

## 利用重组大肠杆菌合成几丁寡糖的研究

# Biosynthesis of Chitooligosaccharides by Recombinant *Escherichia coli*

张大伟<sup>1,2</sup>, 楚杰<sup>1</sup>, 郝永任<sup>1</sup>, 李明华<sup>1</sup>, 王鹏<sup>2\*</sup>

ZHANG Da-Wei<sup>1,2</sup>, CHU Jie<sup>1</sup>, HAO Yong-Ren<sup>1</sup>, LI Ming-Hua<sup>1</sup> and WANG Peng<sup>2\*</sup>

1 山东省应用微生物技术重点实验室, 济南 250014

2 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

1 Shandong Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

2 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

**摘要** 提取根瘤菌 *Mesorhizobium loti* 基因组, 克隆编码 *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶 *nodC* 基因, 插入质粒 *pUC19* 的 *lac* 启动子的下游, 构建并筛选出能够合成几丁寡糖的重组大肠杆菌 *DC<sub>L</sub>-3*。利用优化的 MMYNG 培养基, 重组大肠杆菌 *DC<sub>L</sub>-3* 在 10L 发酵罐中培养 26h 后, 培养液菌体浓度测定  $OD_{560} = 10.8$ , 几丁寡糖得率达到 526mg/L。收集重组细菌的细胞并煮沸破碎, 利用活性炭的吸附和 P4 凝胶层析对几丁寡糖产物进行分离纯化。纯化产物的液质分析(LC-ESI-MS)结果表明: 主要寡糖产物为几丁四糖( $m/z, 831[M+H]^+$ )和几丁五糖( $m/z, 1034[M+H]^+$ )。

**关键词** 几丁寡糖, *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶, 重组大肠杆菌, 液质联用技术  
中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0525-05

**Abstract** Acetyl-*N*-glucosaminyltransferase gene (*nodC*) was successfully cloned to *Escherichia coli* from *Mesorhizobium loti*. The recombinant *E. coli* harboring *nodC* gene was able to synthesize chitooligosaccharides (COs) in MMYNG medium. In optimized condition, a yield of 526 mg/L was obtained after 26 h cultivation in 10 L bioreactor. COs concentration reached up to 4.5% of the cell dry weight. The COs products were purified by charcoal adsorption and Bio-gel P4 chromatography, penta-*N*-acetylchitopentaose ( $m/z, 1034[M+H]^+$ ) and tetra-*N*-acetylchitopentaose ( $m/z, 831[M+H]^+$ ) were identified as the dominating COs product using the method of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS).

**Key words** chitooligosaccharides, acetyl-*N*-glycosaminyltransferase, recombinant *E. coli*, LC-ESI-MS coupling technique

几丁寡糖(chitooligosaccharides, COs)是 *N*-乙酰氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接而成的聚合物, 在医药、食品和农业等多个领域均有较大的应用潜力。目前, 利用化学水解、物理降解和生物酶解等方法, 可得到各种聚合度的壳寡糖产物或混合物, 但仍以低聚合度的产物为主。通过对产物的衍生化和脱保护反应, 王俊等得到了聚合度较高的几丁五糖<sup>[1]</sup>。

由根瘤菌分泌产生的结瘤因子是脂酰基壳寡糖

(lipochitooligosaccharides, LCOs), 由 3 至 5 个  $\beta$ -1,4 键相连的 *N*-乙酰氨基葡萄糖寡聚物和非还原端带有一不饱和脂肪酸构成, 经同源性和体外生化分析, *nodC* 蛋白与聚乙酰氨基葡萄糖合成酶同源, 为 *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶, 负责催化从头合成结瘤因子的糖链骨架, 即 *N*-乙酰氨基葡萄糖的聚合物。糖链的聚合度由不同来源的 *nodC* 基因决定<sup>[2]</sup>, 来源于 *Azorhizobium caulinodans* 和 *Mesorhizobium loti* 的 *nodC*

蛋白(*nodC<sub>A</sub>*, *nodC<sub>L</sub>*)所催化的糖基化反应的产物均为几丁五糖<sup>[3]</sup>。

利用重组细菌的发酵合成寡糖是近年来新兴的一类寡糖合成技术<sup>[4]</sup>,几丁寡糖在重组大肠杆菌细胞内的合成,可由外源乙酰氨基葡萄糖转移酶催化完成,重组细菌培养的细胞密度、外源糖基转移酶表达的活性、糖基供体及受体的浓度和重组细菌细胞对CO<sub>2</sub>的耐受度等因素均可影响CO<sub>2</sub>的合成效率。

本研究将来源于*M. loti*的重组基因*nodC<sub>L</sub>*,连接在质粒pUC19的Lac启动子的下游,构建能够表达重组*nodC*基因的大肠杆菌*DC<sub>L</sub>-3*,选择优化的培养条件对其进行发酵培养,对几丁寡糖产物进行分离纯化和结构鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

**1.1.1** *M. loti* 购自农业微生物菌种保藏中心(ACCC),大肠杆菌DH5 $\alpha$ 购自TaKaRa公司。

**1.1.2** *DC<sub>L</sub>-3*由本研究构建的表达载体*pC<sub>L</sub>-3*转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 所得;*pUC19*由购自TaKaRa公司的质粒pUC19转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 所得。

### 1.2 培养基的组成(g/L)

**1.2.1** MM:甘油 17.5,磷酸氢二铵 4.0,磷酸二氢钾 10.0,硫酸镁 1.0,维生素B1 0.045,微量元素溶液 10mL/L,氨苄青霉素 50mg/L;微量元素溶液的组成为:硫酸亚铁 5.0,氯化锰 0.85,氯化钴 0.14,氯化铜 0.85,硼酸 0.17,硫酸锌 0.9,钼酸钠 0.09。

**1.2.2** MMNG:MM + 0.2% N-乙酰氨基葡萄糖。

**1.2.3** MMYNG:MM + 0.2% N-乙酰氨基葡萄糖 + 0.2% 酵母提取物

以上培养基各组分均为分析纯试剂,N-乙酰氨基葡萄糖购自Sigma公司。

### 1.3 分子生物学试剂

本研究所用限制性内切酶、连接酶试剂盒和PCR相关试剂均购自TaKaRa公司。

### 1.4 重组*nodC*基因表达载体*pC<sub>L</sub>-3*构建

构建过程见图1。

### 1.5 乙酰氨基葡萄糖含量的测定

取1.5mL培养液,4℃、8000g离心15min,等体积蒸馏水洗涤1次,同样条件下离心收集菌体后,0.5mL蒸馏水重悬菌体,100℃水浴1h破碎细胞后,震荡混匀,并置于冰水中冷却20min,加入30 $\mu$ L浓盐酸沉淀蛋白,4℃、12000g离心20min,取50 $\mu$ L上清

液,加入22 $\mu$ L浓盐酸,100℃水解3h,水解液用10mol/L NaOH中和,用蒸馏水补至500 $\mu$ L,加入100 $\mu$ L乙酰丙酮试剂,100℃水浴15min后,立即置于冰水中冷却,并加入3mL DMAB试剂<sup>[5]</sup>,37℃保温20min,在530nm波长下进行比色测定。以N-乙酰氨基葡萄糖为标准品,绘制标准曲线,计算测定样品的乙酰氨基葡萄糖含量。

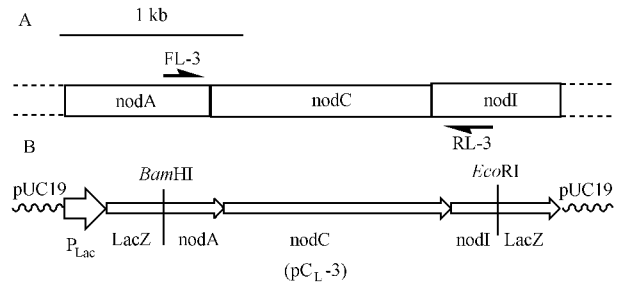


图1 重组质粒*pCL-3*的构建

Fig. 1 Construction of *pCL-3*.

A: genomic organization of *M. loti* nod genes. PCR primers. FL-3: TAGGATCCAATTCGACGCTCGATGACCGA; RL-3: GCGAATTCAGTCTCGAATCGCCGCAATCC. B: PCR product was inserted to pUC19 by *Bam*HI-*Eco*RI digestion.

### 1.6 重组大肠杆菌*DC<sub>L</sub>-3*的培养

**1.6.1** 三角瓶振荡培养:挑取单菌落接种于含有100mL培养液的500mL三角瓶中,35℃、200r/min震荡培养36h,离心收集菌体,2mL蒸馏水重悬后,各取1mL分别测定菌体干重(Dry Weight, DW)和乙酰氨基葡萄糖含量。

**1.6.2** 发酵罐培养:挑取单菌落接种于含有150mL MMYNG培养液的1000mL三角瓶中,35℃、200r/min培养24h后,培养液接种于装有5L MMYNG培养液的10L全自动发酵罐中。培养温度为35℃,通过调节搅拌转速和通气量,相对溶氧值控制在10%~20%(溶氧电极 Inpro 6800, METTLER TOLEDO),在线检测培养液OD<sub>560</sub>和排出气体的CO<sub>2</sub>浓度(V/V),利用50%的氨水溶液,培养液pH自动反馈调节为6.8。当培养液相对溶氧水平突然上升,并伴随排出气体的CO<sub>2</sub>浓度下降时,开始进行补料,补料速度起始为5mL/min,以每小时增加2mL的速度线形递增。接种培养后4h起开始取样,取样间隔为4h,取样量为100mL,离心收集菌体,2mL蒸馏水重悬后,各取1mL分别测定菌体湿重(Wet Weight, WW)干重(DW)和乙酰氨基葡萄糖含量。培养结束后,收集菌体进行产物的提取、纯化和乙酰氨基葡萄糖含量的测定。

### 1.7 几丁寡糖产物的提取及纯化

**1.7.1** 重组细菌细胞的破碎:取1.5L培养液,4℃、

8000g 离心 15min, 等体积蒸馏水洗涤 1 次, 同样条件下离心收集菌体, 菌体沉淀用 500mL 蒸馏水重悬后, 置于 -20℃ 过夜, 冷冻细胞液在 37℃ 水浴条件下融化 1h, 搅拌状态下煮沸 1h 进行细胞破碎, 细胞破碎液经冷却和匀浆混匀后, 4℃、12000g 离心 20min, 上清液用蒸馏水补至 500mL 备用。

**1.7.2 活性碳的吸附及洗脱** :500mL 细胞破碎液与 40g 活性碳吸附剂 (活性碳:硅藻土 = 1:1) 在 40℃ 和搅拌状态下充分混匀、吸附 1h, 吸附液以 Whatman 4 号滤纸为过滤介质进行过滤, 并以 1L 蒸馏水洗涤滤饼进行脱盐, 脱盐后的滤饼用 1L 50% 乙醇水溶液进行洗脱, 洗脱液通过旋转蒸发仪浓缩至 20mL 后, 4℃、12000g 离心 20min, 取上清液进行测定和进一步的纯化。

**1.7.3 凝胶分离** :Bio-gel P4 凝胶, 1.5cm × 100cm, 样品为活性碳洗脱后的浓缩液, 上样量为 3mL, 洗脱速度为 20mL/h, 洗脱体积达到 80mL 后, 开始收集洗脱液, 2mL/管, 收集并混合 100 ~ 124mL 洗脱体积的样品, 共 24mL, 取样进行乙酰氨基葡萄糖的含量测定。

**1.8 液质联用 (LC-ESI-MS) 液质联用仪, Agilent Hp1100 分析寡糖产物**

**1.8.1 样品处理** :取 Bio-gel P4 分离的混合洗脱液样品 200μL, 加入 4μL 冰醋酸, 混合均匀后待测。

**1.8.2 HPLC 条件** :色谱柱 Shim pack CLC-NH2, 6.0 I.D × 150mm, 柱温 40℃, 流动相:乙腈-水 (75:25, V/V) 溶液; 流速:0.5mL/min; 进样量:10μL; 紫外检测波长为 208nm。

**1.8.3 质谱条件** :电喷雾电离, 正离子模式, 干燥气 氮气, 干燥气流速:10 L/min, 毛细管电压:4kV, 毛细管温度:100℃, 雾化压力 30Pa。

## 2 结果

### 2.1 重组大肠杆菌 DC<sub>L</sub>-3 的发酵培养

**2.1.1 培养基优化试验** :采用三角瓶摇床培养, 在 MM、MMNG 和 MMYNG 等三种发酵培养基中, 以 DUC19 为对照菌株, 对重组大肠杆菌 DC<sub>L</sub>-3 的生长及产糖能力进行了测定, 表 1 结果显示, 培养基添加 0.2% 的乙酰氨基葡萄糖后, DC<sub>L</sub>-3 的产糖能力明显提高, 但在没有添加有机氮源的合成培养基 MM 和 MMNG 中, DC<sub>L</sub>-3 生长缓慢, 添加 0.2% 酵母提取物后, 其生长速度明显提高, 也有利于目的寡糖的合成, 但培养基组分的变化却对对照重组细菌 DUC19 的生长却无明显影响。因此, 为进一步探讨培养基组分对重组细菌合成几丁寡糖的影响, 本研究选取甘油为唯一碳源的培养基 MM 和半合成培养基 MMYNG 为发酵罐培养试验的产糖培养基。

表 1 重组大肠杆菌的三角瓶培养结果 (36h)

Table 1 Flask cultivation results of recombinant *E. coli* strains

| Medium | Strain             | OD <sub>560</sub> | DW of <i>E. coli</i> Cell (mg/100mL culture) | GlcNAc content (mg/mL boiled cells) | GlcNAc content (mg/g DW) |
|--------|--------------------|-------------------|--|-------------------------------------|--------------------------|
| MM     | DC <sub>L</sub> -3 | 0.21              | 31   | 0.21                                | 13.7                     |
|        | DUC19              | 1.51              | 216  |                                     |                          |
| MMNG   | DC <sub>L</sub> -3 | 0.33              | 53   | 0.72                                | 27.2                     |
|        | DC <sub>L</sub> -3 | 1.38              | 201  | 2.97                                | 29.6                     |
| MMYNG  | DC <sub>L</sub> -3 | 1.38              | 201  | 2.97                                | 29.6                     |
|        | DUC19              | 1.57              | 221  |                                     |                          |

### 2.1.2 发酵罐培养试验

利用半合成培养基 MMYNG, 在 10 L 发酵罐的培养试验中 (图 2) 随着重组细菌生长量的增加, 单位体积培养液中的糖含量也逐步提高, 但在培养 8 h 后, 每克干菌体的乙酰氨基葡萄糖的测定浓度却基本保持恒定, 表明 DC<sub>L</sub>-3 在此培养条件下, 细菌细胞内积累的几丁寡糖浓度达到最高, 约在 4.5% ~ 4.7% 之间。在合成培养基 MM 的发酵罐培养试验中, 与培养基 MMYNG 相比, DC<sub>L</sub>-3 的生长速度明显减慢, 26h 培养后, 菌体生长量为 32.3g 湿菌体/L 发酵液, 但每克干菌体中乙酰氨基葡萄糖的含量也达到 4.65% (表 2)。

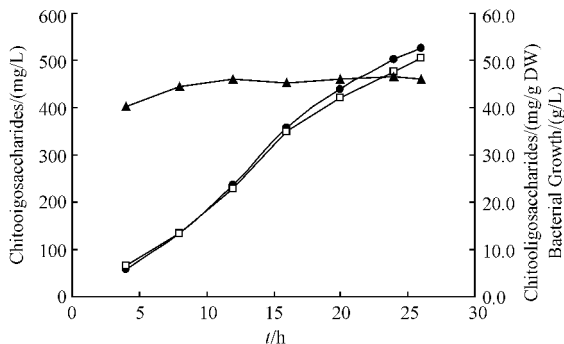


图 2 重组大肠杆菌 DC<sub>L</sub>-3 的培养结果

Fig.2 COs production in the culture of recombinant *Escherichia coli* strains DC<sub>L</sub>-3 were shown as COs content (mg) in per gram cell dry weight (▲) and mg/L culture (■) The growth behavior (◇) of the strain DCL-3 was shown as wet weight of *E. coli* cells (g) per liter culture.

表 2 重组大肠杆菌  $DC_L-3$  发酵罐 26h 培养结果

| Medium | growth of $DC_L-3$<br>(g WW/L culture) | GlcNAc content<br>(mg/L culture) | GlcNAc content<br>(mg/g DW) |
|--------|--|----------------------------------|-----------------------------|
| MM     | 32.3                                   | 332                              | 46.5                        |
| MMYNG  | 50.5                                   | 526                              | 46.1                        |

## 2.2 产物的分离纯化

收集的培养 26 h 的重组大肠杆菌细胞,并对其寡糖产物进行分离纯化。对分离纯化过程样品的乙酰氨基葡萄糖含量的测定结果表明(表 3,图 3):活性碳的吸附洗脱处理,85% 以上的含有乙酰氨基葡萄糖的组分得到有效分离,P4 凝胶层析的检测结果显示:分离样品中近 90% 的寡糖组分主要集中于 100~124mL 的洗脱体积内,而分子量为 594.5 的棉子糖在同样试验条件下进行凝胶层析时,洗脱体积为 135~142mL(数据未显示),因此,寡糖产物的分子量应大于聚合度为 3 时的 627。

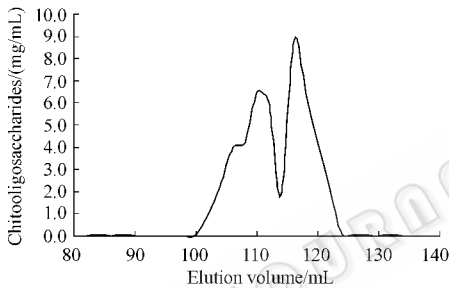


图 3 P4 凝胶排阻层析结果

Fig. 3 Size exclusion chromatography on Bio-gel P4 of COs samples produced by *E. coli* strain  $DC_L-3$  from charcoal purification

表 3 1.5L 培养液中几丁寡糖产物的分离纯化  
Table 3 Purification of COs from 1.5L culture of strain  $DH5\alpha$  (p $CL-3$ )

| Purification steps      | Volume /mL | COs con. (mg/mL) | Total COs /mg | Yield/% |
|-------------------------|------------|------------------|---------------|---------|
| Boiled cell supernatant | 500        | 1.51             | 755           | 100     |
| Charcoal purification   |            |                  |               |         |
| $H_2O_4$                | 1000       | 0.03             | 30            | 4.0     |
| 50% Ethanol             | 20         | 32.23            | 645           | 85.4    |
| Bio-gel P4 purification | 160*       | 3.85             | 616           | 81.6    |

\* : Total volume of Bio-gel P4 purification was calculated as follows : 20 × 24/3 = 160mL

## 2.3 LC-ESI-MS 鉴定结果

HPLC 图谱(图 4)与 Bio-gel P4 分离图谱均显示存在两个主要的寡糖组分,保留时间分别为 31.28min 和 38.21min。LC-ESI-MS 分析结果(表 4)表明:Bio-gel P4 分离后的混合样品中,主要产物为几丁四糖和几丁五糖,几丁三糖(20.56min)的比例

仅占 5%。

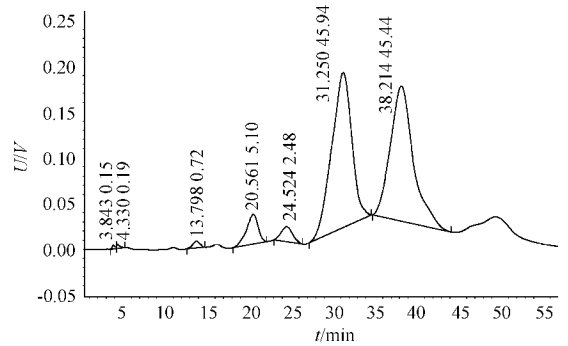


图 4 几丁寡糖产物的 HPLC 分析结果

Fig. 4 HPLC chromatogram with  $NH_2$ -column for chitooligosaccharides

Shim Pack CLC- $NH_2$ , 6.0 I. D. × 150mm; Mobile phase: acetonitrile: water = 75:25; Flow rate: 0.5mL/min; Temperature: 40°C; Detection: 208nm.

表 4 P4 凝胶层析后样品的 LC-ESI-MS 分析结果  
Table 4 Results by LC-ESI-MS method for samples from Bio-gel P4 purification

| Retention time/min | $m/z$                      | Putative COs                            | Area percent /% |
|--------------------|----------------------------|---|-----------------|
| 20.56              | 628 [M + H] <sup>+</sup>   | GlcNAc <sub>3</sub>                     | 5.10            |
|                    | 650 [M + Na] <sup>+</sup>  | (tri- <i>N</i> -acetyl-chitotriose)     |                 |
| 31.28              | 831 [M + H] <sup>+</sup>   | GlcNAc <sub>4</sub>                     | 45.94           |
|                    | 853 [M + Na] <sup>+</sup>  | (tetra- <i>N</i> -acetyl-chitotetraose) |                 |
| 38.21              | 1034 [M + H] <sup>+</sup>  | GlcNAc <sub>5</sub>                     | 45.44           |
|                    | 1056 [M + Na] <sup>+</sup> | (penta- <i>N</i> -acetyl-chitopentaose) |                 |

## 3 讨论

在本研究中,几丁寡糖的合成反应是重组 *nodC* 编码的由乙酰氨基葡萄糖糖基转移酶催化进行的,合成反应的糖基供体为 UDP-GlcNAc,同时,乙酰氨基葡萄糖也是大肠杆菌细胞壁的组成成分,在肽聚糖中的含量可占到细胞干重的 1.2%,因此,重组细菌对 UDP-GlcNAc 的需求量较大。在以甘油为唯一碳源的 MM 培养基中,UDP-GlcNAc 的形成途径,可由 Fru-6-P 转化为 GlcNAc-6-P,再经 GlcNAc-1-P 进行合成。大肠杆菌对乙酰氨基葡萄糖的吸收是由磷酸化转运系统(phosphotransferase system, PTS)完成的<sup>[6]</sup>,进入细胞后的存在形式即为 GlcNAc-6-P,利于糖基供体 UDP-GlcNAc 的合成。而本研究的结果也表明,重组细菌  $DC_L-3$  对糖基供体 UDP-GlcNAc 的额外需求,会明显降低重组大肠杆菌的生长速度和产糖得率,但对几丁寡糖在重组细菌细胞中的最终积累浓度没有影响。而在有充足碳源的情况下,培养基中添加一定比例的乙酰氨基葡萄糖,可能会加快糖基供体的合成速度,从而消除由于糖基供体,UDP-

GlcNAc 的过量需求而对菌体生长造成不利影响。

但通过对本研究应用的重组 *nodC<sub>L</sub>* 基因和 Samain E 等应用的来源于 *A. caulinodans* 的重组 *nodC<sub>A</sub>* 基因的 RACC 分析和其表达蛋白的跨膜结构域的预测结果(表 5)表明:前者的稀有密码子的数量较少,跨膜结构域也仅有两个,更易于在大肠杆菌中表达。但与 Samain 等的研究结果相比<sup>[7]</sup>,表达不同来源的重组 *nodC* 基因,虽然在合成培养基 MM 中,重组细菌 *DC<sub>L</sub>-3* 的生长速度明显减缓,但单位菌体干重的几丁寡糖含量却无明显差异,均可在 4.5%~5% 之间。另外,本研究还曾尝试对 *DC<sub>L</sub>-3* 进行诱导表达,但其生长速度却明显降低(数据未显示)。以上结果表明,利用重组 *nodC* 基因的大肠杆菌进行几丁寡糖的合成,外源糖基转移酶的活性并不是此合成反应的限制点,较低的酶活性即可满足目的寡糖合成的需求,酶活过高,会使糖基供体供应不足,从而影响菌体的生长速度和目的寡糖的得率。由于重组细菌对糖基供体的需求主要是满足菌体生长和几丁寡糖的合成,因此,为了获得更高的几丁寡糖得率,需要为重组 NodC 蛋白提供足够的糖基供体,本研究通过添加乙酰氨基葡萄糖以促进 UDP-GlcNAc 的合成的方法,以及 Samain E 等通过降低补料速度以限制菌体生长的工艺,均取得了更好的产糖效率。

表 5 *nodC* 基因的稀有密码子和跨膜结构域的数量  
Table 5 Prediction of transmembrane helices and RaCC  
Results for *nodC<sub>L</sub>* and *nodC<sub>A</sub>*

| NodC protein            | Amount of AA | Number of transmembrane helices | Rare condons (Arg, Leu, Ile and Pro) |        |        |
|-------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------|--------|
|                         |              |                                 | Single                               | Double | Triple |
|                         |              |                                 | <i>nodC<sub>A</sub></i>              | 396    | 4      |
| <i>nodC<sub>L</sub></i> | 425          | 2                               | 14                                   | 0      | 0      |

图 2 的数据表明,培养 8h 后,细胞内的寡糖可占细胞干重的 4.5%~4.7%,而且在整个培养过程

中基本维持不变,进一步提高发酵液中的细菌浓度或几丁寡糖在重组细菌细胞中的浓度,也可增加几丁寡糖的产率。本研究采用的活性炭-凝胶层析的纯化步骤可收集到大多数的目的寡糖组分,利于对产物进行定性及定量的分析。

利用重组大肠杆菌定向合成目的寡糖的研究是目前糖合成研究的一个重要分支,我国在此领域的研究起步较晚,本研究通过对重组大肠杆菌的发酵培养,成功地完成了几丁寡糖的合成,同时还对主要几丁寡糖产物进行了定性、定量的分析,为进一步提高重组大肠杆菌合成寡糖得率的研究工作提供了参考和依据。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Wang J(王骏), Li YX(李英霞), Song N(宋妮), et al. Preparation and characterization of chito-oligosaccharides and peracetylated-chito-oligosaccharides. *Periodical of Ocean University of China*(中国海洋大学学报) 2005, 35(6): 994-1000.
- [2] Xavier P, Christian S, William JB. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(1): 180-201.
- [3] Kamst ET, Pilling J, Raamsdonk LM, et al. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J Bacteriol*, 1997, 179(7): 2103-2108.
- [4] Zhang DW(张大伟), Qi QS(祁庆生), Wang H(王鹏). Progress of oligosaccharides biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2007, 23(1): 16-20.
- [5] Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J Biol Chem*, 1955, 17: 959-966.
- [6] Laura I, Mario LC, Jacq-ueline P. Why does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on *N*-acetylglucosamine? effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *J Biotechnol*, 2005, 189(9): 2974-2982.
- [7] Samain E, Chazalet V, Ceremia RA. Production of *O*-acetylated and sulfated chitoooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes. *J Biotechnol*, 1999, 72: 33-47.