酵条件为: 发酵最佳时间 20 h, 装液量 25 mL 发酵液/250 mL 摇瓶, IPTG 浓度 0.2 mmol/L, 初始葡萄糖浓度 10 g/L, IPTG 的添加时间为 4 h 15 min ( $OD_{600}$  为 3.0–3.5), 使得 GlcNAc 的产量达到 7.74 g/L, 与发酵条件优化前相比产量提升了 2.3 倍。本研究应用了一种近年来较新的基因编辑 CRISPR/Cas9 技术, 其具有以下优势: (1) 靶标的特异性仅仅由 crRNA 决定, 不会涉及到蛋白质工程和酶工程; (2) 靶标特异性高, 由 20 bp RNA-DNA 相互作用决定; (3) 靶标存在广泛, 只要存在相邻的 NGG 序列都可以作为靶标。这些优势使得该技术简单、高效且无痕, 可以在大肠杆菌的基因编辑过程得到广泛的应用。同时通过发酵条件优化, 对微生物发酵法生产氨基葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖的工业放大奠定了一定的基础。

### REFERENCES

- [1] HUANG ZY, MAO XZ, LYU XQ, SUN GY, ZHANG HZ, LU W, LIU YF, LI JH, DU GC, LIU L. Engineering diacetylchitobiose deacetylase from *Pyrococcus horikoshii* towards an efficient glucosamine production[J]. Bioresource Technology, 2021, 334: 125241.

- [2] DAI YN, WU YL, LAN HY, NING WF, CHEN F, YAN GY, CAI KC. Structural dynamics and vibrational feature of N-acetyl-D-glucosamine in aqueous solution[J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 259: 119918.
- [3] KIM JY, KIM BY, MOON KH, LEE JH. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for N-acetylglucosamine production[J]. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 2019, 47(1): 78-86.
- [4] PENG JW, WU HS. Kinetic study of glucosamine production using *Aspergillus sydowii* BCRC 31742 under solid-state fermentation[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(20): 4832.
- [5] FANG L, LIN LZ, LYU Y, HUANG ZX, LIN XD, WANG X, CHEN BJ. The mechanism of aerobic exercise combined with glucosamine therapy and circUNK in improving knee osteoarthritis in rabbits[J]. *Life Sciences*, 2021, 275: 119375.
- [6] FERNÁNDEZ-MARTÍN S, GONZÁLEZ-CANTALAPIEDRA A, MUÑOZ F, GARCÍA-GONZÁLEZ M, PERMUY M, LÓPEZ-PEÑA M. Glucosamine and chondroitin sulfate: is there any scientific evidence for their effectiveness as disease-modifying drugs in knee osteoarthritis preclinical studies? -A systematic review from 2000 to 2021[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2021, 11(6): 1608.
- [7] TRAIN A, MOE S, ALLAN GM. Are glucosamine and chondroitin natural remedies for osteoarthritis?[J]. *Canadian Family Physician Medecin de Famille Canadien*, 2021, 67(2): 111.
- [8] WANG SJ, WANG YH, HUANG LC. The effect of oral low molecular weight liquid hyaluronic acid combination with glucosamine and chondroitin on knee osteoarthritis patients with mild knee pain: an 8-week randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Medicine*, 2021, 100(5): e24252.
- [9] LAMBERTINI E, PENOLAZZI L, PANDOLFI A, MANDATORI D, SOLLAZZO V, PIVA R. Human osteoclasts/osteoblasts 3D dynamic co-culture system to study the beneficial effects of glucosamine on bone microenvironment[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 47(4): 57.
- [10] MATTIUZZO E, FAGGIAN A, VENERANDO R, BENETTI A, BELLUZZI E, ABATANGELO G, RUGGIERI P, BRUN P. *In vitro* effects of low doses of  $\beta$ -caryophyllene, ascorbic acid and D-glucosamine on human chondrocyte viability and inflammation[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(3): 286.
- [11] MA H, LI X, SUN D, ZHOU T, LEY SH, GUSTAT J, HEIANZA Y, QI L. Association of habitual glucosamine use with risk of cardiovascular disease: prospective study in UK Biobank[J]. *BMJ (Clinical Research Ed)*, 2019, 365: 11628.
- [12] VERONESE N, DEMURTAS J, SMITH L, REGINSTER JY, BRUYÈRE O, BEAUDART C, HONVO G, MAGGI S. Glucosamine sulphate: an umbrella review of health outcomes[J]. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2020, 12: 1759720X20975927.
- [13] FENG KM, CHIEN WC, CHEN JT, CHEN YH, CHUNG CH, SUN CA, CHEN CL. The impact of glucosamine on age-related macular degeneration in patients: a nationwide, population-based cohort study[J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0251925.
- [14] WEN Z. Application and research progress of glucosamine[J]. *AIP Conference Proceedings*, 2019, 2110(1): 020050.
- [15] 秦志杰, 岳秋林, 刘新利. 产N-乙酰氨基葡萄糖的工程菌构建、发酵及应用研究进展[J]. *中国酿造*, 2018, 37(6): 6-9.
- QIN ZJ, YUE QL, LIU XL. Research progress on construction, fermentation and application of engineered bacteria for N-acetylglucosamine production[J]. *China Brewing*, 2018, 37(6): 6-9 (in Chinese).
- [16] QIN Z, ZHAO LM. The history of Chito/Chitin oligosaccharides and its monomer[M]// *Oligosaccharides of Chitin and Chitosa*. Singapore: Springer Singapore, 2019: 3-14.
- [17] KNAPIK JJ, POPE R, HOEDEBECKE SS, SCHRAM B, ORR R, LIEBERMAN HR. Effects of oral glucosamine sulfate on osteoarthritis-related pain and joint-space changes: systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Special Operations Medicine: a Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals*, 2018, 18(4): 139-147.
- [18] MTEWA AG, ANNU A, WEISHEIT A, TOLO CU, OGWANG PE. Glucosamine and chondroitin in osteoarthritis treatment[M]// *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders*. Amsterdam: Elsevier, 2021: 373-380.
- [19] HAMED I, ÖZOGUL F, REGENSTEIN JM. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitoooligosaccharides): a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 48: 40-50.
- [20] MAO XZ, GUO N, SUN J, XUE CH. Comprehensive



- utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: a review[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 143: 814-823.
- [21] LOPATA AL, KLEINE-TEBBE J, KAMATH SD. Allergens and molecular diagnostics of shellfish allergy[J]. *Allergo Journal International*, 2016, 25(7): 210-218.
- [22] MENG DD, WEI XL, BAI X, ZHOU W, YOU C. Artificial *in vitro* synthetic enzymatic biosystem for the one-pot sustainable biomanufacturing of glucosamine from starch and inorganic ammonia[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(23): 13809-13819.
- [23] LIEBMINGER E, VEIT C, PABST M, BATOUX M, ZIPFEL C, ALTMANN F, MACH L, STRASSER R. Beta-N-acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 are responsible for the formation of paucimannosidic N-glycans in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(12): 10793-10802.
- [24] LI PW, LI X, WEN Z, DONG RZ, LI K, FAN H, WANG RM, WANG JQ, LV MC. Enhancement of production of D-glucosamine in *Escherichia coli* by blocking three pathways involved in the consumption of GlcN and GlcNAc[J]. *Molecular Biotechnology*, 2020, 62(8): 387-399.
- [25] CHYSIRICHOTE T, MAPISANSUP W, AROONSONG S. Estimation of glucosamine in biomass of *Trichoderma reesei* cultivated on lignocellulosic substrates[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(4): 305-314.
- [26] LI CN, JIANG S, DU C, ZHOU YL, JIANG SJ, ZHANG GM. Expression and characterization of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Bacillus coagulans* DSM1 for N-acetyl- $\beta$ -D glucosamine production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(1): 218-227.
- [27] 马文龙, 刘延峰, 吕雪芹, 李江华, 刘龙, 堵国成. 调控乙酰 CoA 合成酶表达促进乙酸利用及 GlcNAc 合成[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(5): 16-22.
- MA WL, LIU YF, LYU XQ, LI JH, LIU L, DU GC. Modulation of acetyl-CoA synthetase expression promoted acetate utilization and N-acetylglucosamine production in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(5): 16-22 (in Chinese).
- [28] MA Q, SUN QW, TAN M, XIA L, ZHANG Y, YANG MY, ZHUO MY, ZHAO KX, LI YJ, XU QY, CHEN N, XIE XX. Highly efficient production of N-acetylglucosamine in *Escherichia coli* by appropriate catabolic division of labor in the utilization of mixed glycerol/glucose carbon sources[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(21): 5966-5975.
- [29] CHEN X, LIU L, LI JH, DU GC, CHEN J. Improved glucosamine and N-acetylglucosamine production by an engineered *Escherichia coli* via step-wise regulation of dissolved oxygen level[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 534-538.
- [30] LI PW, LI K, LI X, ZHAO F, WANG RM, WANG JQ. Improving enzyme activity of glucosamine-6-phosphate synthase by semi-rational design strategy and computer analysis[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(11): 2319-2332.
- [31] DENG MD, SEVERSON DK, GRUND AD, WASSINK SL, BURLINGAME RP, BERRY A, RUNNING JA, KUNESH CA, SONG LS, JERRELL TA, ROSSON RA. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for industrial production of glucosamine and N-acetylglucosamine[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(3): 201-214.
- [32] JIANG Y, CHEN B, DUAN CL, SUN BB, YANG JJ, YANG S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [33] ALVAREZ-AÑORVE LI, BUSTOS-JAIMES I, CALCAGNO ML, PLUMBRIDGE J. Allosteric regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase (NagB) and growth of *Escherichia coli* on glucosamine[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(20): 6401-6407.
- [34] FERREIRA FM, MENDOZA-HERNANDEZ G, CASTAÑEDA-BUENO M, APARICIO R, FISCHER H, CALCAGNO ML, OLIVA G. Structural analysis of N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase apoenzyme from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 359(2): 308-321.
- [35] ERNI B, ZANOLARI B, GRAFF P, KOCHER HP. Mannose permease of *Escherichia coli*. Domain structure and function of the phosphorylating subunit[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(31): 18733-18741.
- [36] CRIGLER J, BANNERMAN-AKWEI L, COLE AE, EITEMAN MA, ALTMAN E. Glucose can be transported and utilized in *Escherichia coli* by an altered or overproduced N-acetylglucosamine phosphotransferase system (PTS)[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2018, 164(2): 163-172.