

Red 同源重组敲除 *nagE* 和 *manX* 对大肠杆菌发酵生产氨基葡萄糖的影响

陈欣^{1,2}, 刘龙^{1,2}, 李江华^{1,2}, 刘杰³, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,4}

1 糖化学与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

3 江苏江山制药有限公司, 江苏 靖江 214500

4 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

陈欣, 刘龙, 李江华, 等. Red 同源重组敲除 *nagE* 和 *manX* 对大肠杆菌发酵生产氨基葡萄糖的影响. 生物工程学报, 2012, 28(3): 305-319.

Chen X, Liu L, Li JH, et al. Influence of *nagE* and *manX* knockout with Red homologous recombination on the microbial production of glucosamine by *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2012, 28(3): 305-319.

摘 要: 氨基葡萄糖 (GlcN) 又称氨基葡糖或葡糖胺, 是葡萄糖的一个羟基被氨基取代后的化合物, 在医药和保健领域具有广泛应用。在前期研究中, 我们构建了一株可高效合成 GlcN 和其乙酰化衍生物 *N*-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 的重组大肠杆菌 *Escherichia coli*-glms-gna1 (在下游提取过程中用弱酸进行脱乙酰化即可将 GlcNAc 转化为 GlcN)。但研究发现, 发酵过程中 GlcN 和 GlcNAc 能被转运至胞内作为碳源利用, 导致胞外产量显著减少。为阻断胞外 GlcN 和 GlcNAc 向胞内的转运, 利用 Red 同源重组技术将 *E. coli*-glms-gna1 的乙酰氨基葡萄糖磷酸转运子编码基因 *nagE* 和甘露糖磷酸转运子编码基因 *manX* 敲除, 获得 *nagE* 基因敲除的工程菌 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE* 和 *nagE*/*manX* 基因双敲除的工程菌 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*-Δ*manX*, 并在 7 L 发酵罐上利用构建的工程菌进行 GlcN 和 GlcNAc 的发酵生产。实验结果表明: 培养对照菌株 *E. coli*-glms-gna1 至 12 h 时 GlcN 产量达到最大值 4.06 g/L, GlcNAc 产量达到最大值 41.46 g/L; 而培养单基因敲除菌株 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE* 至 12 h 时 GlcN 产量达到最大值 4.38 g/L (是对照菌株的 1.08 倍), GlcNAc 产量达到最大值 71.80 g/L (是对照菌株的 1.7 倍); 培养双基因敲除菌株 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*-Δ*manX* 至 10 h 时 GlcN 产量达到最大值 4.82 g/L (是对照菌株的 1.2 倍), GlcNAc 产量达到最大值 118.78 g/L (是对照菌株的 2.86 倍)。这表明 *nagE* 和 *manX* 基因的敲除可显著降低 GlcN 和 GlcNAc 向胞内的转运, 进而提高其在胞外的积累。研究结果对最终实现 GlcN 的工业化生产具有一定的指导意义。

Received: July 21, 2011; **Accepted:** September 27, 2011

Supported by: Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 20836003), National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2010CB535014), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP30901).

Corresponding author: Long Liu. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918309; E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金重点项目 (No. 20836003), 国家重点基础研究发展计划 (973 Program) (No. 2010CB535014), 江苏省优势学科建设工程项目, 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP30901) 资助。

关键词: 氨基葡萄糖, 乙酰氨基葡萄糖, *nagE* 基因, *manX* 基因, Red 同源重组敲除

Influence of *nagE* and *manX* knockout with Red homologous recombination on the microbial production of glucosamine by *Escherichia coli*

Xin Chen^{1,2}, Long Liu^{1,2}, Jianghua Li^{1,2}, Jie Liu³, Guocheng Du^{1,2}, and Jian Chen^{1,4}

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Aland (Jiangsu) Nutraceutical Co., Ltd, Jingjiang 214500, Jiangsu, China

4 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Glucosamine (GlcN), also called amino sugar, is a compound derived from the substitution of a hydroxyl group of glucose molecule with an amino group. GlcN finds a wide-range of applications in health food and pharmaceutical industries. In our previous research, a recombinant *Escherichia coli*-glms-gna1 was constructed for the efficient production of GlcN and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), the latter can be readily deacetylated to GlcN under mild acidic conditions. However, the results indicated that the titer of GlcN and GlcNAc decreased significantly due to the transportation of GlcN and GlcNAc from the culture broth to the inside of cells. To alleviate or block the transportation process, *nagE* gene (encoding for the GlcNAc-specific transporter) and *manX* gene (encoding for the mannose transporter) were knocked out with the Red homologous recombination method, and two engineered strains, *E. coli*-glms-gna1- Δ *nagE* (with *nagE* gene deletion) and *E. coli*-glms-gna1- Δ *nagE*- Δ *manX* (with *nagE* and *manX* genes deletion), were successfully constructed. The two strains were cultured in a 7-L fermentor for the production of GlcN and GlcNAc. The maximal GlcN concentration of control strain *E. coli*-glms-gna1 reached 4.06 g/L, and the maximal GlcNAc concentration reached 41.46 g/L. The maximal GlcN and GlcNAc concentration of *E. coli*-glms-gna1- Δ *nagE* reached 4.38 g/L and 71.80 g/L, respectively, which were 1.08-fold and 1.70-fold of those of *E. coli*-glms-gna1, respectively. The maximal GlcN and GlcNAc concentration of *E. coli*-glms-gna1- Δ *nagE*- Δ *manX* reached 4.82 g/L and 118.78 g/L, respectively, which were 1.20-fold and 2.86-fold of those of *E. coli*-glms-gna1, respectively. These results suggested that the deletion of *nagE* and *manX* could significantly increase the extracellular accumulation of GlcN and GlcNAc. The results obtained here maybe useful for the microbial GlcN production in an industrial scale.

Keywords: glucosamine, *N*-acetylglucosamine, *nagE* gene, *manX* gene, knockout based on Red homologous recombination

氨基葡萄糖 (Glucosamine, 2-amino-2-deoxy-D-glucose, GlcN) 又称氨基葡糖或葡糖胺, 是葡萄糖的一个羟基被氨基取代后的化合物^[1-4], 在保健食品和医药领域具有广泛应用, 如能特异性地作用于关节软骨, 有效治疗风湿性关节炎; 可抑制白血病细胞 K562 的生长; 可参

与肝肾解毒, 发挥抗炎、护肝的作用等^[5-7]。在日本和美国, GlcN 作为食品配料广泛应用。但令人遗憾的是, 目前国内上市的 GlcN 产品还比较少, 相关产品的开发空间和潜力巨大。GlcN 的生产方法可分为 3 种: 甲壳素水解法、生物转化法^[8-9]和微生物发酵法^[1-4]。甲壳素水解是目前

生产 GlcN 的主要方法,但原料来源受限、环境污染严重、部分消费者服用后会过敏;生物转化法生产的酶的价格高、生产成本低,转化时间长,难于实现工业化生产^[1-4,10-11];因此微生物发酵生产 GlcN 吸引了越来越多研究者的关注^[12-14]。相对于水解法和生物转化法,微生物发酵法具有以下优点:1) 发酵时间较短,生产强度较高;2) 原料来源不受地域和季节限制,产品无鱼腥味;3) 对环境污染小;4) 产品来自微生物,消费者服用后不会出现过敏。但目前国内外关于 GlcN 发酵生产的研究寥寥无几。

对大肠杆菌中 GlcN 合成代谢途径的研究^[1,4,15-16]表明:进入细胞内的葡萄糖在磷酸葡萄糖异构酶 (PGI) 的催化下转化成 6-磷酸葡萄糖,后者在氨基葡萄糖合成酶 (GlmS) 催化下生成 GlcN,氨基葡萄糖乙酰化酶 (Gna1) 催化 GlcN 转化成乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) (图 1)。本研究室通过在大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25947 中过量表达氨基葡萄糖合成酶 (由基因 *glmS* 编码) 和氨基葡萄糖乙酰化酶 (由基因 *gna1* 编码),成功构建了一株可高效合成氨糖的重组大肠杆菌 *E. coli*-*glms-gna1*。通过乙酰化将 GlcN 转化为 GlcNAc 可显著降低 GlcN 对细胞生长和代谢的抑制作用,在下游纯化过程中用弱酸处理即可将 GlcNAc 脱乙酰获得最终产品 GlcN,因此, GlcN 和 GlcNAc 都是本文中的目标发酵产物。但前期的研究发现^[4],由于 GlcN 依靠甘露糖磷酸转移系统 (Mannose PTS, II^{Man} , 由 *manXYZ* 操纵子编码) 和葡萄糖磷酸转移系统 (glucose PTS, II^{Glc} , 由 *pstG* 基因编码) 对其进行磷酸化后从胞外向胞内转运, GlcNAc 依靠

II^{Man} 和乙酰氨基葡萄糖磷酸转移系统 (GlcNAc PTS, II^{NAG} , 由基因 *nagE* 编码) 对其进行磷酸化后从胞外向胞内转运,导致氨糖产量降低。因此,要想在胞外积累高浓度的 GlcN 或 GlcNAc,就必须减弱或阻断 GlcN 或 GlcNAc 从胞外到胞内的转运。*manXYZ* 操纵子由 X、Y、Z 三个基因构成,其中 *manX* 基因编码甘露糖特异性磷酸转移复合酶的组分 II A 和 II B 蛋白, *manX* 基因的缺失对甘露糖特异性磷酸转移复合酶活性影响较大,通过敲除 *nagE* 和 *manX* 基因,有望阻止胞外 GlcN 或 GlcNAc 向胞内的转运,进而增加产量^[17-18]。

近年来发展起来的依赖 λ 噬菌体的 Red 重组系统,可以直接利用含同源臂的 PCR 线性片段,替换出同源臂内的目的基因。该系统利用 λ 噬菌体 3 个蛋白质 Exo、Bet 和 Gam, Cam 抑制大肠杆菌的 RecBCD 核酸外切酶 V 的活性,使外源线性 DNA 不会立即被降解, Exo 和 Bet 引导线性片段与同源区发生重组置换,而且效率较传统的同源重组方法高几十倍^[19-20]。我们从基因突变菌株中通过 PCR 反应扩增出突变基因及其两翼 DNA 片段,利用该系统替代 *E. coli*-*glms-gna1* 中相应基因,构建了 *nagE* 及 *manX* 缺失的大肠杆菌工程菌株,使其丧失氨基葡萄糖磷酸转移功能,以此增加胞外氨糖产量。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 菌株和质粒

E. coli-*glms-gna1*: 本实验保藏,将来自大肠杆菌 *E. coli* 基因组的氨基葡萄糖合成酶基因

(*glmS*) 和氨基葡萄糖乙酰化酶基因 (*gnal*) 通过 pET-28 (a) 在 *E. coli* ATCC 25947 (DE3) 中进行了克隆和表达而获得; *E. coli* JW0665-1 (F⁻, Δ (*araD-araB*) 567, Δ *lacZ*4787 (::rrnB-3), Δ *nagE*728::kan, λ *ph*-1, Δ (*rhaD-rhaB*) 568, *hsdR*514); *E. coli* JW1806-1 (F⁻, Δ (*araD-araB*) 567, Δ *lacZ*4787 (::rrnB-3), λ *ph*-1, Δ (*rhaD-rhaB*) 568, *hsdR*514), 用于提供被卡那霉素抗性基因 (*Kan*^r) 插入失活的 *nagE* 及 *manX* 片段, 购自美国耶鲁大学菌种保藏中心; 质粒 pKD46 和 pCP20 购自美国耶鲁大学菌种保藏中心。

1.1.2 酶和试剂

胰蛋白胨和酵母粉购自 Oxoid 公司; LA DNA 聚合酶和 PCR 产物回收试剂盒购自 TaKaRa 公司 (大连); 卡那霉素、氨苄青霉素、

引物合成、L-阿拉伯糖和质粒提取试剂盒购于 Sangon 生工生物工程 (上海) 有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

电转化仪 (GenePulser Xcell), Bio-Rad 公司; 台式高速离心机, 日本 Hitech 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京六一仪器厂; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 7 L 发酵罐 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, G107-09)。

1.2 方法

1.2.1 培养基

LB 培养基: 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 琼脂 20 g, 定容至 1 L, pH 7.0。

发酵培养基: 葡萄糖 10.0% (W/V), 蛋白胨 1.2% (W/V), 酵母膏 2.4% (W/V), 甘油 0.4% (V/V), KH₂PO₄ 17 mmol/L, K₂HPO₄ 72 mmol/L。

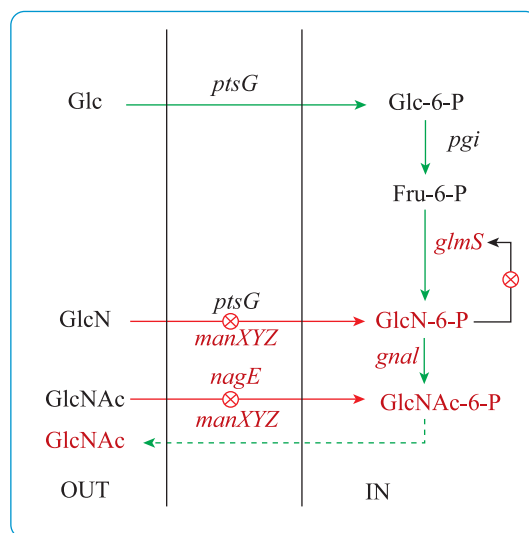


图 1 大肠杆菌中氨基葡萄糖合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathways of glucosamine in *E. coli*. Glc: glucose; Fru-6-P: fructose-6-P; *ptsG*: glucose transporter gene; GlcN-6-P: glucosamine-6-P; GlcNAc-6-P: *N*-acetylglucosamine-6-P; *glmS*: glucosamine synthase; *gnal*: glucosamine-6-phosphate acetyltransferase; *nagE*: GlcNAc-specific transporter gene; *manXYZ*: mannose transporter gene; OUT: outside the cell; IN: inside the cell.

1.2.2 引物设计

根据 *E. coli* JW0665 *nagE* 基因上下游 800 bp 设计引物 NU 和 ND, 扩增得到 3.5 kb 的突变序列; 根据 *E. coli* JW1806-1 *manX* 基因上下游 500 bp 序列设计引物 MU 和 MD, 扩增得到 2.3 kb 的突变序列, 同时根据 *kan^r* 内部序列设计鉴定引物 K1 和 K2, 用于对转化子的验证 (表 1)。

1.2.3 感受态细胞制备

从 30 °C 培养 16~20 h 的平板中挑取一个单菌落, 转接到含 20 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 30 °C 下 200 r/min 培养过夜, 按 0.5% 的接种量转接含有 50 mL LB 培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 30 °C、200 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 0.6$, 将三角瓶置于冰中预冷 30 min, 于超净台内将培养液转移到预冷的 50 mL 无菌离心管中, 冰上放置 10 min; 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 加入少量预冷的无菌水重悬菌体, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min; 重复 1 次无菌水洗菌体; 最后用预冷的 10% 甘油洗涤 1 次, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将菌体悬浮于 0.8 mL 10% 的甘油中, 按每管 50 μ L 感受态细胞进行分装, 或保存于 -80 °C 备用。

制备用于同源重组的 *E. coli* JW0665-1 (pKD46) 或 *E. coli* JW1605-1 (pKD46) 感受态细胞时, 当菌液 $OD_{600} \approx 0.2$ 时加入 1 mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 Red 重组酶表达, 30 °C、200 r/min 培养至菌液最终 $OD_{600} \approx 0.6$, 其他操作同上。

1.2.4 电转化

取出感受态细胞, 在冰浴中融化; 加入待转化的 1~2 μ L DNA 或 1 μ L pKD46 或 pCP20, 用粗口吸头轻柔混合; 将上述混合物转入预冷

的 0.2 cm 电转杯中, 冰浴中预冷 10 min; 打开电转仪, 将参数设定为 2 500 V, 25 mF, 200 Ω , 电击时间约为 5 ms; 从冰中取出电转杯, 用纸巾吸去表面的水分, 放入样品槽中; 电击后立即加入 1 mL LB 培养基, 30 °C、200 r/min 培养 1.5 h 后将转化后的感受态细胞涂布在含有抗生素的 LB 平板上于 30 °C 培养进行筛选。扩增片段转化含有 pKD46 的感受态细胞时, 电转化后的培养条件为 30 °C 培养 1.5 h, 然后升温至 42 °C 培养 12~16 h 以去除 pKD46; 利用 pCP20 消除转化子中 *kan^r* 时, 电转化后的培养条件为 30 °C 培养 2 h, 然后升温至 42 °C 培养 12~16 h 以去除 pCP20。

1.2.5 转化子验证

将电转化后长出的转化子分别用 NU/ND、MU/MD 及鉴定引物 K1/K2 进行菌落 PCR 验证 (表 2), 考察 *nagE* 和 *manX* 基因是否已被 *kan^r* 基因替换。

1.2.6 发酵实验

在 7 L 发酵罐中配制发酵培养基, 装液量为 4 L, 接入 *E. coli*-glms-gna1、*E. coli*-glms-gna1- Δ *nagE* 和 *E. coli*-glms-gna1- Δ *nagE*- Δ *manX*, 接种后 37 °C、400 r/min 培养, 通气量 240 L/h, 至 OD_{600} 达到 0.6 (约 4 h), 加入乳糖 (其在发酵罐中的浓度为 5 g/L), 诱导重组质粒 pET28 (a)-glms-gna1 中 *glmS* 和 *gna1* 基因表达, 继续发酵至 20 h。于接种后 6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h 进行生物量、GlcN 和 GlcNAc 产量的分析。

1.2.7 生物量、GlcN 和 GlcNAc 的检测方法

生物量采用干重法测定。GlcN 的检测参考 Elson-Morgan 法^[4,21]: 取发酵液 5.0 mL 加入 5 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 8 min, 取 0.5 mL 离

表 1 本实验中使用的 PCR 系列引物

Table 1 PCR primers used in this work

Primer name	Primer sequence (5'-3')	T_m (°C)
NU	TACGAGAAGCCAGAGAAGACGC	61
ND	GGTGTTCAGCAAATTTAATACGG	57
MU	CGAGAACAACAAGCGTGAGTAGC	61
MD	CAGAGAAGAAACGTGGATCCAGGAA	61
K1	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG	61
K2	TTAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG	60

表 2 转化子菌落 PCR 反应中使用的引物、模板、退火温度及产物大小

Table 2 Primer pairs, templates and annealing temperature used for the transformant colony PCR and the size of PCR products

Primer pairs	Templates	Annealing temperature (°C)	Size (bp)
NU/ND	<i>E. coli</i> JW0665-1 genome	57	2 923
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE ::Kan genome		2 923
	<i>E. coli</i> -glms-gna1 genome		3 547
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE genome		1 699
MU/MD	<i>E. coli</i> JW1806-1 genome	61	2 337
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX ::Kan genome		2 337
	<i>E. coli</i> -glms-gna1 genome		1 986
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX genome		1 113
NU/K2	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE ::Kan genome	60	1 662
K1/ND	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE ::Kan genome	57	1 649
MU/K2	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX ::Kan genome	60	1 383
K1/MD	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX ::Kan genome	61	1 344

心上清液加入乙酰丙酮试剂 1.0 mL, 90 °C 水浴处理 1 h, 冷却至室温, 慢慢加入 96% (V/V) 乙醇 10 mL, 然后加入 DMAB 试剂 1.0 mL, 混合均匀。混合后室温放置 1 h, 530 nm 处比色, 根据标准曲线计算 GlcN 产量。GlcNAc 用 HPLC 方法检测^[22], Agilent 1200, RID 检测器, Alltech C18 柱 (250×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 70% 乙腈, 流速 0.7 mL/min, 柱温 30 °C, 进样体积为 10 μL。

2 结果与分析

2.1 卡那抗性基因替代 *nagE* 及 *manX* 基因

利用引物 NU/ND 从 *E. coli* JW0665-1 中扩增出的 DNA 片段, 通过 Red 重组替代 *E. coli*-

glms-gna1 基因组 *nagE* 基因, 转化子验证结果如图 2 所示。泳道 2 为 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::kan 菌落 PCR 产物, 大小为 2 923 bp, 泳道 3 为原菌株 *E. coli*-glms-gna1 菌落 PCR 产物, 大小为 3 547 bp, 利用鉴定引物 NU/K2 和 K1/ND 分别对 *E. coli*-glms-gna1、*E. coli* JW0665-1 和 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::Kan 进行菌落 PCR, 泳道 4 和 8 为对照, 无扩增产物, 泳道 5、6、7 中条带大小均为 1 649 bp, 泳道 9、10 中条带大小均为 1 662 bp, 说明携带 *kan^r* 基因的 PCR 扩增片段已经替代了 *nagE* 基因, 得到 *nagE* 基因插入失活的菌株 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::kan。

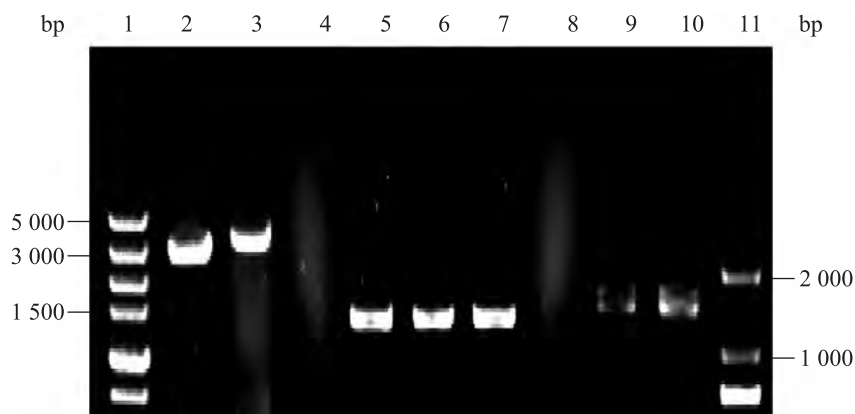


图 2 *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::kan 菌落 PCR 电泳结果

Fig. 2 Colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::kan. 1: DL 5 000 DNA marker; 2: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::kan amplified by primers NU and ND (2 923 bp); 3: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1 amplified by primers NU and ND (3 547 bp); 4: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1 amplified by primers K1 and ND; 5: colony PCR products of *E. coli* JW0665-1 amplified by primers K1 and ND (1 649 bp); 6, 7: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::kan amplified by primers K1 and ND (1 649 bp); 8: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1 amplified by primers NU and K2; 9: colony PCR products of *E. coli* JW0665-1 amplified by primers NU and K2 (1 662 bp); 10: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1-Δ*nagE*::kan amplified by primers NU and K2 (1 662 bp); 11: DL 2000 DNA marker.

利用引物 MU/MD 从 *E. coli* JW1806-1 中扩增出的 DNA 片段, 通过 Red 重组替代 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 基因组 *manX* 基因。转化子验证结果如图 3 所示, 泳道 1 和 2 为 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 菌落 PCR 产物, 大小为 2 923 bp, 泳道 3、4 分别为菌株 *E. coli* JW1806-1 和 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX::Kan 菌落 PCR 产物, 大小为 3 547 bp, 利用鉴定引物 NU/K2 和 K1/ND 分别对 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE、*E. coli* JW1806-1 和 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE-*manX*::Kan 进行菌落 PCR, 泳道 5 和 8 为对照, 无扩增产物, 泳道 6、7 条带大小均为 1 344 bp, 泳道 9、10 条带大小均为 1 383 bp, 说明携带 *kan^r* 基因的 PCR 扩增片段已经替代了 *manX* 基因。

2.2 卡那抗性基因的去除

将质粒 pCP20 转化 *E. coli*-glms-gna1-

Δ nagE::kan, 去除 *kan^r*, 验证结果如图 4 所示。

泳道 1、2 为 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 菌落 PCR 产物, 大小为 1 699 bp, 泳道 3、4 分别为 *E. coli* JW0665-1 和 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE::kan 菌落 PCR 产物, 大小为 2 923 bp, 泳道 5 为 *E. coli*-glms-gna1 落 PCR 产物, 大小为 3 547 bp, 说明 *kan^r* 已经从转化子中去除。

将质粒 pCP20 转化 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX::kan, 去除 *kan^r*, 得到 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX, 验证结果如图 5 所示。泳道 1、2 为 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 菌落 PCR 产物, 大小为 1 113 bp, 泳道 3、4 分别为 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE::kan 和 *E. coli* JW1806-1 菌落 PCR 产物, 大小为 2 337 bp, 说明 *kan^r* 已经从转化子中去除。

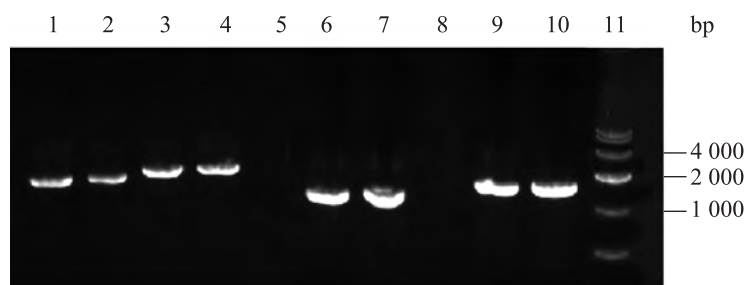


图 3 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX::kan 菌落 PCR 电泳结果

Fig. 3 Colony PCR products electrophoresis analysis result of *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX::kan. 1, 2: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE amplified by primers MU and MD (1 986 bp); 3: colony PCR products of *E. coli* JW1806-1 amplified by primers MU and MD (2 337 bp); 4: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX::kan amplified by primers MU and MD (2 337 bp); 5: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1 amplified by primers K1 and MD; 6: colony PCR products of *E. coli* JW1806-1 amplified by primers K1 and MD (1 344 bp); 7: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX::kan amplified by primers K1 and MD (1 344 bp); 8: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1 amplified by primers MU and K2; 9: colony PCR products of *E. coli* JW1806-1 amplified by primers MU and K2 (1 383 bp); 10: colony PCR products of *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX::kan amplified by primers MU and K2 (1 383 bp); 11: DL 10 000 DNA marker.

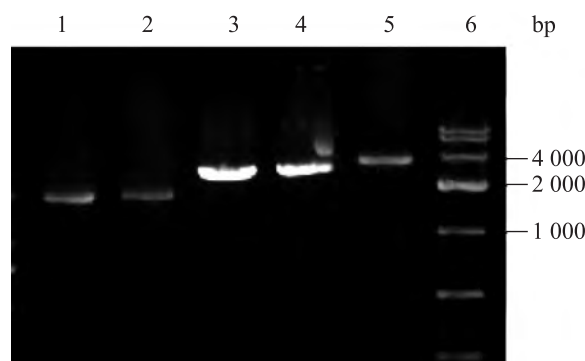


图4 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 菌落 PCR 产物电泳结果

Fig. 4 Colony PCR products electrophoresis analysis result of *E. coli-glms-gna1-ΔnagE*. 1, 2: colony PCR products of *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* amplified by primers NU and ND (1 699 bp); 3: colony PCR products of *E. coli* JW0665-1 amplified by primers NU and ND (2 923 bp); 4: colony PCR products of *E. coli-glms-gna1-ΔnagE::kan* amplified by primers NU and ND (2 923 bp); 5: colony PCR products of *E. coli-glms-gna1* amplified by primers NU and ND (3 547 bp); 6: DL 10 000 DNA marker.

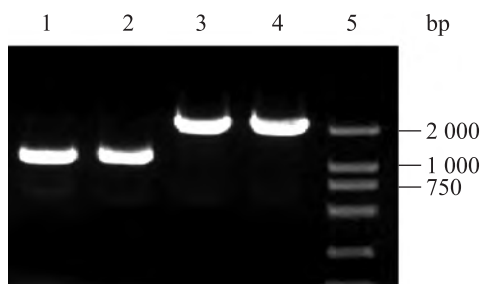


图5 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE-ΔmanX* 菌落 PCR 产物电泳结果

Fig. 5 Colony PCR products electrophoresis analysis result of *E. coli-glms-gna1-ΔnagE-ΔmanX*. 1, 2: colony PCR products of *E. coli-glms-gna1-ΔnagE-ΔmanX* amplified by primers MU and MD (1 113 bp); 3: colony PCR products of *E. coli-glms-gna1-nagE-ΔmanX::kan* amplified by primers MU and MD (2 337 bp); 4: colony PCR products of *E. coli* JW1806-1 amplified by primers MU and MD (2 337 bp); 5: DL 2 000 DNA marker.

2.3 发酵实验结果

2.3.1 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 发酵结果

从图 6 和表 3 可以看出, *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 和对照菌株 *E. coli-glms-gna1* 的菌浓在 14 h 时均达到最高值, 分别为 5.42 g/L 和 4.68 g/L, 说明 *nagE* 基因的敲除对与细胞膜合成相关的物质的代谢未造成较大影响, 细胞用于合

成细胞膜的前体物质 GlcNAc 可通过 *manX* 等基因编码产物将 GlcN 转运到胞内而得到补偿, 这可以从发酵前期 12 h 内 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 的比生长速率较对照菌株高看出。

在发酵过程中, 就 GlcN 产量而言, *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 在 12 h 达到最大值 4.38 g/L, 随后呈现明显下降趋势, 这可能是因为 *nagE* 基

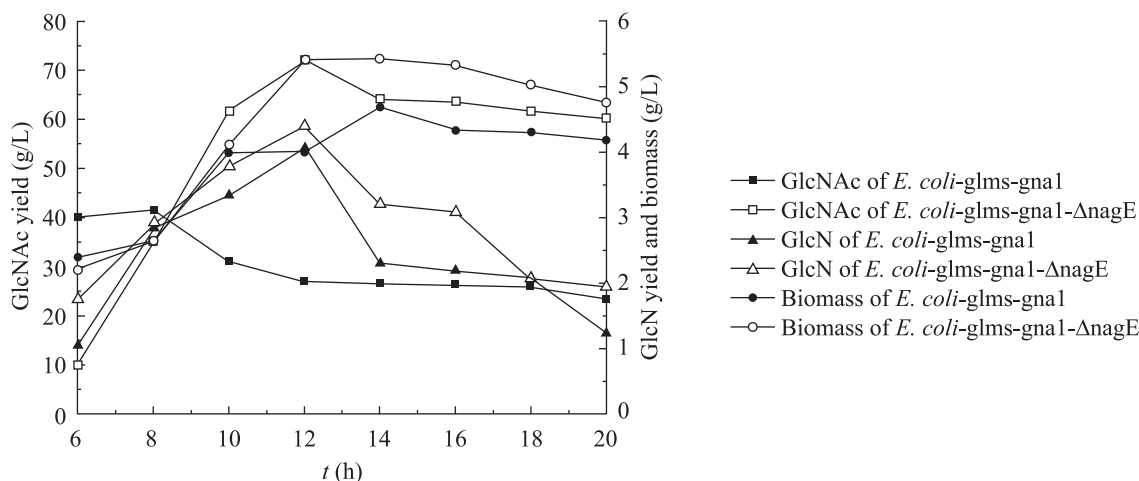


图6 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 发酵实验结果

Fig. 6 Results of GlcN and GlcNAc production by *E. coli-glms-gna1-ΔnagE*.

因的敲除主要抑制 GlcNAc 向胞内的转运, 细胞生长对碳源的需求导致 GlcN 能依靠 *ptsG* 编码的酶 II CB^{Glc} 而进入细胞, 而对照菌株在 12 h 时 GlcN 产量达到最高值 4.06 g/L, *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 的 GlcN 产量高于对照菌株, 这一方面可能由于 *nagE* 基因的敲除减少了 GlcNAc 向胞内的转运, 另一方面可能是由于菌浓的不同造成的。通过计算单位菌体的 GlcN 得率发现, 对照菌株在 12 h 时, 单位菌体的 GlcN 产量为 1.02 g/g DCW, 高于此时 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 的 0.81 g/g DCW。对照菌株的 GlcN 生产强度在 8 h 时达到最高值 0.35 g/(L·h), 而 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 的 GlcN 生产强度在 10 h 时达到最高值 0.38 g/(L·h), 随后呈现下降趋势, 说明 GlcN 的合成速度在前 10 h 内最快。

在发酵过程中, *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 和对照菌株发酵液中的 GlcNAc 产量均呈现先上升后下降趋势, 但对照菌株在发酵后期 GlcNAc 水平下降较为明显, 而 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 在

后期发酵中 GlcNAc 水平基本保持在 60 g/L 以上。*E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 在培养至 12 h, GlcNAc 产量达到最大值 71.80 g/L, 较对照菌株的 GlcNAc 产量最高值 (41.50 g/L) 提高了 73%。从表 3 还可看出, 对照菌株在残糖低于 30 g/L 时, GlcNAc 产量从最高值 41.50 g/L 下降到 27.00 g/L, 下降达 35%, 而 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 在残糖低于 10 g/L 时, GlcNAc 产量从最高值 71.80 g/L 下降到 63.60 g/L, 仅下降了 11%, 这说明 *nagE* 基因的敲除在发酵后期能减少 GlcNAc 向胞内的转运, 使发酵液中 GlcNAc 产量维持稳定。*nagE* 基因的敲除对于提高氨糖的产量效果明显, 也说明对照菌株的 GlcNAc 产量受残糖浓度变化影响显著, 而 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 的 GlcNAc 产量受残糖浓度变化影响不明显。*E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 和对照菌株的 GlcNAc 生产强度分别在 10 h 和 6 h 时达到最大值, 为 6.17 g/(L·h) 和 6.65 g/(L·h), 说明对照菌株在残糖浓度较高时生产强度较高, 而 *E. coli-glms-gna1-ΔnagE* 的

生产强度受残糖浓度影响不大。*E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 单位菌体干重的 GlcNAc 产量在 10 h 达到最高值 15.00 g/g DCW, 而对照菌株单位菌体干重的 GlcNAc 产量在 6 h 达到最高值 16.80 g/g DCW, 可见对照菌株和 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 单位菌体干重的 GlcNAc 产量相差不明显, *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 在残糖浓度为 41.00 g/L 时的单位菌体干重的 GlcNAc 产量和对照菌株在残糖浓度为 92.00 g/L 时的单位菌体干重的 GlcNAc 产量相近 (分别为 15.00 g/g DCW 和 16.80 g/g DCW), 说明残糖浓度的下降对 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 单位菌体干重的 GlcNAc 产量影响不大。

2.3.2 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 发酵结果

从图 7 和表 3 可以看出, *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 的菌浓在 18 h 时达到最高值 7.03 g/L, 而对照菌株的菌浓在 14 h 时就达到最高值 4.68 g/L, 这可能与菌株 2 个基因被敲除,

用于合成细胞膜的相关物质的代谢受到影响有关。比较 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 和 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 的菌浓发现, 前者最高值略低于后者, 但前者的比生长速率却高于后者, 这可能是由于 2 个基因的敲除在更大程度上抑制了氨基葡萄糖向胞内的转运, 细胞比生长速率受到影响, 但由于碳源葡萄糖的存在, 其转运系统并未受到影响, 细胞依然能通过摄取葡萄糖合成自身生长需要的物质。

在发酵过程中, *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 在 10 h 时 GlcN 产量达到最大值 4.82 g/L, 随后呈现缓慢下降趋势, 这可能是因为 *nagE* 和 *manX* 基因的敲除未能完全抑制 GlcN 向胞内的转运, 细胞生长对碳源的需求导致 GlcN 能依靠 *ptsG* 编码的酶 II CB^{Glc} 进入细胞, 而对照菌株在培养至 12 h 时 GlcN 产量达到最高值 4.06 g/L。这一方面是由于此时残糖浓度未下降到影响细胞合成 GlcN 的水平, 另一方面是因为此时 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 的菌浓高于对照菌株的菌浓,

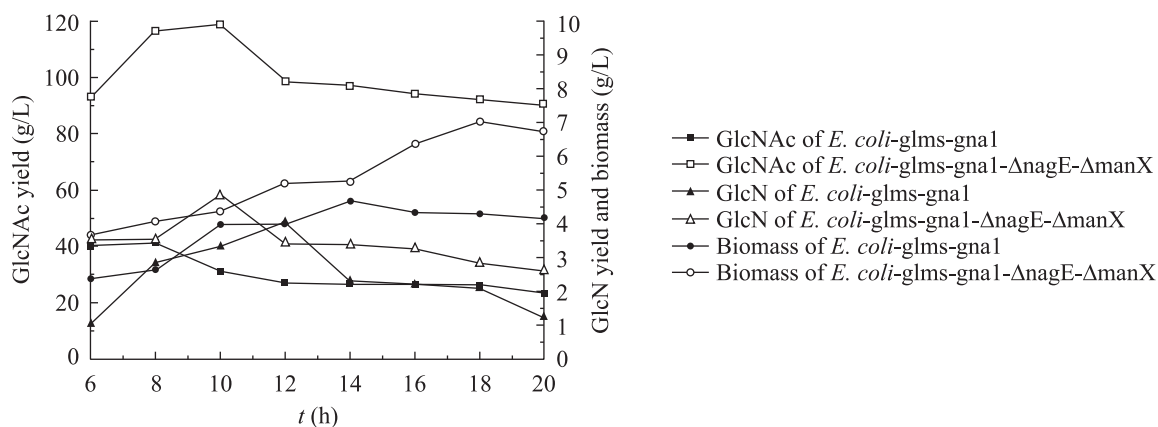


图 7 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 发酵实验结果

Fig. 7 Results of GlcN and GlcNAc production by *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX.

表 3 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE, *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 和 *E. coli*-glms-gna1 氨基葡萄糖发酵参数比较
 Table 3 Comparison of parameters of the glucosamine fermentation by *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE, *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX and *E. coli*-glms-gna1

Kinetic parameters		Culture time (h)							
		6	8	10	12	14	16	18	20
Residual glucose concentration (g/L)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	92.00	78.00	63.00	28.00	25.00	10.00	7.00	5.00
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	90.00	79.00	41.00	19.00	13.00	9.00	8.00	5.00
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	90.00	75.00	41.00	30.00	18.00	8.00	7.00	6.00
Biomass (g/L)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	2.38	2.65	3.98	4.00	4.68	4.33	4.30	4.18
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	2.20	2.65	4.10	5.40	5.42	5.32	5.03	4.75
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	3.68	4.08	4.38	5.20	5.25	6.38	7.03	6.75
GlcN yield (g/L)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	1.05	2.83	3.33	4.06	2.30	2.19	2.10	1.24
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	1.77	2.91	3.78	4.38	3.21	3.09	2.06	1.94
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	3.51	3.53	4.82	3.42	3.37	3.25	2.83	2.61
GlcNAc yield (g/L)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	39.90	41.50	31.00	27.00	26.60	26.50	26.00	23.30
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	10.10	35.20	61.70	71.80	64.10	63.60	61.70	60.20
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	93.20	117.00	119.00	98.60	97.00	94.20	92.10	90.40
Total yield of GlcN and GlcNAc (g/L)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	41.00	44.30	34.30	31.10	28.90	28.70	28.10	24.60
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	11.90	38.20	65.40	76.20	67.30	66.70	63.70	62.10
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	96.70	120.00	124.00	102.00	100.00	97.50	94.90	93.00
Specific growth rate (μ , h ⁻¹)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	0.17	0.05	0.20	0.01	0.08	0.00	0.00	0.00
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	0.17	0.09	0.22	0.14	0.01	0.00	0.00	0.00
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	0.17	0.05	0.04	0.09	0.01	0.10	0.05	0.00
GlcN productivity (g/(L·h))	<i>E. coli</i> -glms-gna1	0.18	0.35	0.33	0.34	0.16	0.14	0.12	0.06
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	0.30	0.36	0.38	0.37	0.23	0.19	0.11	0.10
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	0.59	0.44	0.48	0.29	0.24	0.20	0.16	0.13
GlcNAc productivity (g/(L·h))	<i>E. coli</i> -glms-gna1	6.65	5.19	3.10	2.25	1.90	1.66	1.44	1.17
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	1.68	4.40	6.17	5.98	4.58	3.98	3.43	3.01
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	15.50	14.60	11.90	8.20	6.90	5.90	5.10	4.50
Yield of GlcN on cell (g/g DCW)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	0.44	1.07	0.84	1.02	0.49	0.51	0.49	0.30
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	0.77	1.10	0.92	0.81	0.59	0.58	0.41	0.41
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	0.95	0.87	1.10	0.66	0.64	0.51	0.40	0.39
Yield of GlcNAc on cell (g/g DCW)	<i>E. coli</i> -glms-gna1	16.80	15.70	7.80	6.80	5.70	6.10	6.00	5.60
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE	4.60	13.30	15.00	13.30	11.80	12.00	12.30	12.70
	<i>E. coli</i> -glms-gna1- Δ nagE- Δ manX	25.30	28.70	27.20	19.00	18.50	14.80	13.10	13.40

通过比较此时单位菌体 GlcN 的产量可以发现 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 单位菌体 GlcN 的产量 1.10 g/g DCW 高于对照菌株单位菌体 GlcN 的产量 1.02 g/g DCW。对照菌株的 GlcN 生产强度在 8 h 时达到最高值 0.35 g/(L·h)，而 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 的 GlcN 生产强度在 6 h 时达到 0.59 g/(L·h)，随后呈现下降的趋势。就 GlcN 产量而言，*E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 产量的最高值较 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 低 0.44 g/L，且两者均高于对照菌株，这说明敲除 *nagE* 基因能增加葡萄糖向 GlcN 的代谢，弥补因 GlcNAc 不能向胞内转运对细胞生长的影响。

在发酵过程中，*E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 和对照菌株发酵液中的 GlcNAc 产量均呈现先上升后下降趋势，但 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 在发酵后期的 GlcNAc 水平基本保持在 90 g/L 以上，在培养至 10 h，GlcNAc 产量达到最大值 118.70 g/L，较对照菌株的 GlcNAc 产量最高值 (41.50 g/L) 提高了 186%，说明 *manX* 基因的敲除效果明显，使发酵液中 GlcNAc 产量维持稳定。*E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 和对照菌株的 GlcNAc 生产强度均在培养至 6 h 时最大，分别为 15.50 g/(L·h) 和 6.65 g/(L·h)，随后均呈现下降的趋势。*E. coli*-glms-gna1- Δ nagE- Δ manX 单位菌体干重的 GlcNAc 产量在 8 h 达到最高值 28.70 g/g DCW，而 *E. coli*-glms-gna1- Δ nagE 和对照菌株单位菌体干重的 GlcNAc 产量分别在 10 h 和 6 h 达到最高值 15.00 g/g DCW 和 16.80 g/g DCW，这说明 *nagE* 和 *manX* 双基因的敲除效果显著。

3 讨论

Red 重组敲除技术是近年来兴起的基于 λ 噬菌体 Red 重组酶和体内同源重组反应的新型遗传工程技术，该技术主要利用 λ 噬菌体的 3 个重组蛋白酶来完成体外 DNA 片段与染色体的同源重组。和其他基因敲除技术相比，该技术省去了体外 DNA 酶切与连接的步骤，使细菌染色体靶基因的敲除与替换操作相对简单，因而逐渐成为基因功能探索以及新工程菌株构建的有效手段。通常对基因的敲除都会对菌体的生长和代谢造成一定的影响，甚至引起菌体死亡。通过比较原菌株与基因敲除菌株的比生长速率以及菌浓发现，基因敲除对菌体生长未出现较大的影响，这可能一方面是与菌体细胞膜合成途径相关联的 *glmS* 及 *gnaI* 基因得到了高效表达，因而对菌体生长起到一定的促进作用；另一方面，胞外的 GlcN 能通过 *ptsG* 编码的酶 II CB^{Glc} 进入细胞，在碳源不足时起到补偿作用。由于 GlcNAc 对细胞的刺激远小于 GlcN，这是造成细胞内不能积累 GlcN 的主要原因之一，所以 *nagE* 基因是本研究第一个被敲除的基因。通过对 *nagE* 和 *manX* 基因的敲除，能提高氨糖的生产强度，或者能缩短菌体达到最大生产强度的时间，这在工业生产上具有较大优势，能充分利用发酵液中的碳源，提高碳源转化率，降低成本，也能简化下游提取工艺，降低污染。对大肠杆菌 *nagE* 和 *manX* 双基因的敲除，使其 GlcNAc 产量达到最大值 118.70 g/L，远高于单基因敲除菌株和对照菌株；且双基因的敲除菌株单位菌体干重的 GlcNAc 产量较对照菌株提高 71% (16.80 g/g DCW)，较单

基因敲除菌株提高 91% (15.00 g/g DCW), 这说明 *nagE* 和 *manX* 双基因的敲除能显著提高氨糖的产量, 对于改造大肠杆菌发酵生产氨糖具有重要的意义, 为最终实现氨糖的工业化生产奠定了坚实的基础。

REFERENCES

- [1] Deng MD, Wassink SL, Grund AD. Engineering a new pathway for *N*-acetylglucosamine production: coupling a catabolic enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase, with a biosynthetic enzyme, glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(4): 828–834.
- [2] Hsieh JW, Wu HS, Wei YH, et al. Determination and kinetics of producing glucosamine using fungi. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(5): 1009–1016.
- [3] Sitanggang AB, Wua HS, Wang SS, et al. Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus* sp. BCRC 31742. *Bioresour Technol*, 2010, 101(10): 3595–3601.
- [4] Deng MD, Severson DK, Grund AD, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for industrial production of glucosamine and *N*-acetylglucosamine. *Metab Eng*, 2005, 7(3): 201–214.
- [5] Sachadyn P, Jędrzejczak R, Milewski S, et al. Purification to homogeneity of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Express Purif*, 2000, 19(3): 343–349.
- [6] Deng MD, Grund AD, Wassink SL, et al. Directed evolution and characterization of *Escherichia coli* glucosamine synthase. *Biochimie*, 2006, 88(5): 419–429.
- [7] Teplyakov A, Leriche C, Obmolova G, et al. From lobry de bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase. *Nat Prod Rep*, 2002, 19(1): 60–69.
- [8] Sashiwa H, Fujishima S, Yamano N, et al. Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydr Res*, 2002, 337(8): 761–763.
- [9] Kuk JH, Jung WJ, Jo GH, et al. Production of *N*-acetyl- β -D-glucosamine from chitin by *Aeromonas* sp. GJ-18 crude enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(3): 384–389.
- [10] Donzelli BGG, Ostroff G, Harman GE. Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydr Res*, 2003, 338(18): 1823–1833.
- [11] Kudan S, Eksittikul T, Pichyangkura R, et al. Preparation of *N*-acetyl-D-glucosamine and N, N'-diacetylchitobiose by enzymatic hydrolysis of chitin with crude chitinases. *J Biotechnol*, 2010, 150: 89.
- [12] Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S, et al. Production of β -*N*-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochem*, 2004, 39(6): 665–671.
- [13] Chmielowski RA, Wu HS, Wang SS. Scale-up of upstream and downstream operations for the production of glucosamine using microbial fermentation. *Biotechnol J*, 2007, 2(8): 996–1006.
- [14] Rattanakit N, Yano S, Wakayama M, et al. Saccharification of chitin using solid-state culture of *Aspergillus* sp. SI-13 with shellfish waste as a substrate. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(4): 391–396.
- [15] Durand P, Golinelli-Pimpaneau B, Mouilleron S, et al. Highlights of glucosamine-6P synthase catalysis. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 474(2): 302–317.
- [16] Joanna R, Olchoway J, Konariev PV, et al. The crystal and solution studies of glucosamine-6-phosphate synthase from *Candida albicans*. *J Mol Biol*, 2007, 372(3): 672–688.
- [17] Beatriz RN, Angel R, Honorina MB, et al.

- Transport of *N*-acetyl-D-mannosamine and *N*-acetyl-D-glucosamine in *Escherichia coli* K1: effect on capsular polysialic acid production. *FEBS Lett*, 2002, 511(1/3): 97–101.
- [18] Van Montfort RL, Pijning T, Kalk KH, et al. The structure of the *Escherichia coli* phosphotransferase IIA^{mannitol} reveals a novel fold with two conformations of the active site. *Structure*, 1998, 6(3): 377–388.
- [19] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [20] Doublet B, Douard G, Targant H, et al. Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J Microbiol Methods*, 2008, 75(2): 359–361.
- [21] Su C, Xia WS, Yao HY. The determination of glucosamine and *N*-acetylglucosamine. *Sci Tech Food Ind*, 2003, 24(6): 74–75, 77.
苏畅, 夏文水, 姚惠源. 氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖的测定方法. *食品工业科技*, 2003, 24(6): 74–75, 77.
- [22] Wang YF, Yan LZ, Guo XQ. Determination of *N*-acetyl-D-glucosamine in D-glucosamine hydrochloride by HPLC with refractive index detector. *J Cap Norm Univ: Nat Sci Ed*, 2008, 29(1): 40–42.
王英锋, 晏利芝, 郭雪清. HPLC 示差折光分析法测定 D-氨基葡萄糖盐酸盐中的 *N*-乙酰-D-氨基葡萄糖. *首都师范大学学报: 自然科学版*, 2008, 29(1): 40–42.