乙酰氨基葡萄糖合成关键酶氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶的筛选及酶学性质分析

徐小芳[1,2]，刘延峰[1,2]，李江华[*1,2]，刘 龙[1,2]，堵国成[1,2]，陈 坚[1,2]
（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要： N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine，GlcNAc)是氨基葡萄糖(Glucosamine，GlcN)的衍生物，在保健食品和医药领域具有广泛应用。氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶(glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase，GNA)是N-乙酰氨基葡萄糖合成途径中的关键酶。本研究在前期构建的产GlcNAc枯草芽孢杆菌(*Bacillus. subtilis*，*B. subtilis*)工程菌的基础上，通过过量表达不同来源的GNA，筛选出来源于秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰基转移酶(Cegna1)最适于加强GlcNAc合成途径。在*B. subtilis*工程菌中表达Cegna1，摇瓶水平发酵GlcNAc产量达到7.31 g/L，与过量表达来源于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*，*S. cerevisiae*)的GNA的对照菌株相比，GlcNAc的产量提高了24.51%。在3 L发酵罐中进行分批发酵，GlcNAc产量达到24.23 g/L，相较于对照菌株GlcNAc的产量提高了24.69%。进一步研究发现重组Cegna1对GlcN-6P和乙酰辅酶A(Ac-CoA)有着较高的亲和力和催化效率，最后对重组Cegna1的基本酶学性质进行了考察，发现底物GlcN-6P对重组Cegna1的抑制作用明显，下一步可采用定向进化策略改造Cegna1，解除底物GlcN-6P对重组Cegna1的抑制作用。本研究结果为应用定向进化策略改造GNA的实现提供了理论依据。

关键词： 重组氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶；N-乙酰氨基葡萄糖；枯草芽孢杆菌
中图分类号： Q 815　　**文章编号：**1673-1689(2019)12-0073-12　　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.011

Screening of Glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase for N-acetylglucosamine Production and Enzyme Kinetics Analysis

XU Xiaofang[1,2]，*LIU Yanfeng*[1,2]，*LI Jianghua*[1,2]，*LIU Long*[1,2]，*DU Guocheng*[1,2]，*CHEN Jian*[1,2]
（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；
2. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract： N-acetylglucosamine(GlcNAc)，derivative of glucosamine(glucosamine，GlcN)，is widely used in the field of health food and pharmaceutical. Glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase

收稿日期： 2016-02-18
基金项目： 江苏省产学研联合创新资金—前瞻性联合研究项目(BY2012054)。
* **通信作者：** 李江华(1966—)，男，江西九江人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶技术发酵过程优化与控制方面的研究。
E-mail: lijianghua@jiangnan.edu.cn
引用本文： 徐小芳，刘延峰，李江华，等.乙酰氨基葡萄糖合成关键酶氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶的筛选及酶学性质分析[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(12)：73-84.

(GNA) is one of the crucial enzymes in the GlcNAc synthesis pathway. On the basis of recombinant GlcNAc-producing *Bacillus subtilis*, we overexpressed glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase, originates from *Caenorhabditis elegans* (Cegna1), in the engineered *B. subtilis*, which enhanced GlcNAc titer to 7.31 g/L. Compared with the engineered *B. subtilis* with overexpression of glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase derived from *Saccharomyces cerevisiae*, the GlcNAc yield of the recombinant *B. subtilis* with Cegna1 increased by 24.51%. By fed-batch fermentation in 3 L bioreactor, GlcNAc titer further increased to 24.23 g/L, which is 24.69% higher than the reference strain. Further investigation results showed that the recombinant Cegna1 has higher affinity and catalytic efficiency for GlcN-6P and Ac-CoA. Finally, it is found that the substrate GlcN-6P has obvious inhibition on the the recombinant Cegna1. Identified substrate inhibition of Cegna1 provides future directions for improvement of GlcNAc production by directed evolution of Cegna1 for alleviating substrate inhibition.

Keywords: Glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase, N-acetylglucosamin, *Bacillus subtilis*

N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetylglucosamine, GlcNAc)是氨基葡萄糖(Glucosamine, GlcN)的衍生物,具有重要的生理功能,在食品、医药及化妆品领域具有广泛应用[1],如可以提高关节抗炎活性和蛋白活性[2];食品方面的添加剂和抗氧化剂[3];可作为天然的保鲜剂和抗菌剂广泛应用于食品保藏[4];最近研究表明,GlcNAc 能够提高内质网蛋白质内稳态,从而起到延长细胞寿命的作用[5]。

GlcNAc 的生产方法可分为 3 种:甲壳素水解法、生物转化法和微生物发酵法 [6-8]。发酵法生产 GlcNAc 利用的生产菌株主要有真菌和大肠杆菌(*Escherichia. Coli*, *E. coli*)[9-10]。目前本实验室采用枯草芽孢杆菌(*Bacillus. subtilis*, *B. subtilis*)发酵生产 GlcNAc[8,11], *B. subtilis* 已被广泛应用于发酵工业,其产品被认定为是食品安全级[12],且遗传背景清晰、基因操作技术成熟、发酵工艺成熟并且不易被噬菌体污染,是生产 GlcNAc 的理想宿主[13]。

氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶(glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase 1, Gna1, EC 2.3.1.4)作为合成 GlcNAc 代谢途径上的关键酶是 GCN5 相关的 GNAT 蛋白质超家族中的一员[14],是一组参与相关天冬酰胺连接型(N-)聚糖合成与加工的重要酶类,能够催化生成 GlcNAc-6P,将 Acetyl-CoA 中的乙酰基转移到 GlcN-6P 的氨基上 [15-16], 生成的 GlcNAc-6P 进一步在胞内转化为 GlcNAc 并被转移到胞外。目前 GNA 的三级结构在人类、酵母、人类、秀丽隐杆线虫、烟曲霉及布氏椎虫中有所报道[16-21]。许多物种包括白假丝酵母、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)、布氏椎虫、小鼠等 GNA 缺失后,均引起致死表型[15,20-22]。然而前期研究 GNA 表达相关内容仅集中于调控不同表达元件优化 GNA 表达量,因此,找到一种能够提高目标产物 GlcNAc 产量氨基葡萄糖乙酰转移酶并且对其酶学性质进行系统研究对提高发酵法生产 GlcNAc 具有重要意义。

本研究首先异源表达 7 种不同来源的 GNA,筛选出秀丽隐杆线虫来源的 Cegna1 能够更有效的积累乙酰氨基葡萄糖。其次,考察了 7 株重组酶的动力学参数米氏常数 K_m 与 K_{cat}/K_m 发现重组 Cegna1 相比较其他 6 种重组酶均对 GlcN-6P 和 Ac-CoA 有较高的亲和力和催化效率。最后发现底物 GlcN-6P 对重组 Cegna1 的抑制作用明显,下一步可采用定向进化策略改造 Cegna1,解除底物 GlcN-6P 对重组 Cegna1 的抑制作用。本研究结果筛选到的 Cegna1 可用于 GlcNAc 合成途径的优化,同时为应用定向进化策略改造 GNA 提供理论依据和指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 本文所用的菌株、质粒及引物见表 1 和表 2, 出发菌株为重组 BSGN6-PxylA-glmS,为本实验室所改造[11],出发菌株在野生型菌株 *B. subtilis* 168 基础上进行改造得到。质粒 pP43NMK 由张晓舟博士惠赠 (美国弗吉尼亚理工大学,生物系统工程学院)。表达氨基葡萄糖乙酰化酶 7 种不同来源基因 *Cegna1* (*Caenorhabditis elegans*,

表 1　本论文中使用的菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this chapter

名称	特性	来源
E.. coli JM109	克隆载体	本实验室保藏
BSGN6-PxylA-glmS	△*nagP*△*gamP*△*gamA* △*nagA* △*nagB*△*ldh*△*pta*::*lox72*	本实验室保藏
CeBSGN	BSGN6-PxylA-glmS 衍生菌株，表达来源于 *Caenorhabditis elegans* 的 *CeGNA1* 基因	本实验构建
TbBSGN	BSGN6-PxylA-glmS 衍生菌株，表达来源于 *Trypanosoma brucei* 的 *TbGNA1* 基因	本实验构建
ScBSGN	BSGN6-PxylA-glmS 衍生菌株，表达来源于 *Saccharomyces cerevisiae* S288c 的 *ScGNA1* 基因	本实验构建
CaBSGN	BSGN6-PxylA-glmS 衍生菌株，表达来源于 *Candida albicans* SC5314 的 *CaGNA1* 基因	本实验构建
AfBSGN	BSGN6-PxylA-glmS 衍生菌株，表达来源于 *Aspergillus fumigatus* Af293 的 *AfGNA1* 基因	本实验构建
DfBSGN	BSGN6-PxylA-glmS 衍生菌株，表达来源于 *Dictyostelium fasciculatum* 的 *DfGNA1* 基因	本实验构建
OsBSGN	BSGN6-PxylA-glmS 衍生菌株，表达来源于 *Oryza sativa* 的 *OsGNA1* 基因	本实验构建
pP43NMK	Amp^r，Km^r，*E.coli-B.subtilis* 穿梭质粒	张晓舟博士惠赠

表 2　本研究所使用的引物

Table 2　Oligonucleotides used in this study

引物	引物序列(5′→3′)
TBGna1-F	GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCATCACCACCACACAGACATCGTGGACCTTGAGC
TBGna1-R	CCCAAGCTTTTACAGATCTAAGCGCATTTGCCGT
ScGna1-F	GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCACAGCTTACCCGATGGATTTTATA
ScGna1-R	CCCAAGCTTCTATTTTCTAATTTGCATTTCCACG
CeGna1-F	GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCACAGCCATATCTTCGACGCATCTG
CeGna1-R	CCCAAGCTTTTAAAAGCGCTGGGTCATAAAATTA
CaGna1-F	GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCACCTGCTGCCACAAGGTTATACAT
CaGna1-R	CCCAAGCTTTTAAAAGCGGCATACCATTTCTACG
AfGna1-F	GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCACACAAACGCAACAATCGCACCAACAA
AfGna1-R	CCCAAGCTTTTAATAATAGTGCGCCATTTCCAGG
DfGna1-F	GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCACGAGTCTAACGAATGTAGTAGCA
DfGna1-R	CCCAAGCTTTTATAATTTCGGCTGAGGCGGGAGA
OsGna1-F	GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGCACCACCACCACCACCACGAGCAGCCTCTTCCTACAGCTG
OsGna1-R	CCCAAGCTTGCCGTCCATGCACGGGGCAATCACT

NCBI GenBank:AB017628.1)、*Tbgna1*（*Trypanosoma brucei*，NCBI GenBank: FR715998.1）、*Scgna1*（*S. cerevisiae*，NCBI GenBank: NM_001179949.1）、*Cagna1*（*Candida albicans*，NCBI GenBank:XM_715990.1）、*Afgna1*(*Aspergillusfumigatus* Af293，NCBI GenBank：XM_742738.1）、*Dfgna1*（*Dictyostelium fasciculatum*，NCBI GenBank：XM_004367264.1）、*Osgna1*（*Oryza sativa*，NCBI GenBank：AY772189.1）进行枯草密码子优化后借由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，见表 3。

表 3　氨基葡萄糖乙酰化酶 7 种不同来源基因经枯草密码子优化优化后序列总表

Table 3　Sequence table of glucosamine acetylase with 7 different source genes after codon optimization

序号	不同来源基因	经枯草密码子优化优化后序列
1	*Tbgna*1 基因 *B. subtilis* 密码子优化后序列	ATGACAGACATCGTGGACCTTGAGCTTAGAGTACTGGAGGAGAGTGACTTGTCATCACATCTGGAGCTGCTG GGACATTTGACTGAAGCACCTCCATTATCAGGAGTAGAACTTGCAAATATCGCGGATATGCGGAGAAGAGCT GGAATTGTGACCAAGGTGTTTTGCCACCAGCCTACAGGAAGGATCGTTGGTTCTGCATCTTTGATGATTCAAC CGAAATTCACGCGTGGTGGTCGAGCTGTTGGGCATATTGAAGATGTCGTTGTCGATCCGTCGTATCGTGGCGC CGGGTTAGGCAAAGCGCTTATAATGGATCTTTGTGAAATTTCCCGCAGCAAAGGCTGCTACAAAGTCATTTTA GATTCCAGCGAAAAGAGCCTCCCGTTTTATGAAAAACTCGGCTTTCGCGCCCACGAACGGCAAATGCGCTTA GATCTGTAA
2	*Scgna*1 基因 *B. subtilis* 密码子优化后序列	ATGAGCTTACCCGATGGATTTTATATAAGGCGAATGGAAGAGGGGGATTTGGAACAGGTCACTGAGACGCT AAAGGTTTTGACCACCGTGGGCACTATTACCCCCGAATCCTTCAGCAAACTCATAAAATACTGGAATGAAGC CACAGTATGGAATGATAACGAAGATAAAAAAATAATGCAATATAACCCCATGGTGATTGTGGACAAGCGCA CCGAGACGGTTGCCGCTACGGGGAATATCATCATCGAAAGAAAGATCATTCATGAACTGGGGCTATGTGGC CACATCGAGGACATTGCAGTAAACTCCAAGTATCAGGGCCAAGGTTTGGGCAAGCTCTTGATTGATCAATTG GTAACTATCGGCTTTGACTACGGTTGTTATAAGATTATTTTAGATTGCGATGAGAAAAATGTCAAATTCTATG AAAAATGTGGGTTTAGCAACGCAGGCGTGGAAATGCAAATTAGAAAATAG
3	*Cegna*1 基因 *B. subtilis* 密码子优化后序列	ATGAGCCATATCTTCGACGCATCTGTACTGGCTCCACATATTCCTAGTAACCTTCCTGATAATTTCAAGGTGA GACCACTGGCAAAGGATGATTTTTCGAAGGGATATGTCGACCTGCTGTCACAATTGACGTCAGTTGGAAACC TTGACCAAGAAGCATTTGAGAAACGATTTGAGGCGATGAGAACAAGCGTACCGAATTATCACATCGTAGTA ATTGAGGATTCCAACAGCCAGAAAGTGGTGGCGTCTGCTAGTTTGGTTGTTGAAATGAAATTCATTCATGGG GCCGGATCAAGGGGTCGTGTTGAAGATGTTGTCGTCGATACAGAAATGCGCCGGCAAAAATTAGGTGCCGT GCTTTTAAAAACTTTGGTGTCACTTGGCAAATCTTTAGGCGTCTACAAAATAAGCCTCGAATGCGTCCCGGA ATTACTCCCGTTCTATTCCCAATTTGGCTTTCAGGATGACTGTAATTTTATGACCCAGCGCTTTTAA
4	*Cagna*1 基因 *B. subtilis* 密码子优化后序列	ATGCTGCTGCCACAAGGTTATACATTCAGAAAACTGAAACTGACGGATTACGACAACCAATACCTCGAAAC ACTTAAGGTGTTGACAACAGTGGGTGAAATTAGTAAAGAGGAGTTCACTGAGTTGTATAATCACTGGAGCT CGCTTCCTTCTATCTATCATCCGTATGTGATTACCAACGCATCAGGAATTGTGGTAGCTACGGGAATGCTTTT TGTTGAAAAGAAACTCATCCATGAGTGTGGAAAAGTCGGACATATCGAAGATATATCCGTCGCCAAATCAG AACAGGGCAAGAAACTTGGGTATTACTTAGTTACGTCTTTAACCAAAGTCGCGCAGGAAAATGATTGTTACA AAGTTATTTTAGACTGCAGCCCGGAAAATGTTGGCTTTTATGAAAAATGCGGGTATAAGGATGGCGGCGTAG AAATGGTATGCCGCTTTTAA
5	*Afgna*1 基因 *B. subtilis* 密码子优化后序列	GGTACCATGACAAACGCAACAATCGCACCAACAACAACGGCAGCACCAGTAACAAAATCCGTAGATGCTCC TACTGCGGATGAAAACACTCCTTTGTTCAGCCCGAGTCTTATCTCTCCGGATGTACTTGCCGTTCTTCCGGCT GATTATACCATTAGGCCGCTTTGTAGATCAGATTACAAGAGAGGATACTTGGATGTTCTCAGAGTGTTGACG ACCGTTGGAGATATCAATGAGGAGCAGTGGAATTCACGATATGAGTGGATCCGTGCTCGTTCTGATGAATAT TATCTGCTCGTCGTGTGTGACGGAGAAGGACGGATTGTTGGAACGGGTAGCTTAGTTGTCGAACGCAAGTTT ATCCATAGCTTAGGTATGGTGGGTCATATTGAGGACATTGCTGTCGAAAAAGGCCAGCAAGGGAAAAAGTT AGGCTTACGCATTATTCAAGCCCTGGACTATGTGGCCGAAAAAGTCGGCTGCTACAAAACGATACTGGACT GCTCGGAAGCGAATGAAGGCTTTTACATAAAATGCGGGTTTAAACGGGCGGGCCTGGAAATGGCGCACTAT TATTAA

续表 3

序号	不同来源基因	经桔草密码子优化优化后序列
6	*Dfgna1* 基因 *B. subtilis* 密码子优化后序列	ATGGAGTCTAACGAATGTAGTAGCATCTCAAATAACAACATCATCTGCTCTAATAACAATAATAACGGACTG TTCCCACTGTCAATGATGAACACGACGAGGTATTACAACGACGGTGACATTCAATTCCGTCCTTTAGAAATTG ATGATTACGACAAGGGATATTCAGCACTTCTGTGCCAATTGACAGAAGCTAAGTTTACAAAATCGCAATACA TTGAGAGATACAATCAGATGAAGAAAGAGCTGGATAATTATTATGTAGTGGTGGTCGAAGACAAGAGCAAA TCCAAAATTATTGGTACAGGAACCCTGATGGTTGAGAAAAAGTTTATCCGGGGATGTGCATTATGTGGGCAT ATTGAAGATATTGTCGTTGATAGCACTTATCGCGGGAAAAATCTTGGCCTTAAAATGATAGAACAATTGAAA TATATCGGCACCCTTGTAGGCTGTTACAAACTCATATTGGATTGCGATGAAAATAATGTGAAATTTTATGAAA AATGCGGCTTTGTTAAGAAACAGGCCATGATGGCGTTATATCTCCCGCCTCAGCCGAAATTATAA
7	*Osgna1* 基因 *B. subtilis* 密码子优化后序列	ATGGAGCAGCCTCTTCCTACAGCTGCGGCAGAAGCAGCAGCGGCAGGAGGAGATGGAGAAGCATATAGGA TCAGACCATTAGAACTTGCAGATATCTCCAGGGGATTCCTGGGACTTCTCAATCAACTCAGCCCGAGTCCAC CTCTGACAGAAGAGGCGTTCAGAGCAAGATTTGAGGAGCTGGCTGCTCTGGGAGCTGATCATCTGGTATTGG TAGCTGAGGATGCGGCCACAGGTAGATTGGCCGCCGCTGGTGCCGTATTGGTTGAACGAAAATTCATTCGTC GATGTGGTCGTGTTGGTCATGTTGAAGACGTTGTGGTTGACGCGGCAGCCCGTGGCCGGGGCTTAGGGGAAC GCGTCGTGCGCCGGTTAGTGGAACACGCGCGGGGGCGCGGGTGTTACAAAGTCATCATCAACTGTACTCCGG AATTAACCGGCTTTTATGCGAAATGCGGCTTTGTCGAAAAGAACGTGCAAATGGGCTTATATTTTTGAATTTT GATATAAGTCTCAAGCTCTTGGATTTCGCTTCCGACCACGTGCTGCACGTAGCTTATTCGCAATTTTATGTCA GTGATTGCCCCGTGCATGGACGGC

1.1.2 试剂　常用试剂及试剂盒，均购于 TaKaRa 生物工程有限公司；玉米浆和酵母粉，分别购自山东西王食品和上海一品鲜生物科技有限公司。基因与引物合成、DNA 测序等，由上海生工生物工程有限公司完成。

1.1.3 培养基与培养条件　发酵培养基成分为(g/L)：玉米浆干粉 20，酵母粉 20，$K_2HPO4·3H_2O$ 12.5，KH_2PO_4 2.5，$CaCO_3$ 5，微量元素 15 ml/L；pH7.5；微量元素溶液按 g/L 计含有：$MnSO_4·5H_2O$ 1.0，$CoCl_2·6H_2O$ 0.4，$NaMoO_4·2H_2O$ 0.2，$ZnSO_4·7H_2O$ 0.2，$AlCl_3·6H_2O$ 0.1，$CuCl_2·H_2O$ 0.1，H_3BO_4 0.05，含 5 mol/L HCl。

培养条件：将 37 ℃、200 r/min 下培养 12 h 的种子以 5%的接种体积分数转入发酵培养基，于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 30 h。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株构建　分别使用相对引物扩增由上海生工生物工程有限公司合成的目的基因(如使用引物 *CeGna1*-F 和 *CeGna1*-R 扩增出 *CeGna1* 基因)获得相应的目的片段，分别插入 pP43NMK 质粒中，获得重组质粒。重组质粒在 *Escherichia. coli* JM109 中扩增后转入目的菌株 BSGN6-PxylA-glmS，获得重组菌株。通过菌落 PCR 验证筛选出阳性菌株，挑选的阳性菌株在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 ℃培养过夜，最后提取质粒进行酶切验证及测序鉴定。

1.2.2 3 L 发酵罐补料分批发酵　将种子液以体积分数 4%的接种量转接至装液量为 1.5 L 的 3 L 发酵罐中，通气量为 1.5 vvm 在 37 ℃条件下培养，pH 使用体积分数 25%氨水和 3 mol/L 盐酸调节维持在 7.4，发酵罐初始的搅拌转速为 600 r/min，使用木糖其终质量浓度为 5 g/L 进行诱导在菌体 OD_{600} 达到 0.4 时。培养基中含 20 μg/mL Kana，葡萄糖初质量浓度为 20 g/L，葡萄糖发酵后 8 h 后开始流加，其质量浓度控制在 5 g/L，每隔 4 h 取样分析。

1.2.3 蛋白质浓度测定　采用 Bradford 法测定蛋白质浓度，具体步骤详见蛋白浓度测定试剂盒说明书。

1.2.4 乙酰氨基葡萄糖 HPLC 测定方法　GlcNAc 通过高效液相色谱法测定。高效液相色谱条件：检测器为示差折光检测器(RID)；色谱柱为 Aminex® HPX-87H，300 mm×7.8 mm 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，柱温为 35 ℃；流动相为 5 mmol/L 硫酸；流速为 0.6 mL/min；进样体积为 10 μL。样品处理方法：发酵液经 12000 r/min 离心 4 min 后，取适量上清液用超纯水稀释一定倍数，再将该样品稀释液用 0.22 μm 滤膜过滤。

1.2.5 重组氨基葡萄糖转移酶的分离与纯化 将重组菌株的单菌落分别接种于含相应抗性的 LB 培养基中，在 37 ℃、200 r/min 的条件下培养到 OD_{600} 值为 0.6，加入木糖（终质量浓度 5 g/L）诱导后培养 4 h。菌液在 4 ℃ 下 8 000 r/min 离心后弃上清液，沉淀用 100 mmol/L PBS（pH 7.5）洗涤 3 次，经 750 W 超声破碎（工作强度 60%）后离心收集上清液。

镍柱纯化操作方法：采用 AKTA 蛋白纯化仪，先用缓冲液 A（pH 7.4，20 mmol/L PBS，20 mmol/L 咪唑，500 mmol/L NaCl）平衡镍柱，然后以 1 mL/min 流速进行上样；再用缓冲液 A 以 1 mL/min 流速冲洗掉镍柱中没有结合蛋白质；最后，用缓冲液 B（pH 7.4，20 mmol/L PBS，500 mmol/L 咪唑，500 mmol/L NaCl）以流速为 1 mL/min 进行梯度洗脱。纯化后通过酶活测定和 SDS-PAGE 鉴定重组目的蛋白质；纯化后的目的蛋白质用透析袋在 20 mmol/L PBS（pH 7.4）中透析过夜，纯化后的重组酶保存于-80 ℃冰箱。

1.2.6 酶活测定 乙酰氨基葡萄糖合成酶酶活的检测具体方法如下[15]：50 μL 反应体系包含 50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5），200 μmol/L GlcN-6-P，5 mmol/L $MgCl_2$，体积分数 10% 甘油，200 μmol/L Ac-CoA 和 10 μL 样品 30 °C 反应 10 min 后加入 50 μL 终止溶液，包括 50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）及 6.4 mol/L 盐酸胍；最后加入 50 μL 测量溶液，包括 50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5），1 mmol/L EDTA 以及 5,5-二硫代双-2-硝基苯甲酸，产物可通过 412 nm 下的吸光度进行检测，从而计算乙酰氨基葡萄糖合成酶酶活。

氨基葡萄糖乙酰化酶酶活单位的定义为：在 30 ℃下，每分钟催化合成 1 μmol 乙酰氨基葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位，酶活单位为 U/mL 或 U/mg。

1.2.7 实验数据分析方法 菌体比生长速率（specific growth rate）通过 Origin 软件模拟获得；底物 GlcN-6P 对重组酶 Cegna1 的抑制曲线由软件 Graph Pad 模拟获得，并得到抑制常数 K_i；重组酶的米氏常数 K_m 和催化常数 K_{cat} 的值通过 Graph Pad 模拟获得。

酶双底物反应机制分析方法：分别固定某一底物几个不同浓度（底物浓度不饱和），研究每个不同浓度下另一种底物对合成 GlcNAc-6P 含量的影响。如分别固定 Acetyl-CoA 底物浓度为 50、100、500 mmol/L，测定这 3 个浓度下 GlcN-6P 底物浓度对合成 GlcNAc-6P 的影响。如果分别得到 3 条平行线则为乒乓反应机制，如果 3 条直线相交于一点，则为序列机制。所有数据由 3 次平行实验获得。

2 结果与分析

2.1 表达不同来源 GNA 对 *B. subtilis* 重组菌生产 GlcNAc 的影响

参照 1.2.1 步骤，获得重组质粒 pP43-CeGna1、pP43-CaGna1、pP43-ScGna1、pP43-DfGna1、pP43-AfGna1、pP43-OsGna1、pP43-TbGna1。重组质粒在 *E. coli* JM109 中扩增后转入出发菌株 BSGN6-PxylA-glmS，获得重组菌株 CeBSGN、CaBSGN、ScBSGN、DfBSGN、AfBSGN、OsBSGN 和 TbBSGN。如表 1 所示，上述菌株分别表达来源于 *Caenorhabditis elegans*、*Candida albicans*、*S. cerevisiae*、*Dictyostelium fasciculatum*、*Aspergillus fumigatus* Af293、*Oryza sativa*、*Trypanosoma brucei*。

将 7 株重组菌进行摇瓶发酵，并检测 GlcNAc 的产量，摇瓶发酵 48 h，各重组菌株发酵产乙酰氨基葡萄糖的情况如图 1 所示。重组菌株 CeBSGN 中 GlcNAc 的产量比 CaBSGN、ScBSGN、DfBSGN、AfBSGN、OsBSGN 和 TbBSGN，分别高 26.23%、25.43%、53.32%、83.37%、110.39%、92.19%。综上所述，重组菌 CeBSGN6 对目的产物 GlcNAc 的合成效果最佳。重组菌株 CeBSGN 中 GlcNAc 的产量最高，达到 7.31 g/L。

将 7 株重组菌进行摇瓶发酵培养，每 4 h 取一次样并检测残糖质量浓度，摇瓶发酵 48 h，各重组菌株发酵残糖情况如图 2 所示。摇瓶发酵初始葡萄糖质量浓度为 20 g/L，在整个发酵过程中，葡萄糖被

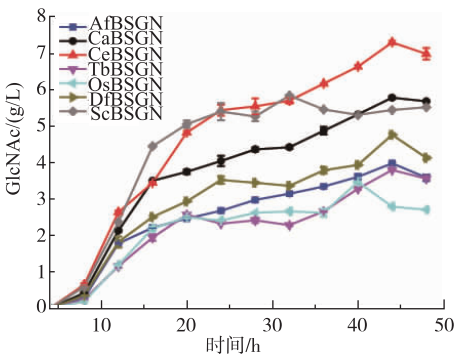


图 1 不同重组菌株摇瓶发酵产 GlcNAc 产量比较

Fig. 1 Comparison of different recombinant strains for GlcNAc shaking flask fermentation production

迅速消耗，重组 7 株菌株均在 16 h 左右将葡萄糖耗光,平均耗糖速率为 1.25 g/L。从图 2 中可以发现 7 株重组菌株在对碳源葡萄糖的消耗上情况较为一致。

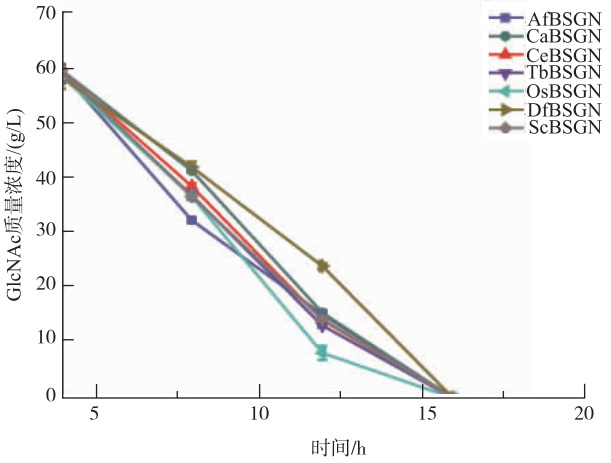


图 2　不同重组菌株葡萄糖消耗情况比较

Fig. 2　Comparison of different recombinant strains for glucose consumption

7 株重组菌摇瓶发酵细胞生长情况如图 3 所示。从图 3(a)中可以看出,在整个发酵过程中,重组 7 株菌株细胞干重在 0~16 h 增长趋势较快,16 h 后随着葡萄糖的耗尽,细胞干重开始下降。7 株重组菌株细胞干重均在 16 h 左右达到最大值。经计算,7 株重组菌株中 CeBSGN 目标产物 GlcNAc 对细胞得率($Y_{GlcNAc/X}$)最高,最大值为 1.12。

7 株重组菌株在对碳源葡萄糖的消耗上情况较为一致，虽然重组菌株 CeBSGN 相比较 6 株菌株，发酵生产 CeBSGN 的产量最大，产物 GlcNAc 对细胞得率最高,但是从图 3(b)中可发现,在细胞生长对数期菌株 CeBSGN 的比生长速率相比较却低于其他 6 种重组菌株。很多微生物的目标代谢产物一般都是在进入稳定期后才开始大量的合成与分泌，

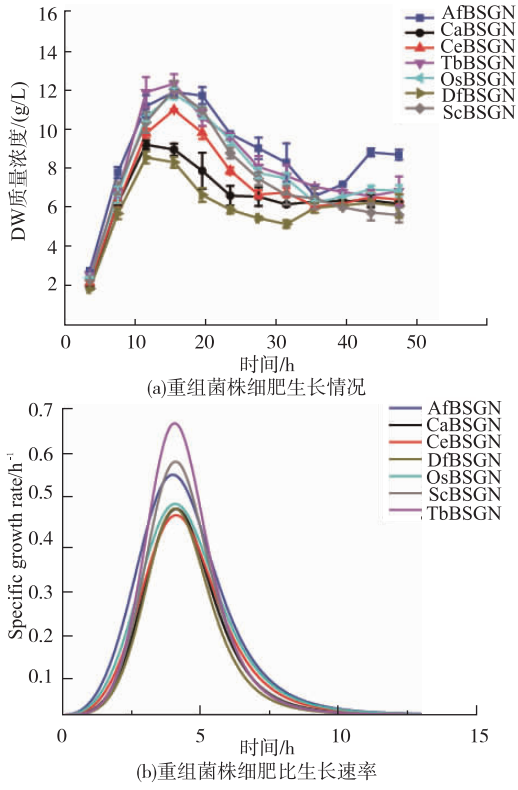


图 3　不同重组菌株细胞生长情况和比生长速率

Fig. 3　Cell growth and specific growth rate for different recombinant strains

比生长速率与微生物的生命活动有关，如果菌体在对数期比生长速率过大,菌体量增加过多,代谢向菌体合成的方向发展,反而不利于目的产物的累积[23]。由此可以推断,在相同碳源利用率的情况下,重组菌株 CeBSGN 比生长速率相对较小，目标产物 GlcNAc 对细胞得率较高，代谢更易于向目标产物 GlcNAc 合成的方向发展,从而更有利于产物的合成。

进一步对 7 株重组菌株的发酵动力学参数进行测定，结果如表 4 所示，重组菌株 CeBSGN 的

表 4　7 株重组菌株生产 GlcNAc 的摇瓶发酵动力学参数比较

Table 4　Comparison of GlcNAc shaking flask fermentation parameters on seven recombinant strains

菌株	GlcNAc 最高产量/(g/L)	细胞干重最大值/(g/L)	细胞生产强度(g/(L·h))	GlcNAc 生产强度(g/(L·h))	GlcNAc 对细胞得率/($Y_{GlcNAc/X}$)
CeBSGN	7.31±0.044	11.01±0.061	0.69±0.031	0.17±0.025	1.12±0.036
CaBSGN	5.79±0.069	9.24±0.22	0.77±0.026	0.12±0.023	0.94±0.031
ScBSGN	5.83±0.16	12.08±0.43	0.76±0.045	0.13±0.027	0.88±0.018
DfBSGN	4.77±0.10	8.58±0.29	0.72±0.016	0.099±0.024	0.78±0.033
AfBSGN	3.99±0.034	11.93±0.19	0.75±0.018	0.083±0.020	0.46±0.038
OsBSGN	3.47±0.019	11.84±0.29	0.74±0.042	0.072±0.021	0.51±0.051
TbBSGN	3.80±0.026	12.36±0.49	0.77±0.015	0.086±0.021	0.58±0.055

GlcNAc 生产强度和 GlcNAc 对细胞得率均高于其他 6 株菌株；但是对比细胞生产强度，重组菌株 CeBSGN 却低于其他菌株。上述数据分析进一步验证了重组菌株 CeBSGN 葡萄糖的消耗较其他六株重组菌株更多的用于产物 GlcNAc 的合成而非菌体量的增加，再一次验证了重组菌 CeBSGN6 能够更好地合成目的产物 GlcNAc。

在摇瓶上进行初步筛选，获得重组菌株 CeBSGN 最高 GlcNAc 产量达到 7.31 g/L,为进一步验证 GlcNAc 的产量，将重组菌株 CeBSGN 和对照菌株 ScBSGN 在 3 L 罐进行上补料分批发酵，发酵过程曲线如图 4 所示。对照菌株 ScBSGN6 乙酰氨基

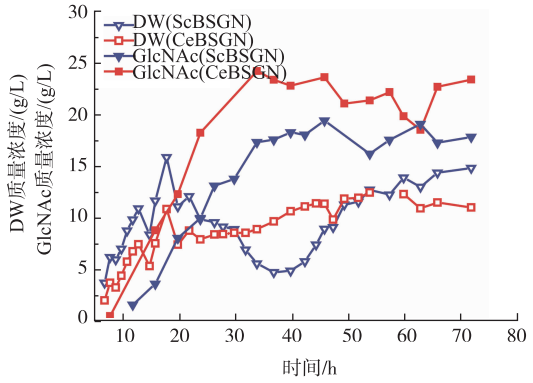


图 4　CeBSGN6 和 ScBSGN6 3 L 罐 GlcNAc 产量比较

Fig. 4　Comparison of CeBSGN and ScBSGN for GlcNAc production in 3 L fermentor

葡萄糖最高产量出现在 45 h 左右，最高产量为 19.43 g/L,重组菌株 CeBSGN6 乙酰氨基葡萄糖最高产量出现在 35 h,最高产量为 24.23 g/L,较对照菌株提高了 24.69%。

在维持葡萄糖质量浓度为 5 g/L 不变的情况下进行补料分批发酵,重组菌株 CeBSGN 和对照菌株 ScBSGN 发酵动力学参数如表 5 所示，重组菌株 CeBSGN 的细胞生产强度是对照菌株 ScBSGN 的 3.82 倍、GlcNAc 生产强度是对照菌株 ScBSGN 的 1.69 倍、GlcNAc 对细胞得率是对照菌株 ScBSGN 的 2.53 倍。综上所述,表达了重组酶 Cegna1 的重组菌株 CeBSGN 能够更好的利用葡萄糖合成目的产物 GlcNAc。

2.2　重组氨基葡萄糖乙酰转移酶的分离纯化及动力学分析

按 1.2.4 的方法对重组氨基葡萄糖乙酰转移酶进行分离与纯化，将纯化后的蛋白按 1.2.5 的方法进行酶活测定,情况如图 5,重组菌株菌株 CeBSGN 的 Cegna1 比酶活为 208.33 U/mg，比 CaBSGN、ScBSGN、Df BSGN、AfBSGN、OsBSGN、TbBSGN 分别高了 31.56%、28.29%、137.68%、198.08%、338.87%、344.20%。综上，重组菌 CeBSGN6 中的重组酶 Cegna1 的催化效率最佳。

重组氨基葡萄糖乙酰转移酶具体动力学参数如表 6 所示,Cegna1 米氏常数 K_m 相对小于其他 6 株重组菌株,而对应的催化效率 K_{cat}/K_m 却相对高于其他 6 株菌株。Helge C.Dorfmueller 等人[17]已解析 Cegna1 的晶体结构，并发现 Cegna1 的空间位阻较小，底物更容易和酶的催化活性中心结合，并且 2 个底物 GlcN-6P 和 Ac-CoA 与活性中心形成多个氢键,更容易结合到活性中心。因此,重组 Cegna1 相比较其他六种重组酶均对 GlcN-6P 和 Ac-CoA 有较高的亲和力和催化效率。

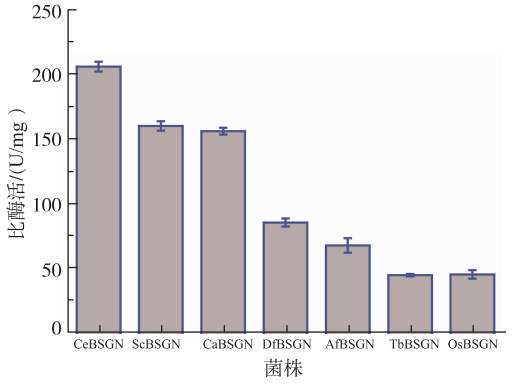


图 5　重组菌株 GNA 比酶活对比

Fig. 5　Comparison of recombinant strains GNA enzyme activity

对 7 株表达不同来源 GNA 的 *B. subtilis* 重组菌株进行筛选，发现表达了重组酶 Cegna1 的重组

表 5　7 株重组菌株 CeBSGN6 和 ScBSGN6 生产 GlcNAc 的上罐发酵动力学参数比较

Table 5　Comparison of GlcNAc shaking flask fermentation parameters on recombinant CeBSGN and ScBSGN

菌株	GlcNAc 最高产量/(g/L)	细胞干重最大值/(g/L)	细胞生产强度(g/(L·h))	GlcNAc 生产强度(g/(L·h))	GlcNAc 对细胞得率($Y_{GlcNAc/X}$)
CeBSGN	24.23	31.76	1.77	1.43	4.32
ScBSGN	19.43	24.96	0.46	0.85	1.71

表 6　重组菌株 GNA 动力学参数

Table 6　Kinetic parameters of recombinant strains GNA

酶	K_m GlcN-6P (mmol/L)	K_m Ac-CoA (mmol/L)	K_{cat} GlcN-6P/ s^{-1}	K_{cat} Ac-CoA/ s^{-1}	K_{cat}/K_m GlcN-6P/ s^{-1} mmol/L	K_{cat}/K_m Ac-CoA/ s^{-1} mmol/L
Cegna1	0.669±0.024	0.363±0.033	1.001±0.028	1.116±0.013	1.496±0.046	3.074±0.039
Scgna1	0.858±0.020	0.406±0.023	0.78±0.041	1.027±0.024	0.909±0.017	2.530±0.056
Cagna1	0.880±0.011	0.389±0.028	0.746±0.021	1.018±0.023	0.848±0.037	2.612±0.046
Dfgna1	1.289±0.034	0.594±0.036	0.728±0.046	0.872±0.068	0.565±0.044	1.468±0.064
Afgna1	1.416±0.041	0.638±0.050	0.523±0.030	0.754±0.018	0.369±0.054	1.182±0.034
Osgna1	1.934±0.048	0.877±0.044	0.36±0.034	0.555±0.025	0.186±0.028	0.633±0.037
Tbgna1	1.970±0.024	0.879±0.032	0.343±0.047	0.521±0.023	0.174±0.057	0.593±0.016

菌株CeBSGN 能够更好的利用葡萄糖合成目的产物 GlcNAc，并且重组 Cegna1 相比较其他 6 种重组酶对 GlcN-6P 和 Ac-CoA 有较高的亲和力和催化效率。因此，我们对筛选出的重组酶 Cegna1 进行酶学性质分析，以便为应用定向进化策略改造 GNA 的实现提供了理论依据。

2.3　重组 Cegna1 酶学性质

2.3.1　重组 Cegna1 最适反应时间　50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.5)中，测定 Cegna1 在酶活反应 0~10 min 之间催化酶活力，以反应时间为 5 min 时的酶活力为相对酶活 100%。由图 6 可知，在反应 0~2 min，酶活随时间延长而迅速升高，在 5~6 min，Cegna1 催化效率最大，相对酶活可达到 103%，在 6~10 min ，催化效率略有下降，基本能保持稳定。

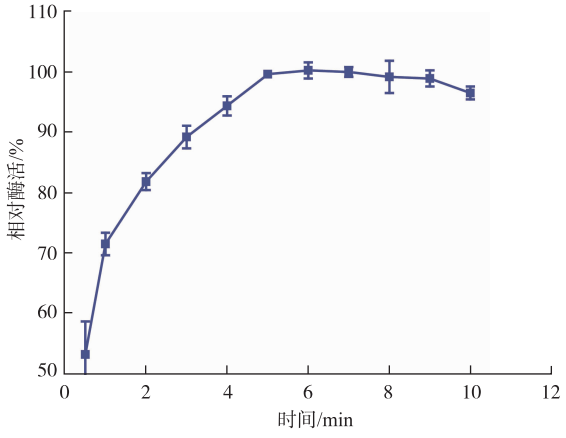


图 6　重组 Cegna1 酶活随反应时间的变化

Fig. 6　Influence of reaction time on enzyme activities of recombinant Cegna1

2.3.2　重组 Cegna1 最适反应温度　50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.5)中，测定Cegna1 在 10~90 ℃之间催化酶活力，以初始温度 30 ℃时的酶活力为相对酶活 100%。从图 7 可得：当温度低于 37 ℃时，催化效率随温度的升高而快速增加；当反应温度为 37 ℃时，催化效率最大；当温度在 37~50 ℃时，催化效率迅速降低；当反应温度在 50~90 ℃时，酶活基本维持在 65%。

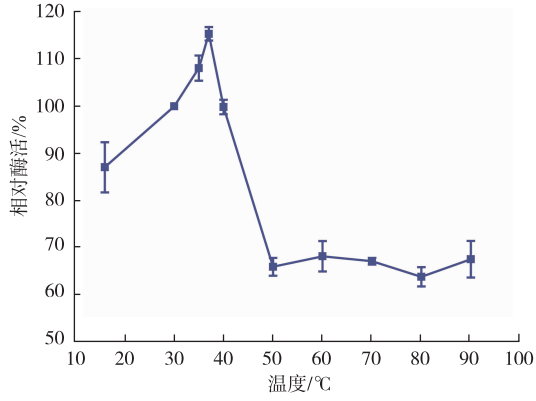


图 7　重组 Cegna1 酶活随反应温度的变化

Fig. 7　Influence of reaction temperature on enzyme activities of recombinant Cegna1

2.3.3　重组 Cegna1 最适反应 PH　以不同 pH 的缓冲液（pH 3~10，50 mmol/L Tris 缓冲液）稀释 Cegna1 酶液与底物至设定 pH，测定 Cegna1 催化活力，以初始 PH 7.5 时的酶活力为相对酶活 100%。由图 8 可知，在 PH 值 3~10 的范围内，重组 Cegna1 均能保持 75%以上的活性，具有较宽的 PH 适应范围，最适反应 PH 为 7。在酸性条件下，催化效率随着 PH 值下降而迅速降低；在碱性条件下，催化效率随 PH 值升高而下降较缓，PH 为 10 时，仍保留着较高酶活，表明重组 Cegna1 相对酸性环境在碱性环境中更加稳定。

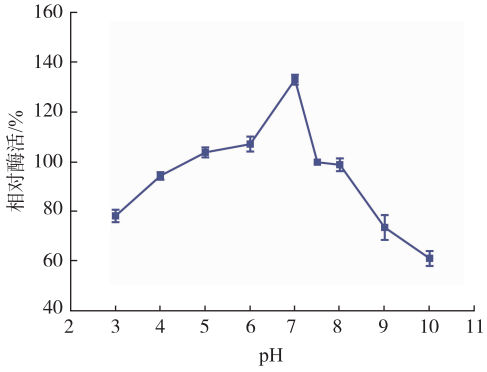


图 8 重组 Cegna1 酶活随反应 PH 的变化

Fig. 8 Influence of reaction PH on enzyme activities of recombinant Cegna1

2.3.4 重组 Cegna1 热稳定性分析 将酶液在不同温度下保温不同时间,迅速冷却,pH 7.5,30 ℃测定残余 Cegna1 酶活,以未保温的酶活力为相对酶活 100%,计算相对酶活力。由图 9 可知,在 4 ℃和 30 ℃条件下 Cegna1 具有最大的催化活性,低温下仍能保持较高酶活热稳定均没有什么明显变化;当温度超过 30 ℃时,催化效率随温度的升高而迅速降低。40 ℃,100 min 内 Cegna1 能保持 80%以上的活性,而在 60 ℃条件下,100 min 内 Cegna1 仍能保持 45%以上的酶活。

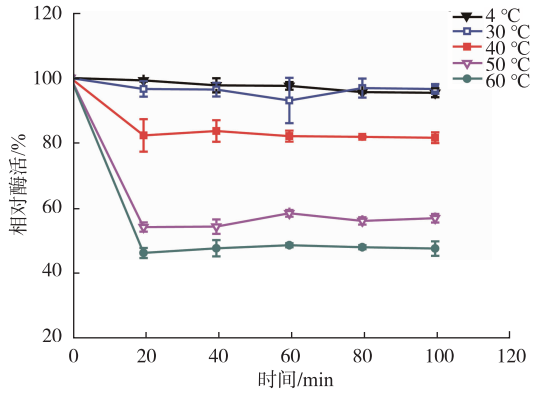
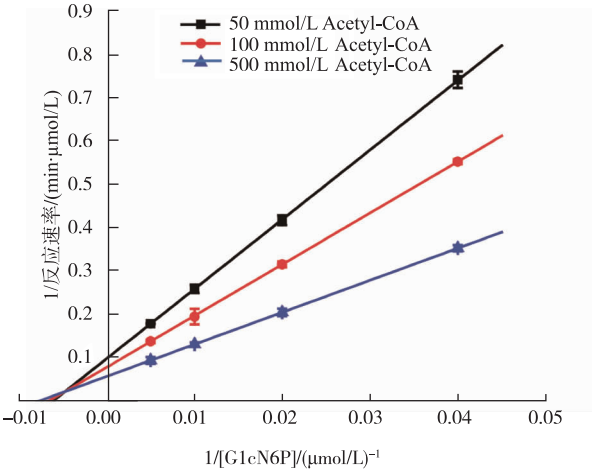


图 9 重组 Cegna1 热稳定性

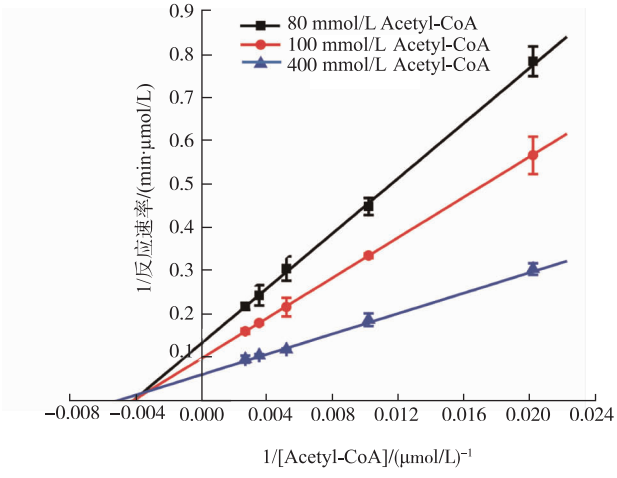
Fig. 9 thermostability on enzyme activities of recombinant Cegna1

2.3.5 Cegna1 的反应动力学的研究 为了研究重组 Cegna1 的反应动力学,分别以 Acetyl-CoA 和 GlcN-6P 为底物,固定一种底物浓度(如 Acetyl-CoA)的情况下研究不同浓度的另一种底物(如 GlcN-6P)对 GlcNAc 合成的影响。通过不同底物浓度测定重组 Cegna1 的酶活,最终获得 Lineweaver-Burk 双倒数(图 10 所示)。从图中可以看出,固定不同浓度的一种底物的情况下,不同浓度的另一底物的倒数为横坐标,对应的 GlcNAc 合成速率倒数为纵坐标,拟合得到的直线相交于一点,进一步进行数据拟合,发现其符合序列机制的底物动力学方程 1,双底物反应机制为序列反应。

$$v=\frac{v_{max}\cdot a\cdot b}{K_{mA}\cdot b\cdot(1+b/K_{iB})+K_{mB}\cdot a+a\cdot b} \quad (1)$$



(a)



(b)

图 10 重组 Cegna1 催化生产 GlcNAc-6P 的Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 10 Lineweaver -Burk plots of the GlcNAc -6P biosynthesis by the recombinant Cegna1

2.3.6 底物与产物对重组 Cegna1 抑制分析 为了研究底物 Acetyl-CoA 和 GlcN-6P 与产物 GlcNAc 对的抑制情况,固定 Acetyl-CoA 和 GlcN-6P 底物浓度为 200 μmol/L,分别向反应体系中加入 0~60 mmol/L

的添加物 Acetyl-CoA 、GlcN-6P 和 GlcNAc，结果如图 11 所示。由图 11(a)可得，GlcNAc 和 Acetyl-CoA 对重组 Cegna1 无明显抑制作用；由图 11(b)可得，底物

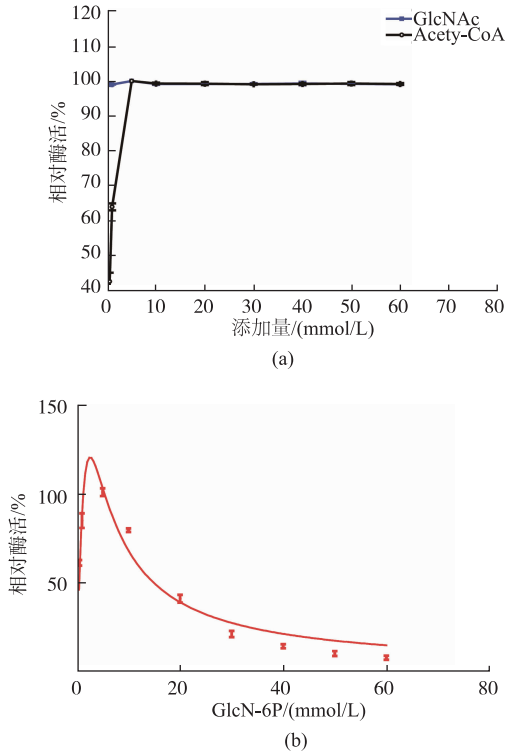


图 11　GlcNAc、Acetyl-CoA (a) 及 GlcN-6P (b) 对重组 Cegna1 的抑制情况

Fig. 11　Inhibition of Cegna1 activity with increasing concentrations of GlcNAc, Acetyl -CoA (a)and GlcN-6P(b).

GlcN-6P 对重组 Cegna1 的抑制作用明显，5 mmol/L GlcN-6P 已可对重组 Cegna1 的造成明显抑制作用，采用 GraphPad Prism 计算抑制常数 K_i 值，求得重组 Cegna1 对 GlcN-6P 的 K_i 值为(1.880±0.472) mmol/L，下一步可采用定向进化策略改造 Cegna1，解除底物 GlcN-6P 对重组 Cegna1 的抑制作用。

3 结　语

本文通过在枯草芽孢杆菌中异源表达 7 种不同来源的氨基葡萄糖乙酰化酶，筛选出秀丽隐杆线虫来源的氨基葡萄糖乙酰化酶(Cegna1)能够更有效的积累乙酰氨基葡萄糖摇瓶水平上产量达到 7.31 g/L，相较于过量表达来源于酿酒酵母的氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因的对照菌株，GlcNAc 的产量提高了 24.51%。在 3 L 发酵罐中，GlcNAc 产量达到 24.23 g/L，相较于对照菌株 GlcNAc 的产量提高了 24.69%。进一步研究 7 株重组酶的动力学参数米氏常数 K_m 与 K_{cat}/K_m 发现重组 Cegna1 相比较其他 6 种重组酶均对 GlcN-6P 和 Ac-CoA 有较高的亲和力和催化效率。对筛选出的重组 Cegna1 酶学性质进行研究发现重组 Cegna1 最适反应时间为 5~6 min，最适反应温度为 37 ℃，最适反应 PH 为 7，热稳定性良好，双底物反应机制为序列反应。最后发现底物 GlcN-6P 对重组 Cegna1 的抑制作用明显，下一步可采用定向进化策略改造 Cegna1，解除底物 GlcN-6P 对重组 Cegna1 的抑制作用。

参考文献：

[1] CHEN J K，SHEN C R，LIU C L. N-acetylglucosamine：production and applications[J]. **Mar Drugs**，2010，8(9)：2493-2516.

[2] ANDERSON J，NICOLOSI R，BORZELLECA J. Glucosamine effects in humans：a review of effects on glucose metabolism，side effects，safety considerations and efficacy[J]. **Food Chem Toxicol**，2005，43(2)：187-201.

[3] ZHAO Ying，WU Xiaolan，GUO Linming，et al. Protective effect of N-acetylglucosamine on injury of liver tissues induced by alcoholic and its mechanism[J]. **Journal of Jilin University**(**Medicine Edition**)，2011，37(3)：456-459.(in Chinese)

[4] ZHAO Li ming，XIA Wen shui. Physiochemical properties of N-acetyl-D-glucosamine used as functional food additive [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**，2002，21(4)：357-361.(in Chinese)

[5] DENZEL M S，STORM N J，GUTSCHMIDT A，et al. Hexosamine pathway metabolites enhance protein quality control and prolong life[J]. **Cell**，2014，156(6)：1167-1178.

[6] MOJARRAD J S，NEMATI M，VALIZADEH H，et al. Preparation of glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology[J]. J **Agr Food Chem**，2007，55(6)：2246-2250.

[7] DONZELLI B G G，OSTROFF G，HARMAN G E. Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources[J]. **Carbohyd Res**，2003，338(18)：1823-1833.

[8] LIU Y，LIU L，SHIN HD，et al. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for microbial production of N-acetylglucosamine [J].

Metab Eng, 2013, 19: 107-115.

[9] SITANGGANG A B, WU H S, WANG S S, et al. Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus* sp. BCRC 31742[J]. **Bioresource Technol**, 2010, 101(10): 3595-3601.

[10] DENG M D, SEVERSON D K, GRUND A D, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for industrial production of glucosamine and N-acetylglucosamine[J]. **Metab Eng**, 2005, 7(3): 201-214.

[11] LIU Y, ZHU Y, LI J, et al., Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetylglucosamine production[J]. **Metab Eng**, 2014, 23: 42-52.

[12] VAN DIJL J M, HECKER M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory[J]. **Microb Cell Fact**, 2013, 12(1): 3.

[13] MEYER F M, GERWIG J, HAMMER E, et al. Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: evidence for a metabolon[J]. **Metab Eng**, 2011, 13: 18-27.

[14] DYDA F, KLEIN D C, HICKMAN A B. GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview[J]. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct**, 2000, 29(1): 81-103.

[15] MIO T, YAMADA-OKABE T, ARISAWA M, et al. *Saccharomyces cerevisiae GNA1*, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-N-acetylglucosamine synthesis[J]. **J Biol Chem**, 1999, 274(1): 424-429.

[16] PENEFF C, MENGIN-LECREULX D, BOURNE Y. The crystal structures of Apo and complexed *Saccharomyces cerevisiae GNA1* shed light on the catalytic mechanism of an amino-sugar N-acetyltransferase [J]. **J Biol Chem**, 2001, 276 (19): 16328-16334.

[17] DORFMUELLER H C, RAO F V, BLAIR D E, et al. Structural and biochemical characterization of a trapped coenzyme a adduct of *Caenorhabditis elegans* glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase 1[J]. **Acta Crystallogra D**, 2012, 68(8): 1019-1029.

[18] WANG J, LIU X, LIANG Y H, et al. Acceptor substrate binding revealed by crystal structure of human glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase 1[J]. **FEBS Letters**, 2008, 582(20): 2973-2978.

[19] MIO T, KOKADO M, ARISAWA M, et al. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants lacking the GNA1 gene encoding glucosamine-6-phosphate acetyltransferase[J]. **Microbiology**, 2000, 146(7): 1753-1758.

[20] MARIñO K, GüTHER M L S, WERNIMONT A K, et al. Characterization, localization, essentiality, and high-resolution crystal structure of glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase from *Trypanosoma brucei*[J]. **Eukaryotic cell**, 2011, 10(7): 985-997.

[21] HURTADO-GUERRERO R, RAIMI O G, MIN J, et al. Structural and kinetic differences between human and *Aspergillus fumigatus* D-glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase[J]. **Biochem J**, 2008, 415: 217-223.

[22] BOEHMELT G, FIALKA I, BROTHERS G, et al. cloning and Characterization of the murine glucosamine-6-phosphate acetyltransferase EMeg32 [J]. **J Biol Chem**, 2000, 275(17): 12821-12832.

[23] WANG Sui lou. Meaning on specific growth rate of microorganism[J]. **Journal of Zhengzhou Institute of Light Industry**, 1993, 8(4): 6-9.(in Chinese)